

CATARINE MASSUCATO NISHIJIMA

*Caracterização do efeito anti-inflamatório e anti-hemorrágico dos extratos e frações enriquecidas de espécies vegetais do projeto temático BIOTA/FAPESP*



ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

Botucatu  
2010

CATARINE MASSUCATO NISHIJIMA

*Caracterização do efeito anti-inflamatório e anti-hemorrágico dos extratos e frações enriquecidas de espécies vegetais do projeto temático BIOTA/FAPESP*



Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual Paulista  
Júlio de Mesquita Filho para obtenção  
do título de mestre em Farmacologia

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

Botucatu  
2010

**ABREVIATURAS UTILIZADAS:**

**ADAMs** – “A desintegrin and metalloproteinases”

**B1**- Receptor 1 de bradicinina

**B2**- Receptor 2 de bradicinina

**COX**- Ciclooxygenase

**EMeOH**- extrato metanólico

**i.d**- injeção intradérmica

**IL** - Interleucina

**i.p** – injeção intraperitoneal

**JFI**- metaloproteinase jararafibrase I

**5-HT**- serotonina

**MMP**- metaloproteinase de matriz

**MTT**- 3-4,5-dimetiltiazol-2il-2,5-difenil-tetrazolium bromide

**PAG**- substância cinzenta periarquedutal

**PBS**- Phosphate buffer saline

**PCPA**-

**PGD**- Prostaglandina D

**PGE**- Prostaglandina E

**p.o** – via oral

**RVM** – medula rostral ventromedial

**SVMP**- metaloproteinase de veneno de cobra

**TIMPs** – Inibidores endógenos de metaloproteinases de matriz

**TNFR**- Receptor para fator de necrose tumoral

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa

*Dedico esse trabalho a Deus.*

## **Agradecimento especial**

Eu agradeço pela Sua graça que apóia minha intenção de aprender.

Agradeço por ser capaz de experimentar a felicidade e que a minha grande alegria é estar no lugar onde estou.

Obrigada, Senhor Jesus, por me tocar com Sua força e com Seu amor.

*“Assim como a terra não pode dar o fruto se não for fertilizada, assim não podemos fazer nada se não for pela graça de Deus.”*

*“Nature is but a name for an effect whose cause is God.”  
(W. Couper)*

### *Agradecimentos à equipe e aos amigos*

À Cassia e aos meus pais: minha base. Obrigada pelo incentivo, apoio e compreensão.

À Clélia, minha orientadora. Uma pessoa em dedicada busca pelos melhores caminhos a fim de possibilitar a realização de nossas pesquisas, entre outras características, que tem assegurado a qualidade do nosso grupo. Obrigada pela sua amizade e orientação.

À professora Lúcia Rocha, que além de ceder o espaço físico do seu laboratório, nos ensina com suas sugestões didáticas. Um exemplo de pessoa forte que não nasceu para dar ouvidos ao pessimismo.

Hélio-Ponpon, Thiago-Mingo (o grande mestre de padawan), Flávia-Kalose (a fã de Malcon Jackson), Raquel-Pocotó (sim, ela é cavalona), Celi-Girafalez, Patrícia, Alexandre-Kitasato, Marília-Kktua, Sílvia-Lecefé, Leo, Fábio-Kuíka, agregados e todas as pessoas que passaram em nosso laboratório: Esse trabalho pertencem a vocês pois nunca o faria sozinha. Obrigada por tornarem meus dias mais felizes e por tudo que vocês me ensinaram.

Babi e Carol (já chegaram os discos voadores!), Edson (sushizinho da tia Nani), Bruna-Pirrolina (minha pequena proteína), Noelia (e seu derretido miojo argentino), Camila-Tokinho (e sua discreta risadinha), Pedro Ivo - Fissura (Nande! que pelota!), Alexandre Mineirin (o sobrinho do Tio Sam), todos da arca e amigos da graduação (**certamente mais nomes deveriam ser citados aqui**): minha família de Botucatu, minha alegria e o meu apoio em muitos e muitos momentos.

À equipe do professor Dr. Wagner Vilegas (UNESP-Araraquara) pela extração e análise fitoquímica dos compostos utilizados em nosso laboratório.

À Dra. Monica Lopes-Ferreira (CAT- Instituto Butantan) pelo valioso fornecimento do veneno de jararaca, bem como os experimentos de microscopia intravital.

À equipe da prof. Dra. Roberta Coelho (UFMS) pelo fornecimento do extrato de *Rhamnidium elaeocarpum*.

À professora Dra. Iracilda e sua aluna Camila (UNESP-Araraquara) que possibilitou as valiosas quantificações de citocinas desse trabalho.

Ao professor Dr. Sérgio Felisbino (UNESP –Botucatu, Depto. Morfologia) por abrir as portas do seu laboratório, pela cooperação e pela oportunidade de aprendizado da zimografia.

À Flávia Delella, por ter me recebido tão bem, pela sua paciência, amizade, dedicação e esforços na realização dos experimentos da zimografia. E ao Justulin que me ajudou na padronização enquanto a Flávia estava em viagem. Muito, muito obrigada !!

Ao professor Dr. Adair Roberto dos Santos (UFSC), por seu valioso conhecimento e sugestões na área de nocicepção e também por me receber em seu laboratório.

À Leidiane, Daniel e Maira Cola (UFSC) pela atenção, gentileza e hospitalidade em me receber quando estive em Florianópolis.

Aos funcionários do departamento de fisiologia (Unesp-Botucatu), Janete, Seu Júnior e à sessão de pós-graduação, meu muito obrigada.

Ao Biota-Fapesp pelo apoio financeiro.

I. RESUMO .....	9
II. INTRODUÇÃO .....	10
III. OBJETIVO .....	21
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
IV.1. Plantas utilizadas .....	21
IV.2. Animais.....	21
IV. 3. Veneno.....	22
IV. 4. Dosagem de proteínas presentes no veneno e na derme.....	22
IV.5. Edema .....	22
IV.6. Nocicepção .....	23
IV.7. Hemorragia, Necrose e Metaloproteinases de Matriz .....	25
IV.8 Quantificação de Citocinas <i>in vitro</i> .....	27
IV.9 Microscopia Intravital .....	31
IV.10. Análise Estatística .....	31
V. RESULTADOS.....	32
V. 1 <i>Byrsonima crassa</i> .....	35
V.2 <i>Mouriri pusa</i> .....	36
V.3 <i>Rhamnidium elaeocarpum</i> .....	37
V.3 <i>Davilla elliptica</i> .....	47
VI. DISCUSSÃO .....	51
VII. CONCLUSÃO.....	72
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73
ANEXO 1 .....	87
ANEXO 2 .....	102



## I. RESUMO

Acidente ofídico é um sério problema de saúde pública no Brasil. Embora a neutralização do efeito tóxico sistêmico seja alcançada pela administração do soro antiofídico, a injúria tecidual local não é evitada. Em muitos países, plantas medicinais são tradicionalmente usadas no tratamento de envenenamento por picada de cobra. Nesse trabalho, foi investigado o potencial efeito anti-inflamatório de algumas espécies vegetais da flora brasileira que apresentaram capacidade de neutralização total contra a hemorragia causada por *Bothrops jararaca* como: *Byrsonima crassa* Niedenzu, *Mouriri pusa* Gardn., *Rhamnidium elaeocarpum* Reiss. e *Davilla elliptica* St. Hill. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram uma importante ação anti-inflamatória de algumas espécies, com destaque para o extrato metanólico das cascas de *R. elaeocarpum*, que inibiu a produção de NO e TNF- $\alpha$  *in vitro*. Essa espécie possui ainda ação anti-nociceptiva modulada pelos receptores serotoninérgicos e opióides. Já o extrato metanólico das folhas de *B. crassa* não apresentou atividade anti-nociceptiva na indução da nocicepção no modelo da formalina. O extrato metanólico das folhas de *M. pusa* possui ação anti-nociceptiva tanto na dor neurogênica como na dor inflamatória na dose de 500 mg/kg (p.o). Extratos metanólicos de *B. crassa* (folhas), *R. elaeocarpum* (cascas) e *D. elliptica* apresentaram importante ação anti-edematogênica nas doses de 15.62 mg/kg (i.p) e 31.24 mg/kg (i.p). Adicionalmente, a fração de taninos de *D. elliptica* (30 mg/kg, i.p) foram capazes de diminuir em 50 % o rolamento de leucócitos em vasos (‘‘rolling’’) durante o processo inflamatório induzido pela administração tópica de LPS. A fração de taninos e o extrato de *D. elliptica* diminuíram da atividade de MMP-9 ativa frente a inoculação de veneno de *B. jararaca* e apresentaram efeito anti-edematogênico no modelo da indução de edema pela carragenina (efeitos não observados com a fração de flavonóides). Esses resultados sugerem que os

taninos possuem um papel fundamental na atividade anti-inflamatória e anti-hemorrágica desses extratos e que essas espécies vegetais poderão ser úteis no desenvolvimento de anti-inflamatórios e no tratamento de indivíduos que sofreram envenenamento botrópico.

## **II. INTRODUÇÃO**

### **II.1 Epidemiologia**

Envenenamento por picada de cobra é um problema mundial e atinge especialmente as regiões tropicais. A maior parte dos casos no Ocidente está relacionado com a família *Viperidae*, sub-família *Crotalinae*. Na América do Sul, *Crotalinae* é representada pelo gênero *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* (Kerrigan, 1991).

No Brasil, aproximadamente 20000 casos de envenenamento ofídico são registrados anualmente (Araújo e cols., 2003) sendo que a maioria dos registros dos acidentes ofídicos ocorre em homens jovens, residentes em áreas rurais e de ocupação agrícola (Caiaffa e cols., 1994).

No território nacional, até o ano de 1994, foram catalogadas 256 espécies de serpentes, sendo 69 venenosas e 187 não-venenosas. Dentre as 69 espécies venenosas, 32 pertencem ao gênero *Bothrops*. O gênero *Bothrops* é responsável por 90% dos acidentes, (Araújo e cols., 2003) e a espécie *Bothrops jararaca* é responsável pelo maior número de acidentes ofídicos, por ser mais abundante e viver em lugares comuns ao homem (Barravieira, 1994).

### **II. 2. Biologia da *Bothrops jararaca***

Esta espécie habita preferencialmente ambientes úmidos como matas, áreas cultivadas e local de proliferação de roedores (paióis, celeiros, depósito de ração), nas zonas rurais. Estes animais possuem hábitos noturnos e quando se sentem ameaçados

atacam em silêncio. A sua distribuição geográfica é ampla no território nacional, sendo encontradas tanto nas ilhas do litoral como em regiões altas e frias (Barravieira, 1994).

A *Bothrops jararaca* é uma serpente classificada em uma série chamada de solenóglifa, cuja classificação baseia-se fundamentalmente na dentição e na forma de inoculação do veneno. As características dessa série são: um par de dentes muito desenvolvidos, cada um deles providos de um canal central que se comunica com o canal excretor da glândula de veneno. Esses dentes são móveis e quando estão em repouso, ficam deitados e voltados para parte posterior dentro de larga prega mucosa. Os demais dentes são menores e maciços e outra característica importante é a presença da fosseta loreal (um orifício) entre o olho e a narina (Barravieira, 1994).

### **II. 3. Veneno de *Bothrops jararaca* e inflamação**

O veneno das serpentes peçonhentas apresenta características que variam entre as diferentes espécies, idade, distribuição geográfica e caráter individual. Os filhotes apresentam maior atividade pró-coagulante e menor atividade proteolítica (dor e edema podem ser discretos) (Barravieira, 1994).

Menezes e cols., (2006) constataram diferenças na atividade gelatinolítica e degradação de fibrinogênio entre machos e fêmeas de *B. jararaca*. Fêmeas apresentam maior capacidade de degradação de fibrinogênio. Bandas gelatinolíticas de intensidade variável de 100 kDa estão presentes apenas nas análises de zimografia de veneno de machos, no entanto os machos não apresentam bandas entre 50 kDa e 25 kDa cujo padrão está presente no veneno da fêmeas.

Cerca de 90% a 95% do peso seco de veneno consiste de proteínas e algumas das frações protéicas são biologicamente mais importantes do que as não-protéicas.

O veneno de *Bothrops* induz reações locais e sistêmicas. Dentre as reações locais (as quais não são neutralizadas pelo soro anti-ofídico) constam: edema, dor, hemorragia e

necrose. A reação sistêmica consiste principalmente de distúrbios na coagulação sanguínea da vítima (Rosenfeld, 1971).

As proteinases são responsáveis pela hemorragia local, entre elas, as metaloproteinases dependentes de zinco (algumas chamadas de fatores hemorrágicos ou hemorraginas) (Bjarnason e Fox, 1994). Metaloproteinases ofídicas (SVMP) são membros da família M12 das metaloproteinases e da subfamília das enzimas chamadas reprotinas, as quais estão incluídas as "desintegrina e metaloproteinases" (ADAMs). Elas são secretadas como pré-pró-enzimas, ativadas proteoliticamente pela clivagem da porção N-terminal do pró-peptídeo e contém um regulador/modulador que é responsável pela interação da matriz extracelular com a integrina (Black e White, 1998).

A principal atividade das SVMP é a degradação da membrana basal dos vasos através da hidrólise de peptídeos e conseqüentemente, perda da integridade da parede vascular (Kamiguti e cols., 1996). Estas enzimas degradam fibrinogênio/fibrina e hidrolisam as proteínas da matriz tais como colágeno IV, laminina e fibronectina (Baramova e cols., 1989; Maruyama e cols., 1992).

A patogênese da hemorragia local tem sido investigada frente a uma variedade de metaloproteinases hemorrágicas. Na maioria dos casos, seus efeitos são estudados em células endoteliais dos capilares sanguíneos, que se tornam rapidamente afetadas com o aparecimento de "gaps" (lacunas intercelulares), no qual os eritrócitos e outros componentes sanguíneos escapam para o espaço intersticial após a injeção de metaloproteinase isolada. Observações ultra-estruturais mostram o aparecimento de vesículas pinocíticas, destacamento de algumas células endoteliais da lâmina basal e pequenas projeções citoplasmáticas no lúmen dos vasos. Como conseqüências desse processo de perda citoplasmática, as células endoteliais se tornam muito finas, ocorre o

desenvolvimento de "gaps", as mitocôndrias se tornam inchadas e o núcleo se apresenta picnótico (Moreira e cols., 1994).

A estrutura primária das metaloproteinases se mostra conservada no domínio da metaloproteinase que é uma seqüência ao redor do sítio que se liga ao zinco. As SVMP são divididas em 4 classes (PI, PII, PIII e PIV) baseadas em seus domínios; PI = domínio metaloproteinase, PII = domínios metaloproteinase + desintegrina-like, PIII = domínios metaloproteinase + desintegrina-like + cisteína-like, PIV = domínios metaloproteinase + desintegrina-like + cisteína-like + lectina-like (Bjarson e Fox, 1994). Os venenos viperídeos geralmente apresentam metaloproteinases PI, PII e PIII. A ausência ou a presença de certos domínios não denota necessariamente a capacidade ou potência hemorrágica do veneno. Porém, as PIII são as metaloproteinases ofídicas mais potentes dessas 3 classes. Existem PIII não hemorrágicas, mas que atuam como ativadoras de pró-trombina (Hite e cols., 1994).

Os pesos moleculares das metaloproteinases são variáveis. Bothropasina, uma metaloproteinase hemorrágica e mionecrótica isolada de *B. jararaca* de 48 kDa, da classe PIII, contém 600 aminoácidos formando uma estrutura de multidomínios: peptídeo sinal seguido de pró, metaloproteinase, desintegrina-like, domínio rico em cisteína (Assakura e cols., 2003).

A jararagina, outra SVMP da classe PIII, consiste de cerca de 5 a 12% do peso seco de veneno (Kamiguti e cols., 1991), compromete a hemostasia, atuando na interação colágeno-plaqueta, clivando a subunidade  $\beta_1$  e se ligando a subunidade  $\alpha_2$  do receptor de colágeno na plaqueta, a  $\alpha_2\beta_1$  integrina. Essa integrina participa da integridade das células endoteliais. Sendo assim, a atividade da jararagina sobre a integrina prejudica a adesão das células endoteliais. A SVMP da classe PIII, através do seu domínio "desintegrina-like", provoca a separação das células endoteliais da membrana basal e, por consequência da falta

de interação entre a célula endotelial e a lâmina basal, ocorre apoptose (Takeya e cols., 1993; Escalante e cols., 2003). A jararagina hidrolisa o fibrinogênio, preferencialmente a cadeia  $\alpha$  (por isso chamada de  $\alpha$ -fibrinogenase), e o fator de Von Willebrand (vWF) necessário para a ativação plaquetária (Kamiguti e cols., 1996). Essa SVMP também é responsável por uma intensa resposta pró-inflamatória, caracterizada por um acúmulo de leucócitos no local da injeção (Costa e cols., 2002).

A ação proteolítica na matrix extracelular no envenenamento botrópico não é provocada somente pelas metaloproteinases contidas no veneno da cobra (SVMP) mas também pelas metaloproteinases endógenas da matriz extracelular (MMPs) ativadas ou liberadas no tecido como consequência da reação inflamatória. O veneno possui ação direta nos componentes da matrix extracelular provocando uma inflamação tecidual que envolve a expressão/liberação de MMPs (Rucavado e cols., 1998).

As MMPs possuem a função primária de regular a composição da matriz extracelular, regulam a reparação tecidual no processo de cicatrização, desenvolvimento embrionário e facilitam a migração celular durante a inflamação (Milner e Cawston, 2005; Newby, 2005). As MMPs constituem um grupo de mais de 20 enzimas com a habilidade comum de degradar componentes da matriz extracelular. Elas são sintetizadas como pré-pro-enzimas por uma variedade de células envolvidas no processo inflamatório. Fibroblastos, células endoteliais, macrófagos residentes constituem a principal fonte de MMPs durante as primeiras horas do envenenamento botrópico (Saravia-Otten, 2004; Shapiro, 1998; Nagase, 1999; Parks, 1999).

As metaloproteinases de matrix (MMPs) são controladas pelas TIMPs (inibidores endógenos da metaloproteinases de matriz). O equilíbrio dinâmico entre a atividade das MMPs e TIMPs é crucial para muitos processos de manutenção e desenvolvimento normal

dos vertebrados. Entretanto, qualquer alteração entre o balanço das TIMPs e MMPs pode resultar em conseqüências sistêmicas e patológicas (Vu e Werb, 2000).

A super expressão das MMPs tem sido implicadas na progressão tumoral, metástase, aterosclerose, aneurisma aórtico, síndrome respiratória aguda, periodontite e desordens auto-imunes (Murphy e Nagase, 2008).

Estudos com venenos e MMPs são ferramentas terapêuticas úteis para o tratamento de câncer, artrite, metástase e angiogênese. Além disso, a inibição *in situ* de MMPs ou SVMP, através da injeção local de inibidores de metaloproteinases, ameniza várias reações locais do veneno botrópico tais como hemorragia, mionecrose, danos de microvasos, bolhas e dermonecrose (Teixeira e cols., 2009).

A classificação das MMPs varia de acordo com o seu substrato: as colagenases, as gelatinases, estromelinas e as matrilisinas. As gelatinases MMP-2 (gelatinases A de 72 kDa) e MMP-9 (gelatinase B, de 92 kDa) estão associadas com a degradação de fibronectina, laminina, proteínas de ancoragem e os colágenos do tipo IV, V e XI (Aimes e Quigley, 2005; Patterson e cols., 2001). Elas possuem 3 domínios de fibronectina tipo II inseridos no domínio catalítico que se liga a gelatina, colágeno e laminina. Ambas são capazes de degradar colágeno IV, o maior componente estrutural da membrana basal (Sternlicht, 2001), no entanto, MMP-2 degrada colágeno tipo I,II, III de maneira similar as colagenases, o que não ocorre com MMP-9 (Patterson et al., 2001)

A *up-regulation* da expressão de MMPs ocorre através das citocinas pró-inflamatórias produzidas em diversos tecidos e células como condrócitos e fibroblastos (Domeij e cols., 2002; Koshy e cols., 2002).

A regulação das MMPs podem ocorrer de 3 maneiras: 1) gene de transcrição (MT-MMP) produzindo zimógenos latentes de pró-MMP 2) através da ativação de pró-MMPs, 3) TIMPs endógenas (Clutterbuck e cols., 2008).

A citocina IL-1 $\beta$  estimula a transcrição de MMPs, e as MMP-2 e MMP-9 são capazes de degradar IL-1 $\beta$ , indicando a retroalimentação negativa na regulação da homeostasia (Tsuzaki e cols., 2003 ; Ito e cols., 1996).

Malucelli e Mariano (1980) sugerem que as SVMP induzem inflamação local que libera mediadores inflamatórios, levando a contração da célula endotelial e abrindo um espaço entre as junções intercelulares por onde escapa os eritrócitos e o plasma (Collins, 1999).

Moura-da-Silva e cols. (1996), reportaram duas SVMP que liberam fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) pelo seu precursor, o pró-TNF- $\alpha$ , e sugeriram que a patogênese da lesão tecidual local não é somente desencadeada pela ação direta dessas proteases, mas também por vias secundárias de ativação. A lesão na parede vascular inicia uma resposta através de componentes e mecanismos que objetivam a reestruturação vascular. Esses mecanismos incluem liberação de agentes vasoativos, migração de plaquetas e formação ou ativação de fatores de coagulação. Quando alguns desses componentes hemostáticos são alterados, o processo hemorrágico se inicia (Kamiguti e cols., 1986). Além disso, as metaloproteinases propiciam a rápida disseminação do veneno da área picada para a circulação sistêmica. Graças à degradação da matriz extracelular e da membrana basal vascular, os componentes do veneno são facilmente difundidos pelos tecidos (Anai e cols., 2002; Farsky e cols., 1999). Essas enzimas estão envolvidas direta ou indiretamente na formação de edema, atividade miotóxica e coagulopatia (Bjarnason e Fox, 1994; Gonçalves e Chudzinski-Tavassi, 2004).

A SVMP jararagina aumenta a expressão de RNAm de citocinas como TNF- $\alpha$  , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Zamuner e cols., 2005; Clissa e cols., 2001). Estudos recentes investigam a contribuição da resposta inflamatória dessa metaloproteinase no desenvolvimento de



necrose. SVMP jararagina é capaz de converter TNF- $\alpha$  assim como a TACE (enzima conversora de TNF-  $\alpha$ ) que converte TNF- $\alpha$  a partir de um precursor de membrana (Moura-da-Silva e cols., 1996). TNF- $\alpha$  e IL-6 contribuem para a necrose tecidual local e a indução de necrose pela metaloproteinase jararagina é abolida em ratos sem os receptores TNFR1, TNFR2 (Laing e cols., 2003).

Petricевич e cols., (2000) encontraram associação entre altos níveis circulantes de TNF- $\alpha$ , hipotermia, hipotensão e letalidade após injeção intraperitoneal do veneno de *B. jararaca*. Elevados níveis de TNF- $\alpha$  podem induzir hipotensão, acidose metabólica, infarto hemorrágico do trato gastrointestinal (Beutler e Cerami, 1988). Houve um paralelo entre aumento de TNF- $\alpha$  e IL-1 sugerindo que estas citocinas podem agir sinergicamente para induzir choque e outras alterações sistêmicas que conduzem a morte. Elevação dos níveis de IL-6, um dos maiores mediadores da inflamação, precedeu o desaparecimento dos níveis de TNF- $\alpha$ , observado 12 horas depois da injeção de veneno (Houssiau e cols., 1988).

A resposta inflamatória induzida pelo veneno de *B. jararaca* é caracterizada pela formação de exsudação do plasma e infiltrado celular e envolve a participação de mediadores endógenos (Trebien e Calixto, 1989; Dias da Silva e cols., 1995). O processo edematogênico é desencadeado por fenômenos multifatoriais sendo que fatores hemorrágicos possuem papel importante (Gutierrez e Lomonte, 1989). O edema induzido por *B. jararaca* resulta da ativação de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  (Trebien e Calixto, 1989) e pelos metabólitos do ácido araquidônico formados pela COX-2 (ciclooxigenase induzida) (Moreira e cols., 2007). Injeção intraperitoneal do veneno induz a liberação de PGD<sub>2</sub> (em 30 minutos) e PGE<sub>2</sub> (de 3h até 12 h). Veneno de *B. jararaca* promove um *up regulation* na expressão de COX-2 mas não alterou a expressão da COX-1 (ciclooxigenase constitutiva) sugerindo que a expressão de COX-2 favorece maior substrato para a síntese de PGs. Portanto, os resultados sugerem que COX-2 é uma enzima crítica para a produção

de prostaglandinas nos períodos tardios no envenenamento por *B. jararaca* (Moreira e cols., 2007).

PGE2 é conhecida como um mediador que causa hiperalgesia, vasodilatação, extravasamento de fluído para o tecido adjacente (James e cols., 2001). No caso de picada de cobra, PGE2 é um mediador crítico para a formação de edema local e dor, provavelmente por ação sinérgica com outros mediadores, tais como histamina e bradicinina. A PGE2 exerce a supressão da produção das citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$ , impede a fagocitose pelos macrófagos e a proliferação das células T. A PGD2 está envolvida no processo inflamatório ao promover vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. De acordo com Moreira e cols. (2007) a rápida liberação de PGD2 no processo inflamatório sugere que ela seja um mediador da formação do edema inicial induzido pelo veneno de *B. jararaca* e que a ausência da expressão de COX-1 não exclui a possibilidade do veneno estimular direta ou indiretamente a atividade enzimática de COX-1.

Além de leucotrienos, prostaglandinas e fatores ativadores de plaqueta, outros mediadores são responsáveis pela hiperalgesia de *B. jararaca* (Teixeira e cols., 1994).

Bonavita e cols. (2006) investigaram o papel dos mastócitos, histamina e serotonina na resposta nociceptiva causada pelo veneno e constataram que o veneno possui habilidade de estimular os mastócitos por mecanismos dependentes das metaloproteinases. Bradicininina, histamina e serotonina são mediadores na hiperalgesia e a resposta nociceptiva ao veneno foi alterada e bloqueada por um antagonista de receptor B2, pelos antagonistas de receptores 5HT1, 5HT2 e 5HT7 (metisergida) e também pelo antagonista H1 (meclizina). Por outro lado, o antagonista de receptor B1 não modificou a resposta hiperalgésica ao veneno de *B. jararaca* (Chacur e cols., 2002).

O corno dorsal espinhal é a localização da primeira sinapse na via da dor, sendo assim, a chave da regulação da transmissão da nocicepção (Heinricher e cols. 2009). A via supraespinhal (ou via descendente) do controle da nocicepção se origina em muitas regiões cerebrais, tais como substância periarquedutal cinzenta (PAG), núcleos medianos da rafe e medula ventromedial rostral (RVM) e possuem papel crítico na determinação da dor crônica e aguda (Heinricher e cols., 2009). O sistema PAG-RVM, importante no comportamento e nos aspectos terapêuticos da dor, é alvo de alguns agentes analgésicos como agentes opióides, inibidores de ciclooxigenase e canabinóides (Hohmann e cols., 2005; Leith e cols., 2007).

Embora exista tratamento contra casos graves de acidentes ofídicos, a soroterapia não é eficaz na reversão de sintomas locais tais como, desenvolvimento de lesões hemorrágicas, aumento da permeabilidade vascular (edema), dor e mionecrose (Battelino e cols., 2003).

Produtos naturais obtidos de plantas e animais são fontes importantes na neutralização das substâncias do veneno de *Bothrops* (Martz, 1992). A validação experimental desse uso pode facilitar e contribuir para a eficácia e segurança no desenvolvimento de agentes fitoterápicos (Elisabetsky, 1991).

Apesar da atividade anti-ofídica não ter sido objetivo inicial do projeto temático Biota/Fapesp, o banco de informações farmacológicas e fitoquímicos disponíveis a partir deste projeto, instigou-nos a desafiar alguns desses extratos e frações frente a ação hemorrágica do veneno de *B. jararaca*.

Dados obtidos no subprojeto Biota/Fapesp n° 0604944-0 demonstram que os extratos metanólicos de *Mouriri pusa*, *Byrsonima crassa*, *Davilla elliptica* e *Rhamnidium elaeocarpum* apresentaram capacidade de neutralização total da hemorragia induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca*. Estudos fitoquímicos prévios desses extratos demonstram

que essas espécies vegetais são predominantemente ricas em flavonóides e taninos, duas classes de compostos fenólicos muito freqüentes em plantas medicinais (Sannomiya e cols., 2004; Calvo e cols., 2002; Andreo e cols., 2006; Sommerfeld e cols., 2006).

Já existem relatos para o taninos de suas propriedades anti-tumoral, anti-viral e inibidora da enzimas que degradam o tecido conjuntivo (Hatano e cols., 1999; Yang e cols., 2000; Isenburg e cols., 2004) e existem relatos do efeito neutralizador de hemorragia no envenenamento ofídico (Borges e cols., 2005). Os flavonóides possuem várias características importantes mas duas delas se destacaram: a possibilidade de quelar metais de transição (diminuindo assim a atividade enzimática das metaloproteinases hemorrágicas dependentes de Zn) e a capacidade de inibir uma série de enzimas que participam do processo inflamatório (Kwon e cols., 2005).

O flavonóide antocianina tem sido associado com a estabilidade do colágeno, protegendo a matriz extracelular durante o processo inflamatório contra a degradação (Teixeira, 2002). O flavonóide quercetina é efetivo inibidor da liberação de histamina induzida por vários agentes, também inibe a produção de óxido nítrico e expressão de iNOS, além de promover down-regulation de COX-2 em macrófagos (Middleton e Drzewiecki 1984).

Em vista das propriedades farmacológicas de compostos fenólicos, como flavonóides e taninos, no processo inflamatório e nociceptivo e a sua interação com substâncias envolvidas na hemorragia e degradação de tecido conjuntivo no envenenamento de *B. jararaca*, este trabalho propôs a estudar os possíveis efeitos anti-inflamatórios dos extratos e frações enriquecidas de flavonóides e taninos do subprojeto Biota/Fapesp nº 0604944-0 e avaliar o mecanismo de ação envolvidos no efeito anti-hemorrágico contra o veneno de *B. jararaca*.

### III. OBJETIVO

Avaliar o potencial efeito anti-inflamatório dos extratos e frações das espécies vegetais que possuem capacidade de neutralização total contra a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca* e investigar o possível efeito dessas espécies vegetais e suas respectivas frações na atividade das metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) ativadas no tecido em consequência do envenenamento de *B. jararaca*.

### IV. MATERIAL E MÉTODOS

#### IV.1. Plantas utilizadas

As plantas alvo desse estudo foram aquelas pré-selecionadas a partir de uma triagem realizada no subprojeto Biota/Fapesp nº 0604944-0. Nesta triagem, foram selecionadas os seguintes extratos capazes de neutralizar totalmente a hemorragia induzida por *B. jararaca*: extratos metanólicos de *Mouriri pusa* (folhas), *Byrsonima crassa* (folhas), *Rhamnidium elaeocarpum* (cascas) e *Davilla elliptica* (folhas). Esses extratos foram fracionados (fração enriquecida de taninos e/ou flavonóides) para o estudo da atividade específica de cada classe de substâncias químicas. Esta etapa de fracionamento foi realizada no laboratório de Fitoquímica do Instituto de Química Unesp-Araraquara sob orientação do Prof. Dr. Wagner Vilegas.

#### IV.2. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos e ratos Wistar machos provenientes do Biotério Central, UNESP-Botucatu. Durante o estudo, os animais foram mantidos no Biotério setorial do departamento de Fisiologia até a experimentação e durante sua permanência os animais receberam ração e água *ad libidum*, em ciclo claro e escuro e circulação de ar na temperatura de 20 a 23 °C. Os protocolos experimentais foram

previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal do Instituto de Biociências, Unesp Botucatu.

#### **IV. 3. Veneno**

O veneno liofilizado de *B. jararaca* fornecido pelo Instituto Butantan, São Paulo, Brasil foi mantido em freezer a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização.

#### **IV. 4. Dosagem de proteínas presentes no veneno e na derme**

A concentração de proteínas no veneno de *Bothrops jararaca* foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976), usando como soro a albumina bovina. A quantidade de veneno foi expressa pelo seu conteúdo protéico (mg). Para a realização da técnica de zimografia, a quantidade de proteínas presentes na derme dos camundongos foi quantificada pela mesma metodologia.

#### **IV.5. Edema**

##### *Indução de edema de pata pela carragenina*

Com a finalidade de avaliar possível atividade anti-edematogênica desses extratos e frações foi utilizado o método de indução de edema de pata em ratos Wistar pela carragenina (Levy, 1969; Henriques e cols., 1987). Os animais (n=8) foram divididos em grupos: salina, Piroxicam 30 mg/Kg (p.o) e a substância teste (extratos ou frações). Os tratamentos (substância teste ou veículo) foram administrados pela via oral (1:30h) ou pela via intraperitoneal (1 h) antes da indução do edema pela injeção subcutânea de 100 µl/pata de carragenina (1%) na região subplantar da pata posterior direita e 100 µl/ pata de salina estéril na pata esquerda. Nos tempos determinados (1, 2, 3 e 4 hora após o tratamento com o agente flogístico) fez-se a medição de ambas as patas em pletismômetro (Ugo Basile) e o resultado foi expresso pela diferença de volume deslocado (ml) entre as patas submetidas a administração de carragenina e salina.

#### IV.6. Nocicepção

*Teste da formalina* (Hunskaar e Hole, 1987 com modificações).

O modelo mais específico de caracterização da dor aguda é o teste de formalina. Este modelo possibilita a distinção de duas respostas à dor: 1) Fase inicial: inicia-se logo após a administração da formalina e desaparece após aproximadamente 5 minutos. É uma fase indicativa de dor neurogênica (mecanismo central), que sofre ação principalmente de drogas narcóticas (opioides). 2) Fase tardia: inicia-se entre 15-30min após administração de formalina e permanece até cerca de 60min depois da administração do agente flogístico. Esta fase é indicativa de dor inflamatória, e sofre ação de drogas periféricas como as AINEs e narcóticas. Neste modelo foi utilizada uma câmara de observação, que consiste em um cilindro de vidro com 20cm de diâmetro. Cada animal foi previamente colocado na câmara por 30 minutos antes do tratamento para permitir aclimatação com o novo ambiente. Os camundongos foram pré-tratados com salina (NaCl a 0,9%) *p.o.*, piroxicam (30 mg/kg, *p.o.*) e os extratos na dose intermerdiária de 250 mg/kg (*p.o.*). Após uma hora dos tratamentos, foi então administrada 20 µl de solução de formalina 2,5% em tampão fosfato (PBS), administrada via intraplantar na pata traseira direita. Logo após a injeção de formalina, os animais foram observados individualmente na câmara durante 30 minutos. A quantidade de tempo que o animal lambeu sua pata foi registrado e considerado como indicativo de dor.

*Participação do óxido nítrico na anti-nocicepção* (Santos e cols., 1999 e Santos e cols., 2005 com modificações):

Em função do importante papel do óxido nítrico na dor e inflamação, avaliou-se a possível participação do óxido nítrico na anti-nocicepção dos extratos e frações. Camundongos foram pré-tratados com l-arginina (substrato da síntese de NO) na dose de

500 mg/kg (i.p) 30 minutos antes dos tratamentos orais descrito anteriormente. Como um parâmetro do controle da reversão da anti-nocicepção da substância isolada, utilizou-se L-NAME (inibidor da síntese de NO) 65 mg/kg, administrados via intraperitoneal 30 minutos após a injeção de l-arginina.

*Participação do sistema serotoninérgico na anti-nocicepção (Santos e cols., 1999 e Santos e cols., 2005 com modificações):*

Para avaliar a participação do sistema serotoninérgico na atividade anti-nociceptiva dos extratos, camundongos foram pré-tratados com PCPA (inibidor da síntese de serotonina) na dose de 100 mg/kg, administrados via intraperitoneal, durante 4 dias consecutivos antes da realização do teste da formalina descrito anteriormente. Para investigar a participação dos receptores serotoninérgicos mais específicos, os animais foram pré-tratados pela via intraperitoneal com WAY100635 – 0,1 mg/kg (antagonista 5-HT<sub>1A</sub>) - 0,1 mg/kg, cetanserina - 1 mg/kg (antagonista 5-HT<sub>2A</sub>) , ondansetron - 0,5 mg/kg (antagonista 5-HT<sub>3A</sub>) 30 minutos antes do tratamento oral do experimento da formalina como descrito anteriormente.

*Participação do sistema opióide na anti-nocicepção (Santos e cols., 1999 e Santos e cols., 2005 com modificações):*

Para avaliar a possibilidade da participação do sistema opióide no efeito anti-nociceptivo dos extratos, camundongos foram pré-tratados pela via intraperitoneal com veículo (salina) ou naloxona (um antagonista não-seletivo de receptor opióide) na dose de 1 mg/kg e 30 minutos depois os animais receberam o extrato (p.o), morfina (5 mg/kg, s.c) ou salina (10 ml/kg, p.o).



#### IV.7. Hemorragia, Necrose e Metaloproteinasas de Matriz

Os ensaios de indução de dermonecrose pelo veneno de *Bothrops jararaca* e a quantificação das MMPs extraídas das dermes foram baseados no método descrito por Saravia-Otten e cols. (2004), com modificações.

Para a avaliação do efeito dos extratos e frações das espécies vegetais na atividade das metaloproteinasas endógenas da derme, os camundongos foram divididos em 9 grupos que receberam injeção intradérmica de:

- PBS (0,1 ml por animal)
- veneno (35 µg/animal em 0,1 ml de PBS)
- veneno + extrato (35 µg de veneno incubados com 700 µg de extrato em 0,1 ml de PBS/animal)
- veneno + fração enriquecida de taninos (35 µg de veneno incubados com 700 µg de fração enriquecida de taninos em 0,1 ml de PBS/animal)
- veneno + fração enriquecida de flavonóides (35 µg de veneno incubados com 700 µg de fração enriquecida de flavonóides em 0,1 ml de PBS/animal)
- 700 µg de fração enriquecida de taninos em 0,1 ml de PBS/animal
- 700 µg de fração enriquecida de flavonóides em 0,1 ml de PBS/animal
- 700 µg de extrato em 0,1 ml de PBS/animal
- 700 µg de extrato em 0,5 ml de PBS/animal, 1 hora após a injeção de 35 µg de veneno em 0,5 ml/animal

Após 3 dias, os animais foram sacrificados e suas dermes coletadas. Foi feito um "pool" dos respectivos animais de cada grupo retirando-se uma alíquota de 25 µg de proteína de derme de cada animal e desse pool foram retirados 25 µg de proteína de derme para a aplicação no gel.

Proteínas extraídas da derme (25  $\mu\text{g}$  por linha) foram submetidas à eletroforese sob condições não redutoras (100V a  $4^{\circ}\text{C}$ ) em gel de poliacrilamida a 8% contendo 0,1% de gelatina (colágeno desnaturado). Após a eletroforese, os géis foram lavados em Triton X-100 à 2,5% por duas vezes durante 15 minutos e, em seguida, em tampão Tris-HCl 50Mm pH 8,4 por duas vezes durante 5 minutos. Posteriormente, os géis foram incubados por 16 horas, "over night", a  $37^{\circ}\text{C}$  no mesmo tampão contendo 5 Mm de  $\text{CaCl}_2$  e 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$ . Após a incubação, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue à 0,25%. Áreas de proteólise foram evidenciadas como bandas claras contra um fundo azul escuro.

As bandas obtidas na zimografia foram digitalizadas, convertidas em bandas escuras sobre um fundo claro e analisadas por densitometria. A atividade gelatinolítica das bandas das MMPs das dermes dos animais submetidos aos tratamentos com veneno, extrato, frações e veneno + extrato/ou frações foi analisada obtendo-se a densidade óptica integrada (IOD) das bandas utilizando-se Image Master VDS versão 3.0 acoplado ao aparelho Image Master VDS (Pharmacia Biotech). Os valores foram expressos em unidade de aumento do IOD dos grupos tratados com veneno e/ou extratos e frações em relação ao IOD do grupo tratado apenas com PBS.

#### **IV.8 Quantificação de Citocinas *in vitro***

O ensaio imunológico *in vitro* para a determinação de NO e TNF- $\alpha$  seguiu a metodologia de Carli e cols., (2009).

##### *Macrófagos peritoneais*

Camundongos foram previamente estimulados através da inoculação intraperitoneal de 3 ml de solução de tioglicolato de sódio a 3 % (Difco, Brasil), três dias antes da coleta de células. Após esse período, os animais foram mortos em câmara de CO<sub>2</sub>. A coleta do exsudato peritoneal foi realizada em fluxo laminar classe 100 (Veco, Brasil). O líquido peritoneal foi coletado com tampão fosfato PBS pH 7,2, transferido para tubo estéril (Corning Inc.) para lavagem das células, centrifugando-se 3 vezes a 200xg durante 5 minutos em centrífuga (Fanem, Brasil), a temperatura ambiente. Foi descartado o sobrenadante e as células sedimentadas foram ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640-C (Sigma, U.S.A) suplementado com 5 % de soro fetal bovino, 100  $\mu$ l de estreptomicina, 100  $\mu$ l de penicilina e 2 mM de l-glutamina e assim designado como meio completo de RPMI-1640-C. O número de células viáveis foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Alemanha), sendo ajustado a concentração desejada para cada ensaio em meio RPMI-1640-C.

##### *Avaliação da viabilidade celular*

Para o teste de viabilidade celular foi utilizado o método baseado na capacidade das células viáveis em clivar o anel tetrazólico presente no MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2il-2,5-difenil-tetrazolium bromide), pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa formando os cristais de formazana (Mosmann e cols., 1983).

As células foram ressuspensas em RPMI-1640 contendo 5% de soro bovino fetal, 100 UI/ml de penicilina, 100 UI/ml de estreptomicina e 50 Mm de 1-mercaptoetanol

ajustando para a concentração de  $5 \times 10^6$  células/ml. Foi adicionada 100  $\mu$ l de suspensão e 100  $\mu$ l de extrato em cada poço da placa onde os macrófagos peritoneais foram pré-incubados por 24 horas. Além dos testes da viabilidade celular com o extrato, foram realizadas a avaliação da viabilidade das células somente no meio de cultura RPMI-1640-C, no meio de cultura juntamente com 100  $\mu$ l LPS (10  $\mu$ g/ml) e o extrato juntamente com 100  $\mu$ l de LPS (10  $\mu$ g/ml). Após a incubação das células nos meios de cultura com os respectivos tratamentos, o sobrenadante foi descartado e as células aderentes lavadas com PBS e depois foi adicionado 100  $\mu$ l de MTT (0,5 mg/ml) e então incubada com 5 % de CO<sub>2</sub> por 3 horas a 37°C. Após essa incubação, os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com 100  $\mu$ l de isopropanol (Mallinckrodt) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro UV/visível no comprimento de onda de 540 nm, com filtro de referência de 620 nm. A partir dos resultados obtidos com viabilidade celular acima de 50% foram escolhidas as concentrações do extrato a serem utilizadas nos ensaios imunológicos, assegurando desta forma a eficácia dos testes.

#### *Inibição da produção de NO:*

O óxido nítrico, quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura, foi medido pelo espectrofotômetro utilizando o reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0.1% nãfitiletilenediamina e 3% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). As células da cavidade peritoneal dos camundongos foram ressuspensas em RPMI-1640 e ajustadas para  $5 \times 10^6$  células/ml. Um volume de 100  $\mu$ l de suspensão foram colocadas nos pocinhos de uma microplaca de 96 poços e misturadas com 100  $\mu$ l de extrato juntamente com LPS (10  $\mu$ g/ml). Em outras cavidades foram colocadas 200  $\mu$ l de meio RPMI-1640-C juntamente com a suspensão celular (controle negativo). A placa foi então incubada por 24 horas a 37°C, a 5% CO<sub>2</sub>. O LPS foi

usado como controle positivo. Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 50 µl de cada amostra que foram transferidos para outra placa, onde foi adicionado 50 µL do reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0.1% nafitiletilenediamina e 3% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Essa placa foi novamente incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, e absorvância foi medida a 540 nm no leitor de microplaca Elisa Multiskan Ascent Labsystems. Amostras em triplicata foram avaliadas em 4 experimentos e registradas como µmols NO / 5x10<sup>5</sup> células ± S.D., medidas através da curva padrão obtida previamente com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio em meio RPMI-1640 (Green e cols., 1982).

*Obtenção dos sobrenadantes de macrófagos intraperitoneais utilizados para determinação da inibição da produção de TNF-α :*

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos foram utilizados na determinação da inibição da produção de TNF-α. As células peritoneais foram ajustadas a concentração de 5.10<sup>6</sup> células/ml em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning, Inc.). A cada cavidade foi adicionado 1 ml da suspensão celular e as placas foram incubadas por 60 minutos, a 37°C, a 7,5 % CO<sub>2</sub>. Após esta incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagem com o meio de cultura RPMI-1640.

Para a avaliação da inibição da produção de TNF- α foi adicionado as células aderentes 1 ml de extrato e 1 ml de LPS 10 µg/ml. Da mesma forma, 1 ml de LPS a 10 µg/ml + 2 ml de RPMI-1640-C foi utilizado como controle positivo e 3 ml de RPMI-1640-C foi utilizado como controle negativo. A placa foi incubada a 37 °C, a 7,5 % CO<sub>2</sub> por 24 horas e após a incubação, o conteúdo das placas foi transferido para tubos eppendorfs que foram, em seguida, centrifugados a 7800xg durante 10 minutos em centrífuga refrigerada (Hettich, Alemanha) a 4 °C. Após a centrifugação, os sobrenadantes das culturas foram

coletados, aliquotados em tubos eppendorfs e armazenados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da determinação das citocinas através do teste imunoenzimático, ELISA.

*Determinação da citocina TNF-  $\alpha$  :*

A citocina TNF-  $\alpha$  foi quantificada no sobrenadante obtido das culturas de macrófagos através do teste imunoenzimático ELISA de captura para citocina (Pharmigen), de acordo com as instruções do fabricante. As microplacas de poliestireno de 96 cavidades (Corning Inc., NY) foram incubadas com um anticorpo de captura anti-TNF-  $\alpha$  de camundongo, na concentração de  $4\ \mu\text{g/ml}$  ( $100\ \mu\text{l}$  por cavidade) diluído em tampão PBS e incubado "overnight" a temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2 (PBS) contendo 0,05% de tween-20 (PBS-T). Após a lavagem, foram bloqueadas com  $300\ \mu\text{l}$  de BSA a 1% em PBS (PBS/BSA, com 5% de sacarose e 0,5% de azida sódica) a temperatura ambiente por 60 minutos e lavadas três vezes com PBS-T. Foram adicionados a placa  $100\ \mu\text{l}$  da citocina padrão ou sobrenadante das culturas de células peritoneais de camundongos. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 120 minutos e lavadas quatro vezes com PBS/T. Em seguida, foram adicionados  $100\ \mu\text{l/cavidade}$  de anticorpo monoclonal anti-TNF-  $\alpha$  de camundongo marcado com biotina na concentração de  $400\ \text{ng/ml}$  em diluente de reagente (1% BSA, 0,05% de tween 20 em tampão Tris-NaCl). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 120 minutos e lavadas 3 vezes com PBS-T, sendo então adicionados  $100\ \mu\text{l}$  do conjugado peroxidase-streptavidina diluído em PBS/BSA e incubadas novamente a temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse processo, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e  $100\ \mu\text{l}$  do substrato (10 mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 Mm de tetrametilbenzidina (SIGMA) e 1,2 Mm de peróxido de hidrogênio) foram adicionados a cada cavidade. A reação foi interrompida adicionando-se  $50\ \mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N.

A absorvância foi lida a 450 nm em espectrofotômetro UV/visível de microplacas e as concentrações das citocinas foram quantificadas utilizando uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas de TNF- $\alpha$ . Os teste foram realizados em triplicata e os resultados expressos em pg/ml.

#### **IV.9 Microscopia Intravital**

Camundongos machos (18-22g) provenientes do biotério do Instituto Butantan foram divididos em 2 grupos de 5 animais cada. Um grupo recebeu o veículo (5 ml/kg de salina, i.p) e o outro grupo foi tratado com o extrato/e ou fração (30 mg/kg, i.p, dose baseada no experimento de edema de pata). Transcorridos os 60 minutos do tratamento os animais foram antestesiados com pentobarbital (Hypnol Cristália; 50 mg/kg, i.p) e submetidos a cirurgia para a exposição do músculo cremaster. Durante o procedimento, os animais foram mantidos em uma plataforma térmica de temperatura controlada (37°C). O número de leucócitos rolantes (*rolling*) foram contados no tempo 0 (início) e então o LPS (1 $\mu$ g/20 $\mu$ l) foram aplicados topicamente no músculo cremaster. O número de leucócitos na vênula foi registrado a cada 5 minutos em um período de 30 minutos por meio da utilização de um microscópio intravital (Imager A1, Carl-Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera (AxionCam).

#### **IV.10. Análise Estatística**

Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m) dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste a posterior de Dunnett ou de Tukey, com nível de significância mínimo de  $P < 0,05$ . Para comparação entre dois grupos foi realizado o teste t.

## V. RESULTADOS

Na tabela 1 foram expressos os resultados da ação anti-edematogênica dos extratos metanólicos de *Byrsonima crassa*, *Rhamnidium elaeocarpum*, *Davilla elliptica*, *Mouriri pusa* e as frações de taninos e flavonóides de *D. elliptica* e fração de quercetinas  $\alpha$ -O-D-arabinapirosídeo isoladas de *B. crassa*. Os valores indicam a diferença entre a média do controle negativo (salina) e a média do grupo tratado com extrato/ou fração em ml.



**Tabela 1: Efeito anti-edematogênico <sup>#</sup> dos EMeOH de *R. elaeocarpum*, *B. crassa*, *D. elliptica* e *Mouriri pusa* no modelo de indução de edema induzido pela carragenina.**

Tratamento (EMeOH)	via de administração	Dose (mg/kg)	diferença entre as médias do grupo salina e o grupo tratado com extrato/fração (ml)			
			1º hora	2º hora	3º hora	4º hora
<i>B. crassa</i>	i.p	7.81	- 0.30	-0.40	-0.05	-0.48
		15.62	0.56**	1.18**	1.97**	1.30**
		31.24	0.23	0.65	1.27*	1.30*
<i>R. elaeocarpum</i>	p.o	125	0.05	-0.22	0.62	0.57
		250	0.45	0.10	0.69	0.73
		500	-0.10	-0.40	-0.05	0.09
	i.p	7.81	0.37	0.38	0.38	0.50
		15.62	0.68*	1.23**	1.95**	0.93
		31.24	0.80**	0.99**	1.16**	1.41**
<i>D. elliptica</i>	p.o	125	0.08	0.50	0.21	0.18
		250	0.16	0.14	0.54	0.43
		500	0.05	-0.29	-0.12	0.02
	i.p	7.81	0.30	0.37	0.64*	0.01
		15.62	0.63**	1.25**	1.73**	1.07*
		31.24	0.63**	0.69**	1.12**	0.92*

Tratamento	via de administração	dose (mg/kg)	Diferença entre as médias do grupo salina e o grupo tratado com extrato/fração (ml)			
			1º hora	2º hora	3º hora	4º hora
EMeOH <i>M. pusa</i>	i.p	15.62	0.38	0.47	0.37	0.16
Flavonóide quercetina $\alpha$ -O-D-arabinapirosídeo isolados de MeOH de <i>B. crassa</i>	i.p	15.62	0.18	0.61**	0.32	0.26
Fração de taninos de <i>D. elliptica</i>	i.p	7.81	0.17	-0.03	0.28	-0.04
		15.62	0.24*	0.84*	0.90**	0.04
Fração de flavonóides de <i>D. elliptica</i>	i.p	15.62	0.06	0.45	0.39	0.23
Carragenina	i.p	1% (1ml/kg)	-0.06	-0.16	0.04	0.23

# Ação anti-edematogênica do grupo em relação ao seu respectivo grupo controle negativo. Os valores expressam a diferença do volume da pata entre a média do grupo controle positivo (salina) e a média do grupo tratado (em ml). Teste Dunnett \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Os gráficos com seus dados brutos, estatística e evolução temporal foram anexados no final deste relatório (anexo 1).

As doses dos extratos e frações utilizadas foram baseadas na dose máxima de 500 mg/kg, e doses sucessivamente menores foram utilizadas até a ausência do efeito ou seja: 500, 250, 125, 62,5 ; 31,25; 15,62 e 7,81 mg/kg. Optou-se também por utilizar doses menores para a via intraperitoneal e doses maiores para a via oral em decorrência das barreiras a serem transportadas pelo extrato/fração até o alvo. No entanto, não se realizou nenhum teste com a dose de 62,5 mg/kg pois já foram observadas atividades a partir da dose de 15,62 mg/kg, i.p.

### V. 1 *Byrsonima crassa*

O potencial anti-nociceptivo do extrato metanólico das folhas de *Byrsonima crassa* foi avaliado na dose de 250 mg/kg 1 hora antes da injeção de formalina. Não foi observado efeito anti-nociceptivo para ambas as fases (neurogênica e inflamatória), como mostra na tabela 2.

**Tabela 2: Avaliação da ação anti-nociceptiva do extrato metanólico das folhas de *Byrsonima crassa* no modelo de formalina.**

<i>Tratamentos (p.o)</i>	<i>Fase Neurogênica (s)</i>	<i>Fase inflamatória (s)</i>
Salina	103 ± 11.05	262.67 ± 50.04
Piroxicam 30 mg/ kg	93 ± 11.99	105.88 ± 19.48* (60%) <sup>#</sup>
<i>B. crassa</i> 250 mg/kg	96.60 ± 8.47	295 ± 53.28

ANOVA  $F_{(2;18)} = 0,23$  para fase neurogênica e  $F_{(2;18)} = 7,26$  para a fase inflamatória. Teste de Dunnett \* $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos por média ± erro padrão (n=5-8). # porcentagem de inibição da nocicepção com relação ao grupo salina.

Em contrapartida, foi observada uma diferença significativa do edema de pata através da injeção intraperitoneal do extrato metanólico das folhas de *Byrsonima crassa* em todas as horas na dose de 15,62 mg/kg e apenas na terceira e quarta hora na dose de 31,24

mg/kg do extrato após a administração de carragenina. No entanto, o processo edematogênico não foi revertido em nenhuma das horas na menor dose utilizada (tabela 1 e gráficos de 1 e 2 do anexo 1). O edema também foi avaliado 20 horas após a indução, onde foi observado a perda de efeito do extrato (dados não apresentados).

Já a fração de quercetina 3-O- $\alpha$ -D arabinopiranosídeo isolada de *B. crassa* exibiu atividade anti-edematogênica apenas na segunda hora do teste da carragenina (tabela 1 e gráfico 12 do anexo 1).

## V.2 *Mouriri pusa*

O extrato metanólico de *Mouriri pusa* (15,62 mg/kg, i.p) não apresentou atividade anti-edematogênica em nenhum dos tempos de observação após o edema de pata pela carragenina (tabela 1 e gráfico 13 do anexo 1). Porém, apresentou atividade anti-nociceptiva significativa na dose de 500 mg/kg, tanto na dor neurogênica (25%) como na fase inflamatória (46%) (tabela 3).

**Tabela 3: Avaliação da ação anti-nociceptiva do extrato metanólico das folhas de *Mouriri pusa* no modelo da formalina.**

<i>Tratamentos (p.o)</i>	<i>Fase Neurogênica (s)</i>	<i>Fase inflamatória (s)</i>
Salina	119.00 $\pm$ 4,53	291.60 $\pm$ 40.71
Piroxicam 30 mg/ kg	-	183.31 $\pm$ 30.33* (37%)#
*Morfina 10 mg/kg	1.30 $\pm$ 0.61** (98%)#	0
<i>Mouriri pusa</i> 500 mg/kg	89.15 $\pm$ 7.72** (25%)#	157.46 $\pm$ 22.64*(46%)#

ANOVA  $F_{(2,26)} = 62,284$  para a fase neurogênica  $F_{(2,36)} = 4,466$  para a fase inflamatória (n=6-13). Teste de Dunnett \*p<0,05 e \*\*p<0,01. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão. # porcentagem de inibição da nocicepção em relação ao grupo salina. # porcentagem de inibição da nocicepção com relação ao grupo salina. \* A morfina foi administrada pela via subcutânea.

### V.3 *Rhamnidium elaeocarpum*

O extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* apresentou atividade anti-nociceptiva na fase inflamatória no teste da formalina através da administração via oral do extrato na dose intermediária de 250 mg/kg, 1 hora antes da injeção de formalina na pata direita. Não foi observada a mesma atividade na fase neurogênica (tabela 4):

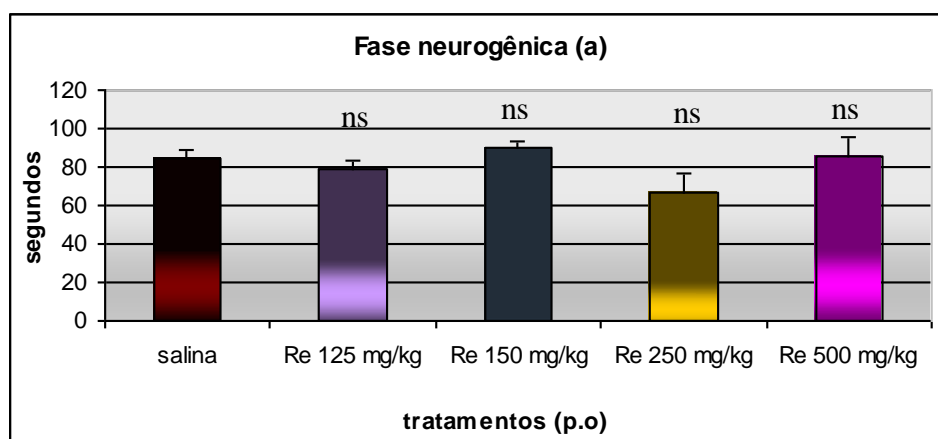
**Tabela 4: Avaliação da ação anti-nociceptiva do extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* no modelo da formalina.**

<i>Tratamentos (p.o)</i>	<i>Fase Neurogênica (s)</i>	<i>Fase inflamatória (s)</i>
Salina	98.15 ± 7.06	275.31 ± 27.24
Piroxicam 30 mg/kg	93 ± 11.21	103.25 ± 14.50* (62.28)#
<i>Rhamnidium elaeocarpum</i> 125 mg/kg	141.83 ± 34.87	197.33 ± 36.60
<i>Rhamnidium elaeocarpum</i> 250 mg/kg	85 ± 11.48	120.83 ± 27.87* (53.99%)#

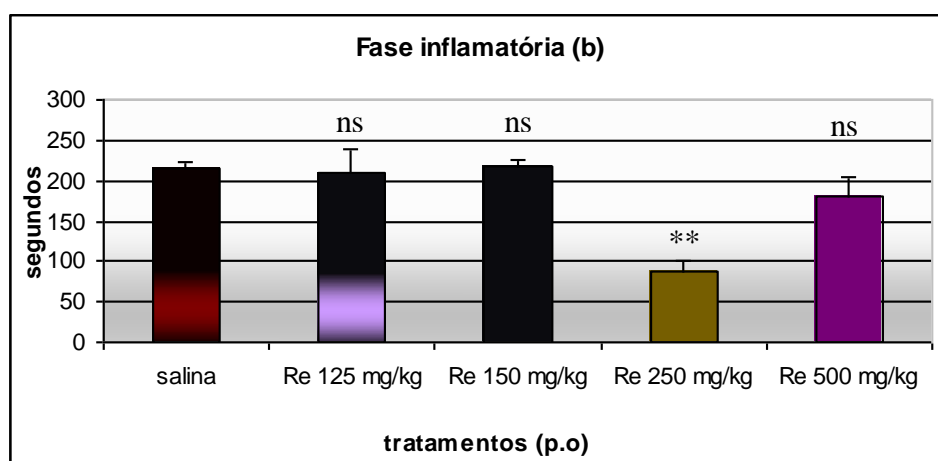
ANOVA  $F_{(2,19)} = 0.57$  para a fase neurogênica  $F_{(2,19)} = 6.80$  para a fase inflamatória. Teste Dunnett. \* $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . Os valores representam média ± erro padrão. # porcentagem de inibição da nocicepção em relação ao grupo salina (n=6-13).

Adicionalmente foi avaliado se existe uma relação dose – resposta para o EMeOH de *R. elaeocarpum* (125; 150; 250; 500 mg/kg, *p.o*) para a ação atividade anti-nociceptiva observado na tabela 4. No entanto, observou-se que apenas a dose de 250 mg/kg apresenta atividade anti-nociceptiva (gráfico 1 a e 1 b).

**Gráfico 1: Avaliação da ação anti-nociceptiva do extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* (Re) no teste da formalina.**



ANOVA  $F_{(4,34)} = 1,80$  seguido de Teste Dunnett. ns: não significativo ( $p > 0.05$ ). Os valores representam média  $\pm$  erro padrão. (n=6-12).



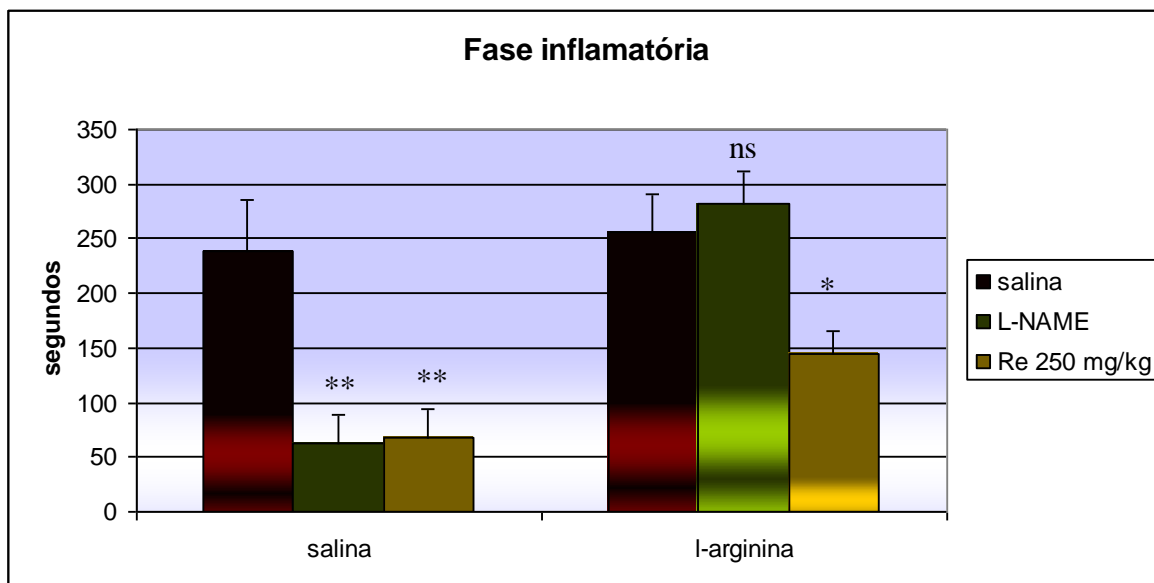
ANOVA  $F_{(4,34)} = 5,73$  seguido de Teste Dunnett. \*\*  $p < 0,01$ , ns: não significativo ( $p > 0.05$ ). Os valores representam média  $\pm$  erro padrão (n=6-12).

Para investigar o possível papel do óxido nítrico (NO) no mecanismo de ação anti-nociceptiva desse extrato, foi utilizado a l-arginina (um substrato para síntese de NO) a fim de verificar possível de reversão da ação anti-nociceptiva do extrato através dessa droga. Para isso, foi realizado um pré-tratamento dos animais com l-arginina 30 minutos antes da

administração oral do extrato de *Rhamnidium elaeocarpum*. L-NAME (inibidor da NO sintase) foi utilizado como controle.

Como de mostra o gráfico 2, não houve significativa reversão do efeito anti-nociceptivo do extrato de *R. elaeocarpum* através do pré-tratamento com l-arginina. Mas foi possível observar uma redução da ação anti-nociceptiva do extrato de 71,81 % para 43,72% através do pré-tratamento com l-arginina. Os dados obtidos *in vitro* com os macrófagos corroboram com esse resultado quando mostra que o extrato metanólico de *R. elaeocarpum* inibiu a produção de óxido nítrico em 59,66 % e 91,24% nas concentrações do extrato de 1 mg/ml e 2 mg/ml, respectivamente (tabela 5).

**Gráfico 2: Avaliação da participação do óxido nítrico na atividade anti-nociceptiva do extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* (Re 250 mg/kg) no modelo da formalina.**



Tratamentos: salina, l-name 65 mg/kg *i.p.*, *R. elaeocarpum* 250 mg/kg *p.o.*  $F_{(2,14)} = 8,48$   
 Pré-tratamento: l-arginina 500 mg/kg *i.p.*  $F_{(2,13)} = 7,15$ . Teste Dunnett \* $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ , ns: não significativo. As barras representam os valores de média  $\pm$  erro padrão da média. As porcentagens indicam a ação anti-nociceptiva em relação aos seus respectivos grupos controles. (n=5-6).



**Tabela 5: Efeito do extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* na inibição de NO e TNF- $\alpha$  produzidos pelos macrófagos peritoneais.**

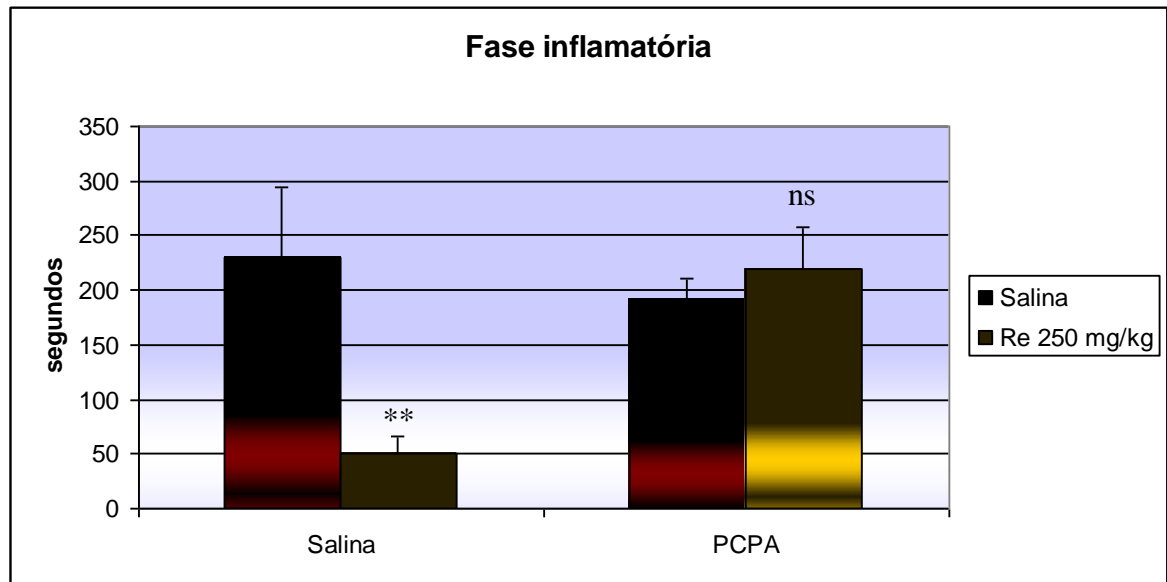
Tratamento (mg/mL)	Inibição NO (%)	Inibição TNF- $\alpha$ (%)	Viabilidade (%)
LPS			81.11 $\pm$ 2.41
Controle negativo			100
1	59,66 $\pm$ 4,68*	0	71,70 $\pm$ 5,75
2	91,24 $\pm$ 6,16*	48,86 $\pm$ 8,98*	57,41 $\pm$ 3,78

Macrófagos ( $5 \times 10^6$  células/mL) foram incubados por 24 h com extrato de *Rhamnidium elaeocarpum* + LPS (10  $\mu$ g/mL). Os valores representaram a porcentagem de inibição de NO e TNF- $\alpha$  quando comparada com o controle positivo (células + LPS). \*  $p < 0.001$  quando comparada com o controle positivo (LPS). Controle negativo corresponde a 100% da viabilidade do seu conteúdo somente em RPMI-1640. Cada valor representa média  $\pm$  desvio padrão para pelo menos 4 experimentos independentes feitos em triplicata.

O extrato metanólico de *R. elaeocarpum* na concentração de 2 mg/ml foi capaz de inibir em 48,86 % a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos (tabela 5). Outros mecanismos de ação estão envolvidos na atividade anti-nociceptiva e anti-inflamatória dessa espécie. Foi verificada a reversão completa do efeito anti-nociceptivo de *R. elaeocarpum* através de uma série de antagonistas serotoninérgicos e opióides (gráficos 3, 4, 5, 6 e 7).

O gráfico 3 mostra a reversão completa do efeito anti-nociceptivo do extrato frente ao pré-tratamento durante 4 dias com o PCPA, um inibidor da triptofano hidroxilase, interferindo assim, na síntese e quantidade de serotonina liberada pelo neurônio pré-sináptico.

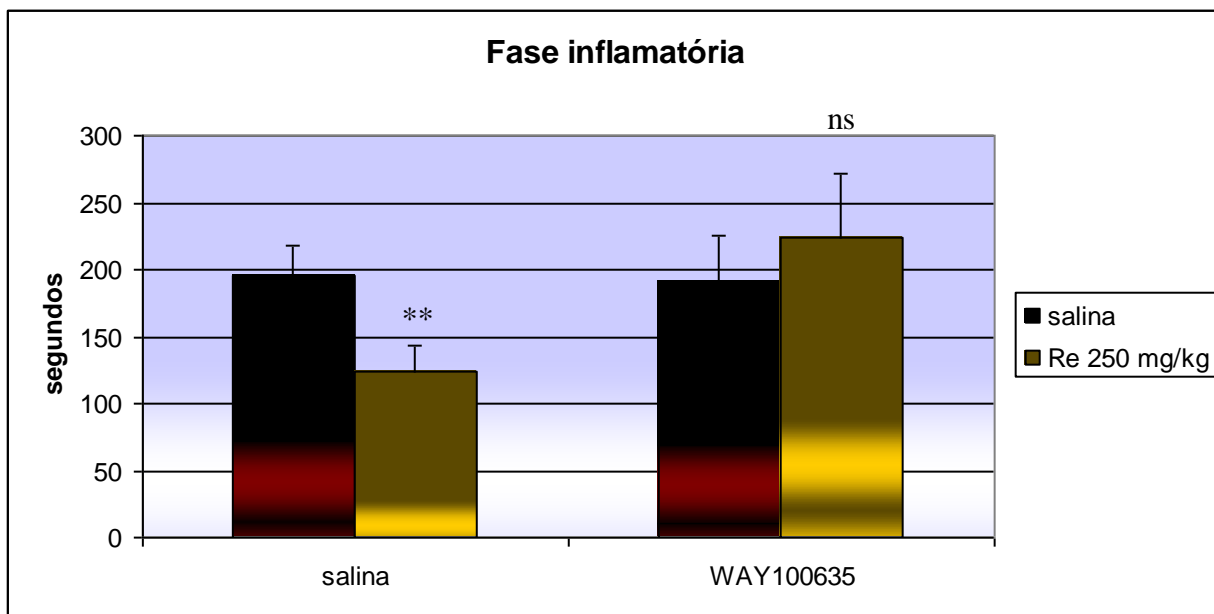
**Gráfico 3: Avaliação da participação do sistema serotoninérgico na atividade anti-nociceptiva do extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* (Re 250 mg/kg) no modelo de formalina.**



Pré-tratamento salina: Salina em relação ao extrato  $p^{**} = 0,04$  considerado significativo (teste t)  $t = 2,47$ . Pré-tratamento PCPA: Salina em relação ao extrato não significativo (ns).  $p = 0,53$  considerado não significativo (ns) (teste t)  $t = 0,65$  ( $n=5-7$ )

O receptor 5-HT<sub>1A</sub> também está envolvido com o mecanismo anti-nociceptivo do extrato metanólico de *R. elaeocarpum* (gráfico 4). O pré-tratamento com o antagonista específico de 5-HT<sub>1A</sub>, WAY 100635 foi capaz de reverter o efeito anti-nociceptivo do extrato.

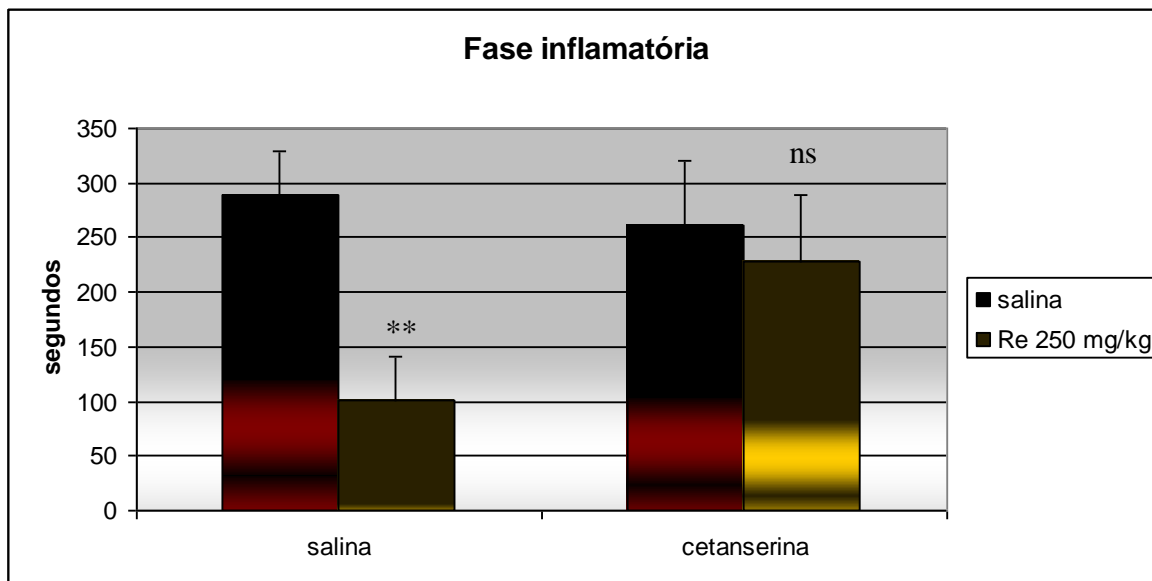
**Gráfico 4: Avaliação da participação do receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub> na atividade anti-nociceptiva do extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* (Re 250 mg/kg) no modelo de formalina.**



Pré-tratamento salina: Salina em relação ao extrato \*\*  $p = 0,03$  considerado significativo (teste t)  $t = 2,99$ . Pré-tratamento WAY 100635 (0,1 mg/kg, i.p): Salina em relação ao extrato não significativo. ns  $p = 0,5937$  considerado não significativo (teste t)  $t = 0,55$  (n= 7-10)

O pré-tratamento com antagonista serotoninérgico específico 5HT<sub>2A</sub>, cetanserina (1 mg/kg, i.p) também reverteu completamente o efeito anti-nociceptivo do extrato (gráfico 5).

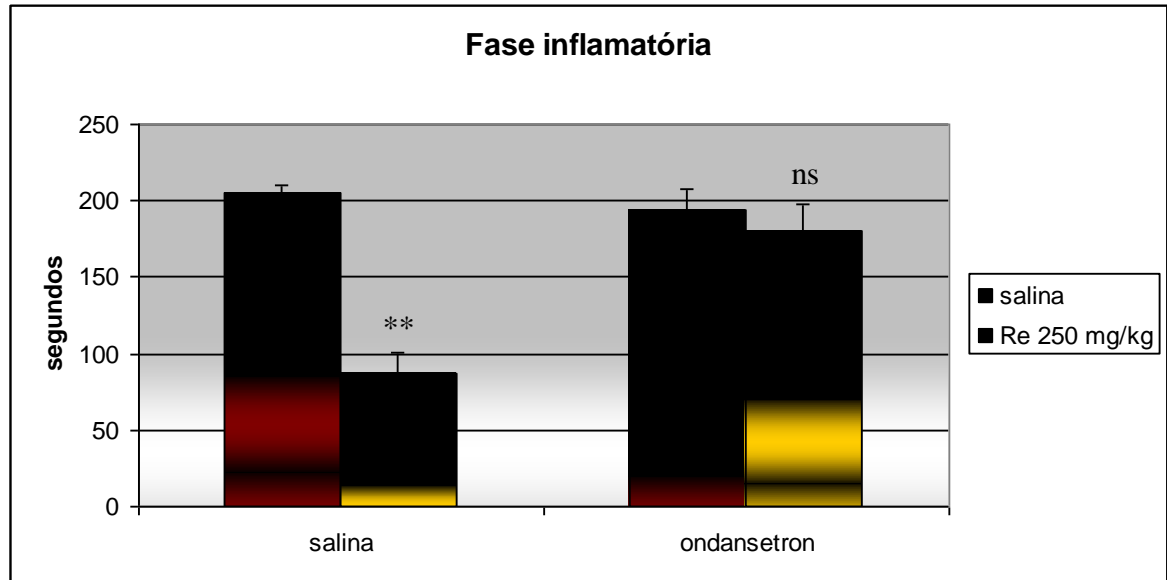
**Gráfico 5: Avaliação da participação do receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2A</sub> na atividade anti-nociceptiva do extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* (Re 250 mg/kg) no modelo de formalina.**



Pré-tratamento salina: Salina em relação ao extrato \*\*  $p = 0,0004$  considerado extremamente significativo (teste t)  $t = 4,770$ . Pré-tratamento cetanserina (1 mg/kg, i.p) : Salina em relação ao extrato: ns  $p = 0,600$  considerado não significativo (teste t)  $t = 0,554$  (n= 5- 9)

Houve completa reversão do efeito anti-nociceptivo do extrato frente ao pré-tratamento de ondansetron, um antagonista serotoninérgico específico do receptor 5-HT<sub>3A</sub> (gráfico 6).

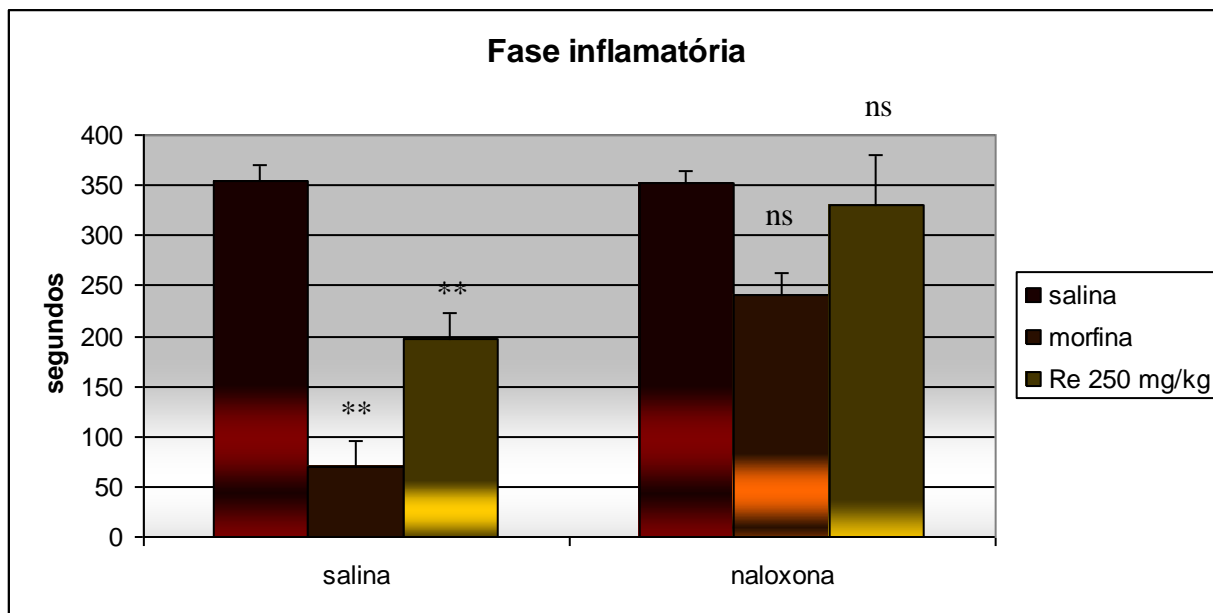
**Gráfico 6: Avaliação da participação do receptor serotoninérgico 5-HT<sub>3A</sub> na atividade anti-nociceptiva do extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* (Re 250 mg/kg) no modelo de formalina em camundongos.**



Pré-tratamento salina : Salina em relação ao extrato  $p = 0,0001$  considerado extremamente significativo (teste t)  $t = 9,130$ . Pré-tratamento ondansetron (0,5 mg/kg, i.p): Salina em relação ao extrato não significativo. ns  $p = 0,563$  considerado não significativo (teste t)  $t = 0,6$  (n= 5-8)

O gráfico 7 mostra que o sistema opióide também está envolvido no mecanismos de ação de *R. elaeocarpum*. O efeito anti-nociceptivo do extrato foi revertido pelo pré-tratamento com naloxona (um antagonista não-seletivo de receptor opióide).

**Gráfico 7: Participação do sistema opióide na atividade anti-nociceptiva do extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* (Re 250 mg/kg) no modelo de formalina.**



Tratamentos: salina, morfina mg/kg *i.p.*, *R. elaeocarpum* 250 mg/kg *p.o.*  $F(2,14) = 34,90$   
 Pré-tratamentos com naloxona 1 mg/kg *i.p.*  $F(2,12) = 2,33$ . Teste Dunnett \*\*  $p < 0,01$ . As barras representam os valores de média em segundos  $\pm$  erro padrão da média. (n=5-6).

Não foi observado efeito anti-edematogênico no modelo da carragenina, através da administração oral do extrato de *Rhamnidium elaeocarpum* nas doses de 125, 250 ou 500 mg/ kg (tabela 1; gráfico 3 do anexo 1). Já a administração intraperitoneal do mesmo extrato promoveu efeito anti-edematogênico na dose de 15,62 mg/kg durante as 3 primeiras horas de observação (tabela 1; gráfico 4 do anexo 1). Enquanto que a dose de 31,24 mg/kg de *Rhamnidium elaeocarpum* pela mesma via, exibiu efeito anti-edematogênico durante todas as horas de observação (tabela 1; gráfico 5 do anexo 1). Entretanto a menor dose do extrato (7,91 mg/kg) não apresentou efeito anti-edematogênico em nenhuma das horas observadas (tabela 1; gráfico 5 do anexo 1).

### V.3 *Davilla elliptica*

Não foi observado efeito anti-edematogênico pelo tratamento oral dos animais com o extrato metanólico das folhas de *Davilla elliptica* nas doses de 125, 250 ou 500 mg/kg no modelo da carragenina (tabela 1; gráfico 6 do anexo 1). Porém, a administração intraperitoneal do mesmo extrato nas doses de 15,62 ou 31,24 mg/kg exibiu atividade anti-edematogênica durante as 4 primeiras horas de observação. Já a menor dose de 7,81 mg/kg foi efetiva somente na 3<sup>o</sup> hora após a injeção do agente flogístico (tabela 1; gráficos 7 e 8 do anexo 1).

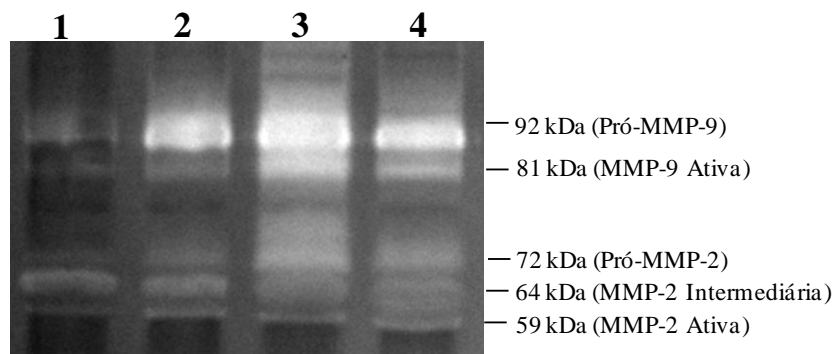
A fração de flavonóides isoladas de *D. elliptica* na dose intermediária de 15,62 mg/kg (i.p), não apresentou atividade anti-edematogênica. Em contrapartida, a fração de taninos dessa mesma espécie apresentou atividade na mesma dose e via, durante as 3 primeiras horas após a indução da inflamação pela carragenina (tabela 1; gráficos 10 e 11 do anexo 1).

Extrato metanólico das folhas de *Davilla elliptica* e suas frações foram selecionados dentre os 4 extratos desse projeto para a realização da quantificação de MMP-2 e MMP-9 das dermes frente a inoculação de veneno pois além desse extrato ter apresentado potencial de neutralização total contra a hemorragia, ele possui perfil fitoquímico completamente caracterizado e quantificado (predominantemente composto de taninos condensados e flavonóides glicosilados).

As figuras 1 e 2 mostram o efeito do extrato das folhas de *Davilla elliptica*, das frações de taninos e dos flavonóides sobre as MMP-2 e MMP-9, bem como a consequência de suas interações com o veneno de *Bothrops jararaca*. O efeito da administração do extrato metanólico de *D. elliptica* 1 hora após a inoculação do veneno também foi avaliado.

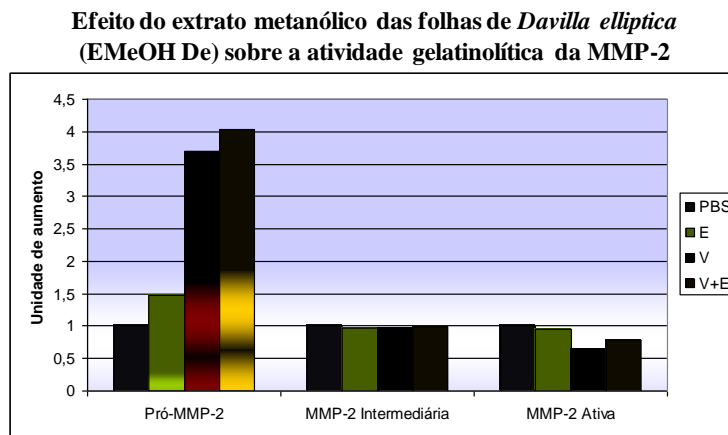
**Figura 1: Efeito do extrato metanólico das folhas de *Davilla elliptica* (EMeOH De) sobre a atividade gelatinolítica da MMP-2 e da MMP-9 na derme de camundongo.**

**A)**

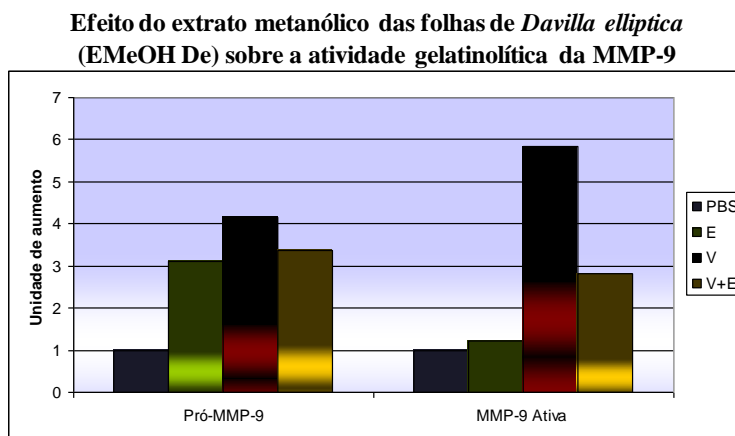


Gel de Zimografia ilustrando a atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9: PBS (linha 1); EMeOH De (E) (linha 2); veneno (V) (linha 3); veneno + EMeOH De (V+E) (linha 4).

**B)**



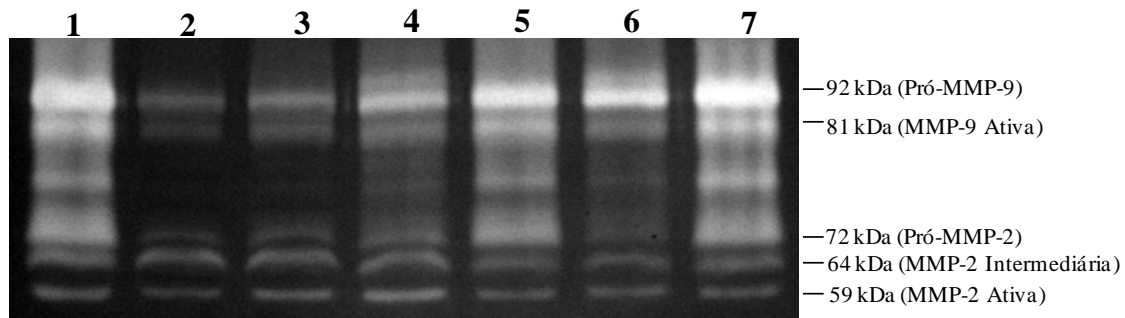
**C)**





**Figura 2: Efeito das frações de taninos e flavonóides de *Davilla elliptica* sobre a atividade gelatinolítica da MMP-2 e da MMP-9 na derme de camundongo.**

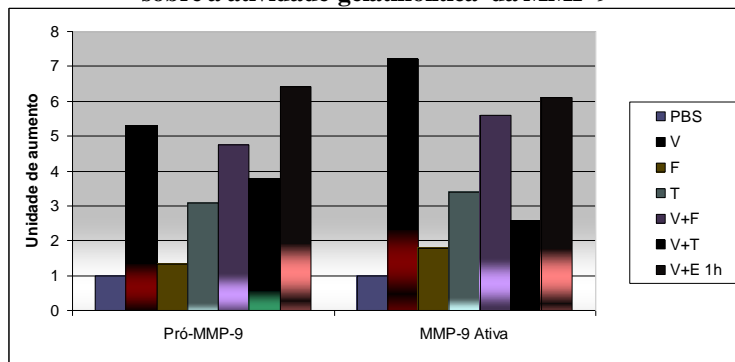
**A)**



Gel de Zimografia ilustrando a atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9: Veneno 3 dias (linha 1); PBS 3 dias (linha 2); Fração de flavonóides (F) 3 dias (linha 3); Fração de taninos (T) 3 dias (linha 4); Veneno + fração de flavonóides (V+F) (linha 5); Veneno + fração de taninos (V+T) (linha 6); Veneno e extrato após 1 hora (V+E 1h) (linha 7).

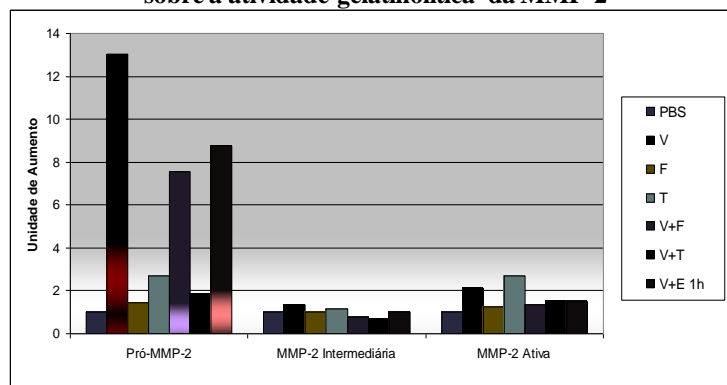
**B)**

**Efeito das frações de taninos e flavonóides de *Davilla elliptica* sobre a atividade gelatinolítica da MMP-9**



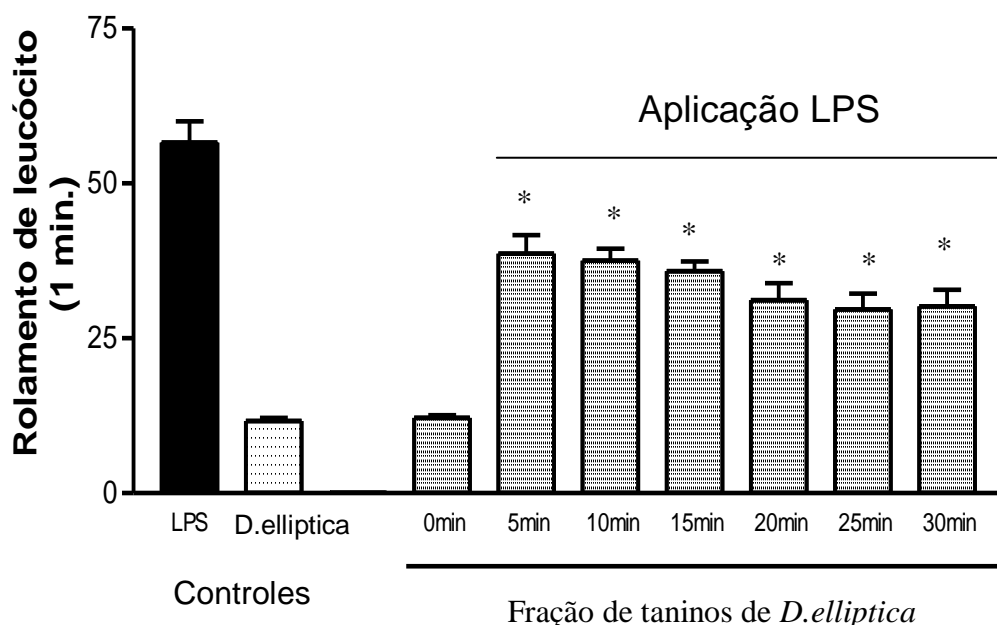
**C)**

**Efeito das frações de taninos e flavonóides de *Davilla elliptica* sobre a atividade gelatinolítica da MMP-2**



O gráfico 8 mostra uma inibição de 50 % no rolamento de leucócitos nos animais tratados com a fração de taninos de *D.elliptica* 1 hora antes da aplicação tópica de LPS em relação ao controle LPS. Os animais foram observados durante 30 minutos em microscópio intravital. A dose de 30 mg/kg da fração de taninos de *D. elliptica* foi selecionada baseada no experimento de edema de pata induzido pela carragenina, onde essa dose foi efetiva em reduzir o edema de pata pela carragenina.

**Gráfico 8: Efeito da fração de taninos de *D. elliptica* no rolamento de leucócitos em LPS aplicado no músculo cremaster em camundongos (microscopia intravital).**



Grupo controle LPS em relação ao grupo tratado com fração de taninos durante 30 minutos após a aplicação de LPS. \*  $p < 0,05$ .

## VI. DISCUSSÃO

O mecanismo do dano tecidual local relacionado ao envenenamento ofídico envolve ativação da resposta imune celular, na qual a cascata de eventos é iniciada por macrófagos teciduais e monócitos sanguíneos (Voronov e cols., 1999). Envenenamento de *Bothrops jararaca* é caracterizado principalmente por falência renal, choque, hemorragia generalizada, edema e necrose. Os efeitos locais resultam rapidamente em severa lesão tecidual (Rosenfeld, 1971) devido a reação inflamatória aguda com grande influxo de leucócitos, liberação de citocinas, de metabólitos nitrogenados e também de espécies reativas de oxigênio (Petrecevich e cols., 2000; Zamuner e cols., 2001). O tratamento com soro antiofídico é utilizado para combater os efeitos sistêmicos do envenenamento, porém, é pouco eficaz na neutralização da lesão local induzida pelo veneno (Batellino e cols., 2003).

A inflamação é um processo que envolve múltiplos fatores que agem em uma complexa rede enzimática sendo que o ingresso de leucócitos no local da inflamação é o evento crucial na patogênese da inflamação (Kasama e cols., 1995). No local inflamado, o recrutamento celular é ativado pela liberação de muitos mediadores que iniciam e mantêm a resposta inflamatória, causada pela mudança da fase aguda para o estabelecimento da inflamação crônica. Nas últimas décadas, síntese de novas moléculas e modificações estruturais de fármacos levaram ao desenvolvimento de novas drogas, principalmente as drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (AINEs) (Osadebe e Okoyé, 2003). Essas drogas foram amplamente comercializadas mas seu uso clínico tornou-se altamente controverso devido seus múltiplos efeitos adversos como lesões gástricas, danos renais, cardiovasculares e broncoespasmos (Tapiero e cols., 2002). Por esse motivo, a busca de

novos agentes anti-inflamatórios de fontes naturais com ampla atividade e poucos efeitos adversos tem sido alvo de muitos estudos (Van den Worm e cols., 2001).

Para a busca de novas drogas anti-inflamatórias, os modelos experimentais pré-clínicos são instrumentos importantes para esse estudo. O modelo experimental do edema de pata induzido pela carragenina é altamente sensível aos AINEs e tem sido uma importante ferramenta para avaliação de novas drogas. Esse modelo bifásico é caracterizado pela fase inicial (1-2 horas após o agente flogístico) e é mediada por histamina, serotonina e aumento da síntese de prostaglandina, enquanto que na fase tardia (3-4 horas) é sustentada pela liberação de prostaglandina no tecido, sendo que essa fase é inibida pelas DAINEs tais como piroxicam (Just e cols., 2008). A carragenina é um agente flogístico que induz inflamação pela degradação de colágeno e gelatina (Nakagawa e cols., 1996), liberação de mediadores locais tais como prostaglandinas (principalmente da série E), histamina, bradicinina, leucotrienos e serotonina que causam aumento dor e da temperatura (Silbernagl e Lang, 2000).

Já foi bem estabelecido que as cininas, como a bradicinina, são peptídeos pró-inflamatórios que regulam uma variedade de respostas fisiológicas através da estimulação de 2 subtipos de receptores B1 e B2 (Calixto e cols., 2004). Histamina é responsável pela dor local bem como o recrutamento de leucócitos (Paula e cols., 2006). Estudos recentes indicam que a serotonina modula a resposta inflamatória através de sua ação nas células do sistema imune (Maleki e cols., 2005). Prostaglandinas (PGs) são metabólitos do ácido aracdônico, sintetizados e liberados pela maioria das células através da atividade de ciclooxigenase (COX), que catalisa o primeiro passo para a biossíntese de PGs (Teather e cols., 2002). Os níveis de COX-2 aumentam em resposta a várias formas de estímulo, incluindo processos inflamatórios nos diferentes tipos de tecidos (Teather e cols., 2002).

De um modo geral os extratos avaliados apresentaram ação anti-edematogênica pela administração via intraperitoneal e não pela via oral. Porém, para assegurar que a administração intraperitoneal de uma substância estranha (no caso, os extratos) não altera o recrutamento celular para a pata, resultando em um falso-positivo, grupos de ratos foram submetidos a indução de edema de pata pela administração subplantar de carragenina e tratados com salina (i.p), piroxicam (30 mg/Kg, p.o) ou carragenina 1% (1ml/kg,i.p). O grupo que recebeu carragenina na cavidade peritoneal não apresentou diferença significativa na redução do volume da pata, assegurando assim que uma substância estranha administrada na cavidade peritoneal, que poderia causar uma possível inflamação, não diminui o edema de pata causado pela carragenina (tabela 9 do anexo 1). Através destes resultados, pode-se garantir que o efeito anti-edematogênico obtido através da administração dos extratos pela via intraperitoneal é consequência de sua atividade biológica e não de um possível “desvio” de influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal decorrente da via de administração do extrato.

Laupattarakasem e cols. (2006) avaliaram a atividade anti-edematogênica de *Cryptolepis buchmanii*, tanto pela administração oral do extrato, como pela administração intraperitoneal, sendo que a atividade anti-inflamatória foi somente alcançada somente pela administração via intraperitoneal. Neste caso, certamente a via de administração do extrato interferiu na ação anti-inflamatória. Estudos em animais mostraram que flavonóides presentes em alimentos são considerados não absorvíveis pelo trato gastrointestinal devido a ligação desses compostos a açúcares como  $\beta$ -glicosídeos (com exceção as catequinas). Flavonóides livres, sem açúcares (chamados de agliconas), são capazes de atravessar a barreira intestinal e exercer ação sistêmica (Hackett e cols., 1986; Di Carlo, 1999). Considerando que todos os extratos do nosso estudo possuem em sua composição

flavonóides glicosilados, optou-se pela administração intraperitoneal para a avaliação do potencial anti-edematogênico dessas espécies.

Além do modelo de carragenina, outro modelo experimental utilizado nesse trabalho para avaliar a ação anti-inflamatória dos extratos foi o teste da formalina. Esse teste é uma ferramenta útil não só para avaliar o potencial de uma substância anti-inflamatória ou analgésica mas também para elucidar o mecanismo de ação de drogas (Hunskaar e Hole, 1987). Este teste é caracterizado por duas fases: a primeira, chamada de neurogênica, a dor é resultado da estimulação direta das fibras sensoriais do tipo C amielínicas (relacionada com a resposta de "licking") e as fibras A $\delta$  perivasculares juntamente com os receptores H3 (relacionados com a resposta "flinching"). Esta fase dura 5 minutos após a injeção de formalina. Na intérfase, período entre 5 a 15 minutos, a nocicepção é inibida fisiologicamente pelas fibras descendentes (Hunskar e cols., 1985). E finalmente, a segunda fase, chamada de inflamatória, é caracterizada pela sensibilização periférica através de mediadores inflamatórios modulados pela medula espinhal (Le Bars e cols., 2001; Sayyah e cols., 2004).

Drogas narcóticas tais como morfina e codeína agem centralmente inibindo igualmente ambas as fases do teste da formalina (Shibata e cols., 1989) enquanto que as drogas anti-inflamatórias atuam apenas na segunda fase (Chen e cols., 1995). Uma variedade de mediadores químicos está relacionada com a ativação periférica dos nervos sensoriais terminais nas condições inflamatórias (Dray e cols., 1995). Mastócitos estão localizados nas proximidades das terminações nervosas sensoriais e a estimulação nervosa conduz a degranulação de mastócito e liberação de mediadores como histamina e bradicinina (Dimitriadou e cols., 1991).

Okuda e cols. (2001) mostraram que após a injeção de formalina existe um aumento da liberação de nitrito e glutamato com uma pausa transiente entre as duas fases. Lam e cols. (1996), mostraram aumento bilateral no número de neurônios positivos para a NO sintase no corno dorsal de L4-5 após a injeção de formalina. Óxido nítrico (NO) possui papel importante no processamento da informação nociceptiva (Meller e Gebhart, 1993) juntamente com as prostaglandinas produzidas pela via da ciclooxigenase (COX). Prostaglandinas induzem liberação de glutamato na medula espinhal (Catania e cols., 1993). Glutamato tem um papel central na nocicepção e o NO parece ser um intermediário na neurotransmissão medular (Tassoreli e cols., 2006). A produção de NO é altamente dependente de ativação do receptor glutamatérgico NMDA juntamente com substância P, que agem sinergicamente para promover excitabilidade neuronal no corno dorsal (Caruso e cols., 2005).

*Byrsonima crassa*:

Esta espécie, conhecida popularmente como murici – cascudo, é usada popularmente em forma de chás no tratamento de picada de cobra, febre, infecções cutâneas e disfunções gástricas (Amarquaye e cols., 1994). Neste trabalho, foi utilizado o extrato metanólico das folhas de *Byrsonima crassa*, que apresenta em seu perfil cromatográfico o predomínio de flavonóides derivados da quercetina (quercetina 3-O- $\alpha$ -D arabinopiranosídeo, quercetina 3-O- $\beta$ -D-galactopiranosídeo), o biflavonóide amentoflavona e taninos condensados ( Sannomiya e cols., 2005).

Nossos resultados mostram que o extrato metanólico das folhas de *Byrsonima crassa* na dose de 15,62 mg/kg apresentou atividade anti-edematogênica durante as 4 horas de observação após a indução de edema e somente durante a 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> hora de observação na

maior dose. Já na menor dose (7,81 mg/kg) não houve atividade (gráficos 1 e 2 do anexo 1). No dia seguinte (19 horas após a injeção de carragenina) os animais foram avaliados novamente, para verificar se o efeito anti-inflamatório persiste por longas horas. Porém, o extrato já havia perdido seu efeito anti-edematogênico.

A administração oral do extrato metanólico de *Byrsonima crassa* não exibiu atividade anti-nociceptiva na dose de 250 mg/kg (tabela 2). Considerando que esse extrato foi administrado pela via oral, a ausência de atividade anti-nociceptiva do extrato de *B. crassa* pode estar relacionada com a baixa absorção intestinal dos flavonóides glicosilados e taninos condensados presentes no extrato. Taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros formados por unidades elementares de flavan-3-ol e sua absorção através do epitélio intestinal é limitada a taninos de baixo grau de polimerização e metabólitos (Scalbert e cols., 2002).

No teste da formalina, foram realizados diversos experimentos pilotos com o objetivo de padronizar a administração intraperitoneal desses extratos a fim de evitar os inconvenientes da baixa absorção dos compostos com potencial anti-nociceptivo. No entanto, quando esses extratos eram administrados pela via intraperitoneal houve uma redução da resposta nociceptiva, mas diferente dos ratos, os camundongos realizavam comportamento de contorções abdominais, que interferiram no comportamento de lambida na pata frente ao estímulo doloroso. Sendo assim, consideramos estes resultados observados no piloto como falso positivo, pois provavelmente os animais diminuía a frequência de lambidas na pata durante o comportamento de contorção abdominal.



Em decorrência desse fato no sentido de se assegurar a validade e confiabilidade de nossos resultados, optamos por utilizar somente a via oral de nossos extratos no teste da formalina.

*Rhamnidium elaeocarpum*:

*Rhamnidium elaeocarpum*, conhecida como cabriteiro ou cabrito, é utilizada na medicina popular como tratamento das dores de estômago. Taninos condensados são os compostos majoritários do extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* (Sommerfeld, 2006).

A menor dose do extrato metanólico das cascas de *R. elaeocarpum* administrado pela via intraperitoneal também não apresentou atividade anti-edematogênica. Já a dose de 15,62 mg/kg (i.p) apresentou atividade anti-edematogênica durante as 3 primeiras horas após a injeção de carragenina, e a dose de 31,24 mg/kg (i.p), durante as 4 horas (gráficos 4 e 5, do anexo 1).

Nossos estudos mostram que o extrato metanólico de *Rhamnidium elaeocarpum*, cujo metabólico predominante são os taninos condensados, inibiu significativamente a produção de óxido nítrico e TNF- $\alpha$  em células de macrófagos peritoneais desafiadas com LPS (tabela 4). Óxido nítrico está envolvido na vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, com a transmissão de estímulos nociceptivos (Meller e Gebhart, 1993, Caruso e cols., 2005) e TNF-  $\alpha$  está envolvido no processo de necrose tecidual e é considerada uma citocina fundamental para o estabelecimento da hipernocicepção inflamatória (Cunha e cols., 1992; Laing e cols., 2003). A necrose tecidual no envenenamento botrópico está intimamente relacionada a essa citocina. A indução de necrose pela metaloproteinase

jararagina é abolida em ratos sem receptores para TNF (TNFR1, TNFR2) (Laing e cols., 2003).

A diminuição da lesão tecidual de *Rhamnidium elaeocarpum* frente a inoculação do veneno de cobra obtida (subprojeto 0604944-0 FAPESP) pode ser atribuída não apenas pela capacidade quelante das proantocianidinas na ativação das metaloproteínases dependentes de zinco contidas no veneno, mas também da possível ação do extrato na inibição da liberação de TNF- $\alpha$  em decorrência do envenenamento botrópico. Nossos resultados *in vitro* mostram que o extrato de *Rhamnidium elaeocarpum* na concentração de 2 mg/ml inibiu significativamente em 48,86 % a liberação de TNF- $\alpha$  em macrófagos, confirmando a hipótese de uma ação conjunta anti TNF- $\alpha$  e /ou quelante do veneno pelo extrato de *R. elaeocarpum*.

O extrato metanólico de *R. elaeocarpum* (cascas) também foi avaliado na atividade anti-nociceptiva frente a indução da nocicepção pela formalina. A administração oral desse extrato na dose de 250 mg/kg apresentou atividade anti-nociceptiva na fase inflamatória (tabelas 2 e 4).

Em vista do papel do óxido nítrico no processo nociceptivo e os resultados obtidos anteriormente com o extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum*, investigamos o envolvimento do NO na ação do efeito anti-nociceptivo do extrato através da administração de l-arginina, um substrato para a síntese de NO (gráfico 2).

Nossos resultados mostram que não houve reversão significativa do efeito anti-nociceptivo de *R. elaeocarpum* pela l-arginina. Porém, houve redução de 71,81 % para 43,72 % da ação anti-nociceptiva do extrato frente ao pré-tratamento com l-arginina comparado com grupo que recebeu somente extrato. Assim, não podemos descartar

completamente a participação desse mediador como mecanismo de ação desse extrato, mas sim, que o mecanismo de ação deste não depende exclusivamente do NO, sugerindo a participação de outras vias na gênese da dor inflamatória na anti-nocicepção de *R. elaeocarpum*. Adicionalmente, o ensaio imunológico *in vitro* de macrófagos peritoneais desafiados com LPS revelou que o extrato metanólico de *Rhamnidium elaeocarpum* nas doses de 1 e 2 mg/ml inibiram a liberação de óxido nítrico em 59,66 % e 91,24 %, respectivamente (tabela 5). Sendo assim, o efeito anti-inflamatório de *Rhamnidium elaeocarpum* pode estar relacionado em parte com a inibição da liberação ou síntese de óxido nítrico *in vivo*.

Ho e cols. (2007) estudaram a supressão da produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados com LPS pelo extrato enriquecido de proantocianidinas das flores de *Dimocarpus longan*. Esse efeito foi atribuído a supressão da expressão de óxido nítrico sintetase e não a redução da atividade enzimática. O extrato também apresentou atividade antioxidante. Portanto, os autores sugerem que estes são os prováveis mecanismos de ação do efeito anti-inflamatório dos taninos condensados (proantocianidinas) desta espécie.

Para investigar outros mecanismos envolvidos no efeito anti-nociceptivo do extrato metanólico de *Rhamnidium elaeocarpum* avaliamos a participação do sistema serotoninérgico. Para isso, foram realizados pilotos com uma droga inibidora da síntese de serotonina (PCPA, um inibidor da triptofano hidroxilase). O pré-tratamento com o inibidor da triptofano hidroxilase foi capaz de reverter completamente o efeito anti-nociceptivo de *R. elaeocarpum*, sugerindo assim, que o mecanismo anti-nociceptivo do extrato metanólico de *R. elaeocarpum* seja via liberação e síntese de serotonina pelos neurônios pré-sinápticos (gráfico 3).

Dessa forma, continuamos a investigar a via serotonérgica como mecanismo de ação, pré-tratando os animais com o antagonista seletivo do receptor 5-HT<sub>1A</sub> (WAY 100635), 5-HT<sub>2A</sub> (cetanserina) e 5-HT<sub>3A</sub> (ondansetron). Os três antagonistas foram capazes de reverter o efeito anti-nociceptivo do extrato, mostrando então, que esses subtipos de receptores estão envolvidos no mecanismo de ação de *R. elaeocarpum*. Já foi bem elucidado que a via da serotonérgica atua tanto na via descendente inibitória quanto na via excitatória (facilitadora) da dor e ambas se originam dos núcleos da rafe, que é a maior fonte neuronal de síntese de serotonina nos mamíferos. (Fields e cols., 1991; Millan, 2002). O sistema serotonérgico descendente inibitório faz parte de uma via que suprime impulsos que chegam na medula espinal, diminuindo assim a transmissão da dor (Millan, 1995). No teste da formalina, a ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> produz anti-nocicepção (Sasaki e cols., 2001; Millan, 1996). A via descendente inibitória serotonérgica modula a atividade da projeção neuronal diretamente ou através de interneurônios medulares (Alhaider e cols., 1991). Localmente, a injeção intraplantar de serotonina é capaz de induzir comportamento de dor dose-dependente através da ativação direta de fibras primárias sensoriais. Antagonista 5HT<sub>3/4</sub> inibem a nocicepção na primeira fase do teste da formalina (Parada e cols., 2001). Shibata e cols. (1989) constataram a inibição na fase da dor inflamatória no teste da formalina pela depleção das aminas dos mastócitos (entre elas a serotonina).

Os múltiplos tipos de receptores 5-HT na medula espinal parecem ter diferentes funções no controle da nocicepção (Millan, 1995; Bardin e cols., 2000). A ativação de receptores serotonérgicos produzem respostas fisiológicas contrastantes pois essas dependem de: a) subtipo de receptor ativado b) as ações pré-sinápticas e pós-sinápticas c) o paradigma em termos de qualidade e intensidade de estímulo (Sawynok e Reid, 1996;

Millan, 2002) d) a relação dose-efeito dos agonistas e antagonistas dos receptores serotoninérgicos as quais podem ser pró ou anti-nociceptivo (Hylden and Wilcox, 1983) .

Nossos resultados sugerem que além da via serotoninérgica, o sistema opióide também está relacionado com o mecanismo de ação do extrato metanólico das cascas de *R. elaeocarpum*. O pré-tratamento dos animais com naloxona (um antagonista não-seletivo de receptores opióides) também reverteu o efeito anti-nociceptivo do extrato e da morfina (gráfico 7).

O sistema opióide é um mecanismo endógeno do organismo para conter a dor e a inflamação. Na periferia, tais efeitos são produzidos pela interação entre peptídeos opióides derivados dos leucócitos e os receptores opióides existentes na terminação dos neurônios aferentes primários, graças às citocinas anti-inflamatórias e/ou endocanabinóides (Rittner e cols., 2008; Stein e cols., 2003). Este cenário é importante para o estudo dos mecanismos da dor inflamatória (Stein e cols., 2009).

Os receptores opióides são coexpressos com neuropeptídeos sensoriais tais como substância P e CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) (Mousa e cols., 2007). Estes receptores são transportados do gânglio da raiz dorsal para os terminais periféricos nervosos (Mousa e cols., 2001) e esse transporte é estimulado por citocinas e por fator de crescimento de nervos produzidos no tecido inflamado (Mousa e cols., 2007) o que resulta num aumento da densidade de receptores opióides nos terminais nervosos nesses tecidos (Stein e cols., 1990). Agonistas opióides podem atenuar a inflamação induzida pelo aumento da excitabilidade dos neurônios aferentes e a liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios (substância P e CGRP) em tecidos lesados. Todos esses eventos conduzem aos efeitos anti-nociceptivo e anti-inflamatório dos opióides (Stein e cols., 2009).

*Davilla elliptica*:

Estudos etnofarmacológicos indicam uma ação anti-inflamatória para *D. elliptica*. Há registros na medicina popular do uso da infusão dessa planta em banhos para tratar de hematomas; as raízes são utilizadas para o tratamento de hemorróidas, possui ainda efeito adstringente, tônico e laxativo sob a forma de infusão. Essa espécie também é indicada no tratamento de hérnias (cataplasma) e como anticoncepcional. O infuso das folhas é utilizado no combate à diarreia e úlceras gástricas (Pott e Pott, 1994; Silva e cols., 2001; Rodrigues e Carvalho, 2001) e o banho com suas folhas frescas, em caso de linfismo, inchações e orquites (Rodrigues e Carvalho, 2001). O extrato metanólico das folhas de *Davilla elliptica* apresentou atividade anti-edematogênica na dose de 15,62 e 31,24 mg/kg (i.p) (gráficos 7 e 8 do anexo 1).

O perfil cromatográfico de *D. elliptica* revelou a presença de taninos condensados ou proantocianidinas (majoritariamente), ácido gálico, 7 flavonóides derivados da quercetina, 2 flavonóides derivados da miricetina e rutina (Rodrigues e cols., 2008). Proantocianidinas, também chamados de taninos condensados, são conhecidos por seu potencial anti-inflamatório. Esse potencial pode estar relacionado com a capacidade dos taninos em inibir enzimas através da formação de complexos com proteínas pela ligação entre resíduos fenólicos e grupos polares das enzimas (Scalbert e cols., 2000). Já os flavonóides agem como potencial inibidor da ciclooxigenase, lipoxigenase e óxido nítrico sintetase (Rao e cols., 2005; Middleton e cols., 2000).

Landolfi e cols. (1985) mostraram que flavonóides tais como miricetina e quercetina, em altas concentrações, bloqueiam tanto a via da lipoxigenase como a via da ciclooxigenase. Flavonóides e taninos podem inibir a produção de NO em vários locais (Król e cols., 1991) inclusive no sistema nervoso central. Chiesi e Shwaller (1995)

estudaram a ação de taninos e flavonóides derivados da quercetina na atividade da NOS de células endoteliais e ambos os tipos de compostos inibiram a atividade de NOS, porém, os taninos apresentaram maior potencial de inibição. Na avaliação da atividade anti-edematogênica das frações de taninos e flavonóides, os taninos também apresentaram maior potencial. A fração de taninos isoladas de *D. elliptica* (15,62 mg/kg, i.p) apresentou atividade anti-edematogênica nas três primeiras horas após a indução de edema pela carragenina, perdendo seu potencial anti-inflamatório no intervalo entre a terceira e quarta hora de observação (fase de liberação de prostaglandinas) (gráficos 10 e 11 do anexo 1). Em contrapartida, a fração de flavonóides isolada de *D. elliptica* na mesma dose não apresentou atividade anti-edematogênica significativa em nenhuma das quatro horas.

Adicionalmente, a fração enriquecida de quercetina 3-O- $\alpha$ -D arabinopiranosídeo isoladas de *Byrsonima crassa* apresentou atividade anti-edematogênica apenas na segunda hora. A atividade anti-edematogênica desta fração é sustentada no intervalo da primeira hora e segunda hora, atingindo o seu pico na segunda hora e em seguida houve queda marcante de seu potencial anti-edematogênico. Portanto, na mesma dose e via de administração, os extratos metanólicos de *D. elliptica* e *B. crassa* apresentaram atividade anti-edematogênica durante as 4 horas de observação. Na terceira hora após a indução do edema pela carragenina a porcentagem de inibição pelo extrato de *D. elliptica* pela fração de taninos foi de 65 % e 33 % respectivamente. Já a inibição do edema na quarta hora pelo extrato e pela fração foi de 47% e 0 % respectivamente (gráficos 7 e 10 , anexo 1).

A partir destes resultados foi possível chegar a algumas conclusões prévias: a) a fração de taninos é mais potente do que a fração de flavonóides em inibir o edema induzido pela carragenina. b) os taninos provavelmente são os principais componentes do extrato responsáveis por tal atividade c) sua atividade anti-inflamatória está relacionada com a fase

de liberação de bradicinina, serotonina, histamina, já que durante o intervalo da terceira e quarta hora a fração de taninos perdeu sua atividade (fase de liberação de prostaglandinas).

d) Os extratos brutos de *D. elliptica* e *B. crassa* na mesma dose e via (15,62 mg/kg, *i.p*) apresentam melhor atividade anti-edematogênica do que suas respectivas frações enriquecidas possivelmente devido ao efeito sinérgico dos constituintes químicos presentes nos extratos (gráficos 2, 12, 7, 10 e 11 do anexo 1).

Outra etapa prevista de nosso estudo foi investigar o papel do extrato e das frações de taninos e flavonóides de *D. elliptica* na atividade anti-hemorrágica contra o veneno de *Bothrops jararaca* através da atividade enzimática das metaloproteinases via técnica da zimografia.

Bee e cols. (2001) demonstraram que a zimografia em gelatina (SDS PAGE com acréscimo de gelatina) é um método eficiente para identificar enzimas proteolíticas tanto do veneno quanto das enzimas constitutivas teciduais, já que a gelatina é um colágeno desnaturado. É considerado um ótimo método para avaliação e caracterização de atividade enzimática e hemorrágica de venenos (Hasson e cols., 2004).

O diferencial dessa metodologia, no presente projeto, com relação aos registrados na literatura, são os ensaios envolvendo extratos de plantas. Encontramos muitas dificuldades quando a amostra contém extrato vegetal, pois o extrato não percorre adequadamente no gel, mesmo após um procedimento de centrifugação e filtração.

Outra tentativa frustrada foi a incubação do gel de eletroforese "over night" (16 horas) a 37 °C em solução extrato ou a fração juntamente com o tampão Tris-HCl 50Mm pH 8,4 e Zn Cl<sub>2</sub>. No entanto, novamente não foi possível a visualização das bandas. Assim, após várias tentativas, estabelecemos a padronização desse método utilizando apenas as



proteínas extraídas da derme dos camundongos que receberam os tratamentos com : veneno, pbs, extrato, fração, veneno juntamente com o extrato ou veneno juntamente com a fração.

Ultrapassado esse inconveniente, buscamos o tempo ideal para que os animais apresentassem necroses macroscópicas, a dose mínima do veneno que não promovesse morte antecipada dos animais e que as metaloproteinases da matriz da derme (MMP) fossem expressas no gel.

Para isso, os animais receberam 15, 20, 30, 35, 40 e 50  $\mu\text{g}$  de veneno. Todos os animais apresentaram necrose em suas dermes 3 dias após a injeção quando receberam 35, 40 e 50  $\mu\text{g}$  de veneno. No entanto, houve mortes de alguns animais devido a hemorragias sistêmicas nas doses de 40 e 50  $\mu\text{g}$  de veneno. Dessa maneira, estabelecemos a dose de 35  $\mu\text{g}$  de veneno para o ensaio da zimografia. O segundo passo foi padronizar a quantidade mínima de extrato ou fração (para incubar com 35  $\mu\text{g}$  de veneno) necessária para neutralizar macroscopicamente a necrose tecidual do envenenamento. Realizamos então, testes pilotos com incubação de veneno: fração ou extrato, nas razões de 1:5, 1:10, 1:20 e 1:40 e após 40 minutos de incubação a temperatura ambiente (25° C) essa solução de incubação foi injetada via intradérmica. Após 72 horas da inoculação do veneno ou veneno+extrato/ou fração, os animais foram mortos em câmara de CO<sub>2</sub>. A dose de 1:20 (veneno: extrato ou fração) foi a menor dose de extrato que impediu a formação da necrose. Utilizamos essa proporção para realização desse ensaio.

No terceiro dia, os camundongos pertencentes aos grupos veneno + extrato de *D.elliptica* e veneno + fração de taninos não apresentaram necroses macroscópicas em suas dermes, já indicando uma melhor atividade do extrato e da fração de taninos comparado com a fração de flavonóides frente a necrose induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca*.

Nossos resultados mostram que o veneno de *Bothrops jararaca* aumenta a atividade de pró-MMP-2, MMP-2 ativa, pré-MMP-9 e MMP-9 ativa. A fração de flavonóides não foi capaz de modificar a atividade de nenhuma das formas. MMP-2 e MMP-9 em relação ao grupo tratado com PBS. A incubação da fração de flavonóides com o veneno também não foi capaz de alterar a atividade dessas MMPs comparada ao grupo de animais que recebeu apenas veneno (figura 1).

A fração de taninos aumentou a atividade de pró-MMP-2, MMP-2 ativa, pré-MMP-9 e MMP-9 ativa em relação ao grupo tratado com o veículo PBS. Quando incubada previamente com o veneno, a fração de taninos foi capaz de diminuir a atividade da pró-MMP-2 e MMP-9 ativa em relação ao grupo que recebeu apenas veneno (figura 1).

O extrato de *D. elliptica* aumentou a atividade de pró-MMP-9 em relação ao grupo tratado com PBS, porém diminuiu a atividade de MMP-9 ativa quando incubada previamente com o veneno em relação aos animais que receberam apenas veneno. Já a fração de flavonóides não apresentou nenhum efeito nas MMPs da derme. De fato, os animais que receberam veneno + fração de flavonóides apresentaram necrose três dias após a inoculação da mistura.

Rucavado e cols. (1998) mostraram um aumento da expressão de MMP-9 após a injeção de SVMP. Injeção intramuscular do veneno de *Bothrops asper* aumenta as formas ativas de MMP-9, induz a expressão e ativação de MMP-2, mas promove a degradação da pró-MMP-2 *in vitro* (Saravia-Otten e cols., 2004).

Estes mesmos autores sugerem o aumento da síntese de MMP-2 endógena e sua subsequente ativação após o envenenamento agudo. A degradação da matriz extracelular pelas MMPs acarreta profundos efeitos na função e comportamento das células e o efeito do veneno de *Bothrops asper* na matriz extracelular afeta os processos naturais de reparo

tecidual, regeneração muscular e angiogênese que segue o envenenamento (Teixeira e cols., 2009, Sternlicht and Werb, 2001).

MMP-9 está ausente na maioria dos tecidos adultos mas torna-se presente em tecidos inflamados, em processo de cicatrização, formação de tumor e metástase. A expressão de MMP-9 é controlada pelas citocinas pró-inflamatórias (Zhou e cols., 2009, Ito e cols., 1996). MMP-9 tem papel crucial na transmigração de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos (Lee e cols., 2003), na dermonecrose no envenenamento de *Loxocles* (Paixão-Calvacante e cols., 2007).

Vários agentes tem sido desenvolvidos para bloquear a síntese de MMPs e prevenir o processo de dermonecrose. A maioria dos medicamentos utilizados no tratamento da dermonecrose após o envenenamento são inibidores da infiltração de polimorfonucleares (Paixão-Cavalcante e cols., 2007).

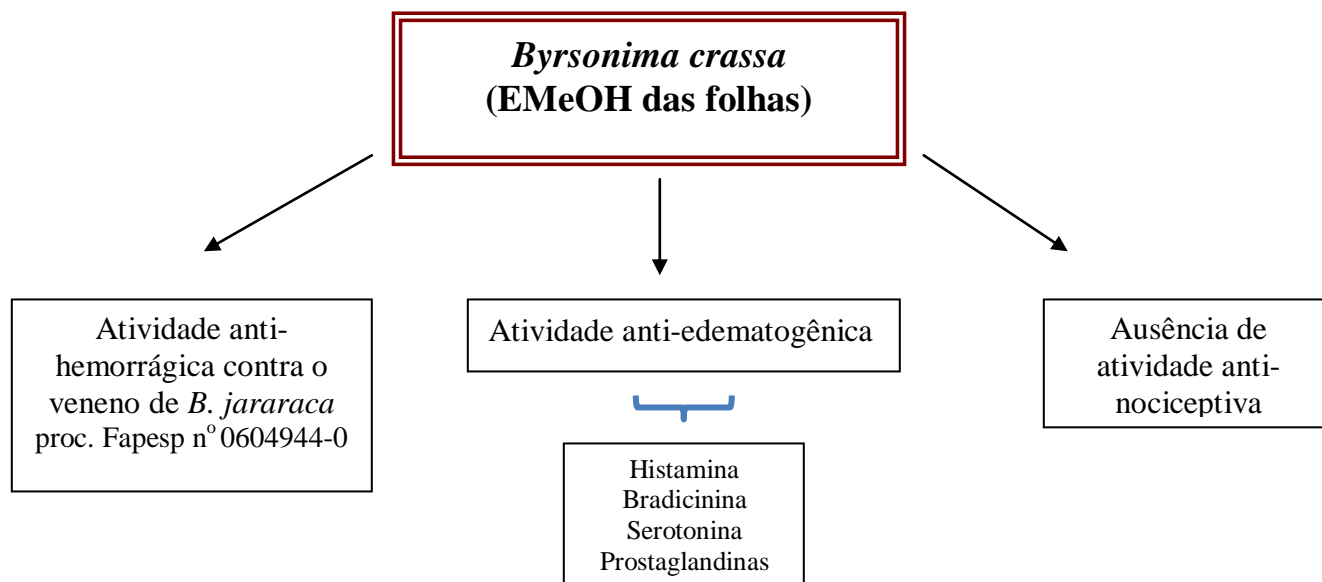
O efeito da fração de taninos de *D.elliptica* tanto na inibição do edema de pata induzido pela carragenina, bem como na sua capacidade de interação com o veneno e com as MMPs da derme indicam uma fundamental ação anti-inflamatória dos taninos. O gráfico 8 mostra que a diminuição significativa (50 %) no rolamento de leucócitos frente a indução da inflamação pelo LPS é um dos mecanismos de ação anti-inflamatória da fração de taninos.

#### *Mouriri pusa:*

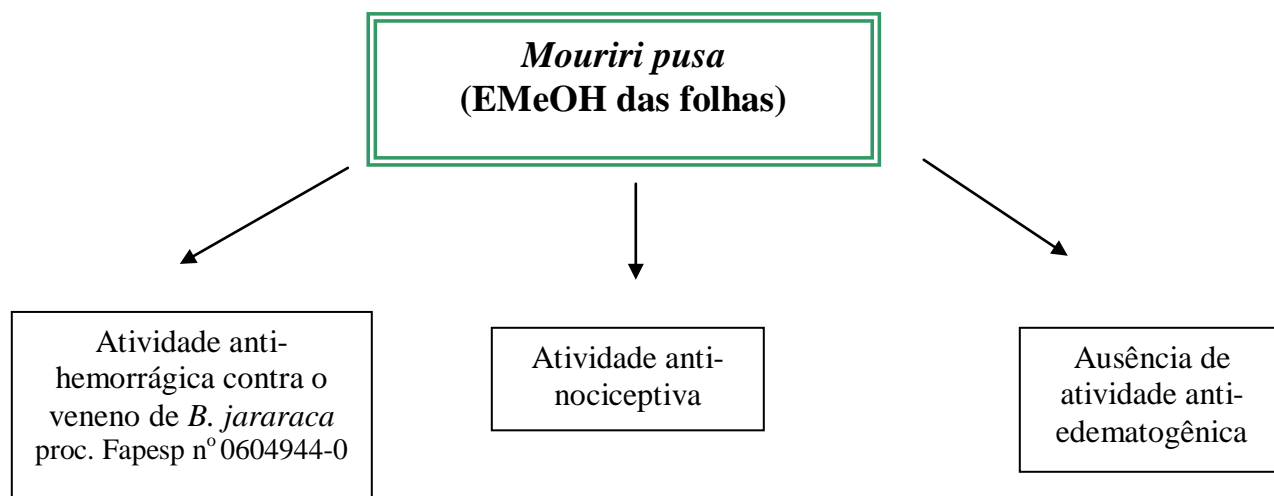
Embora os dados obtidos com *Rhamnidium elaeorcarpum* e *Davilla elliptica* nos levam a concluir sobre o papel dos taninos condensados no efeito anti-inflamatório dessas espécies, os dados obtidos com o extrato metanólico de *Mouriri pusa* conduziram a resultados contrastantes.

O perfil fitoquímico do extrato metanólico das folhas de *Mouriri pusa* revela a presença majoritária de taninos condensados (70 %) (Andreo e cols., 2006), mas diferentemente dos outros extratos, não apresentou atividade anti-edematogênica na dose de 15,62 mg/kg, *i.p.* Entretanto, apresentou atividade anti-nociceptiva semelhante a *R. elaeorcapum* porém na dose de 500 mg/kg, *p.o.* Esses resultados mostram a peculiaridade do efeito biológico do extrato de cada espécie, mesmo que esses extratos apresentem em seu perfil cromatográfico o predomínio do mesmo constituinte químico.

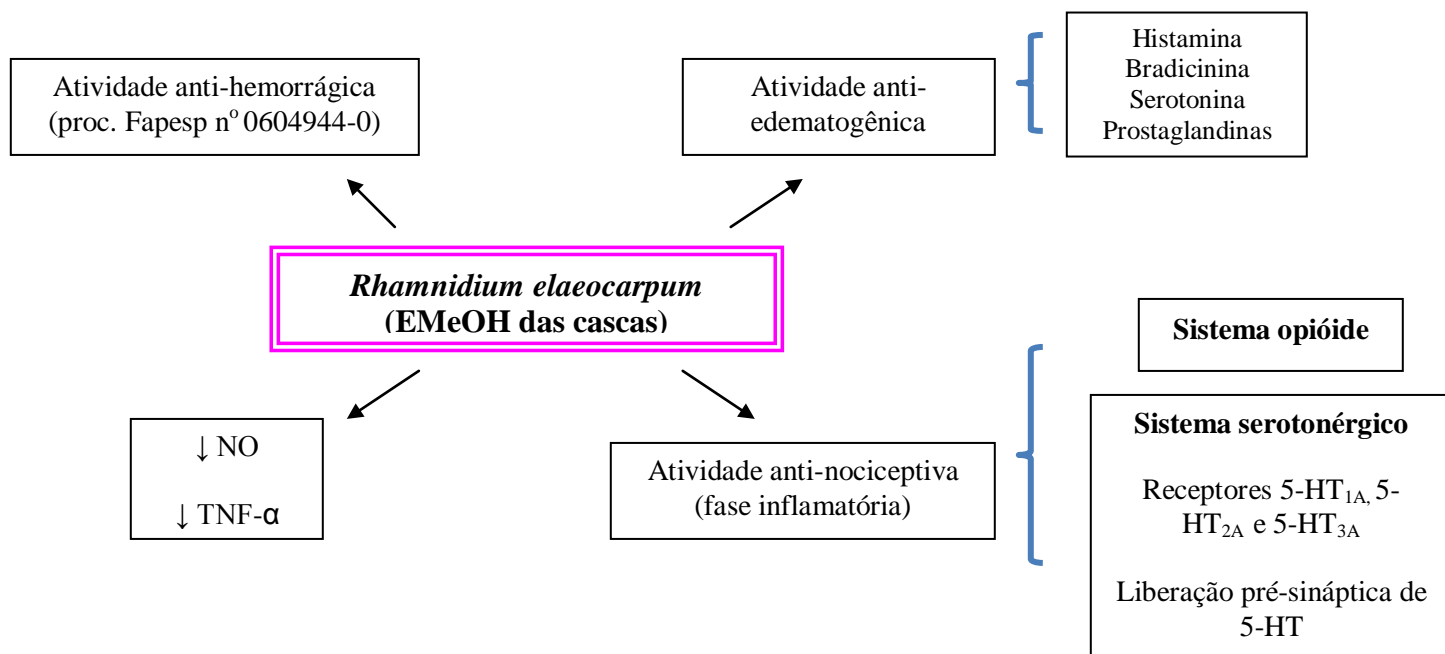
**Figura 3: Atividade anti-inflamatória de EMeOH de *Byrsonima crassa* (folhas).**



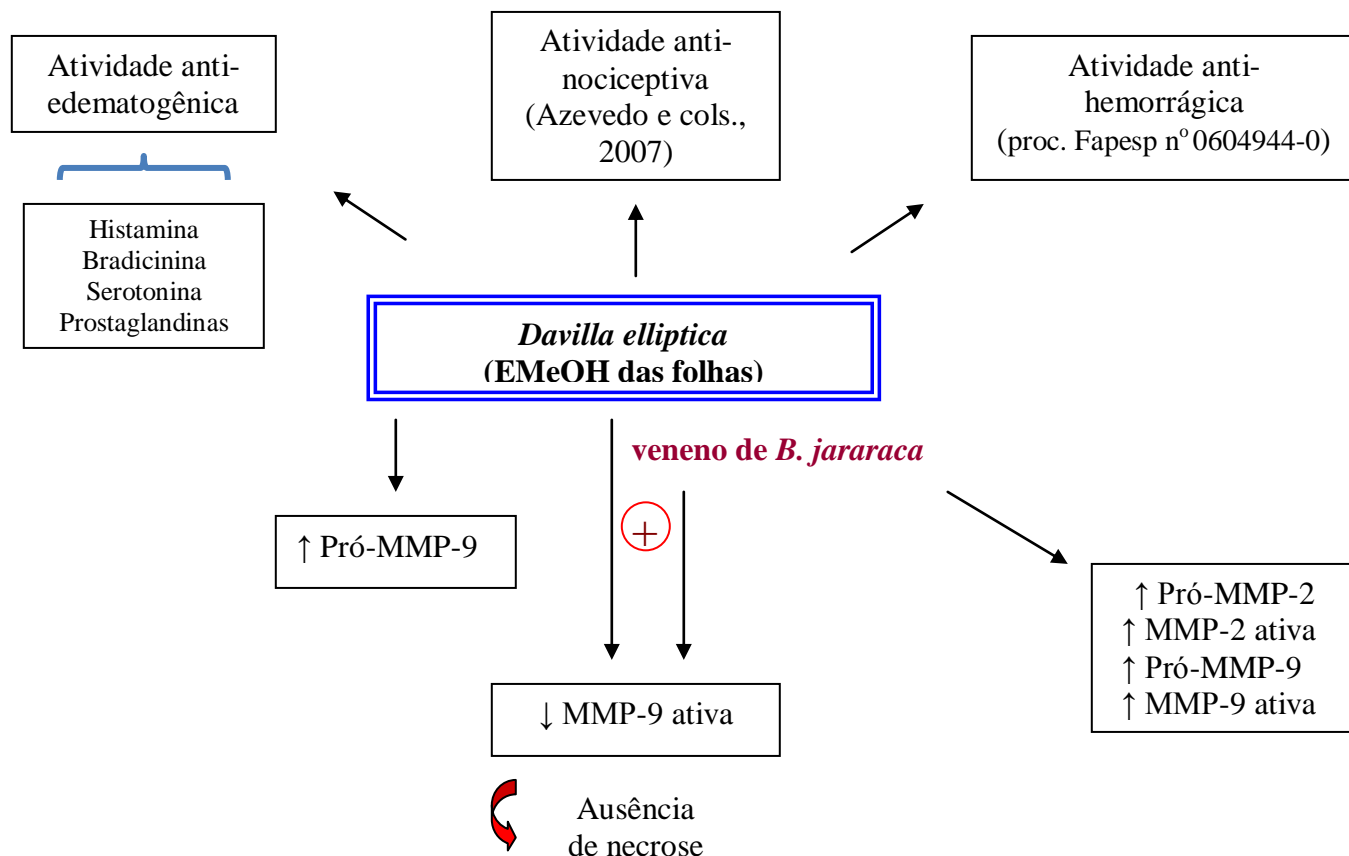
**Figura 4: Atividade anti-inflamatória de EMeOH de *Mouriri pusa* (folhas).**



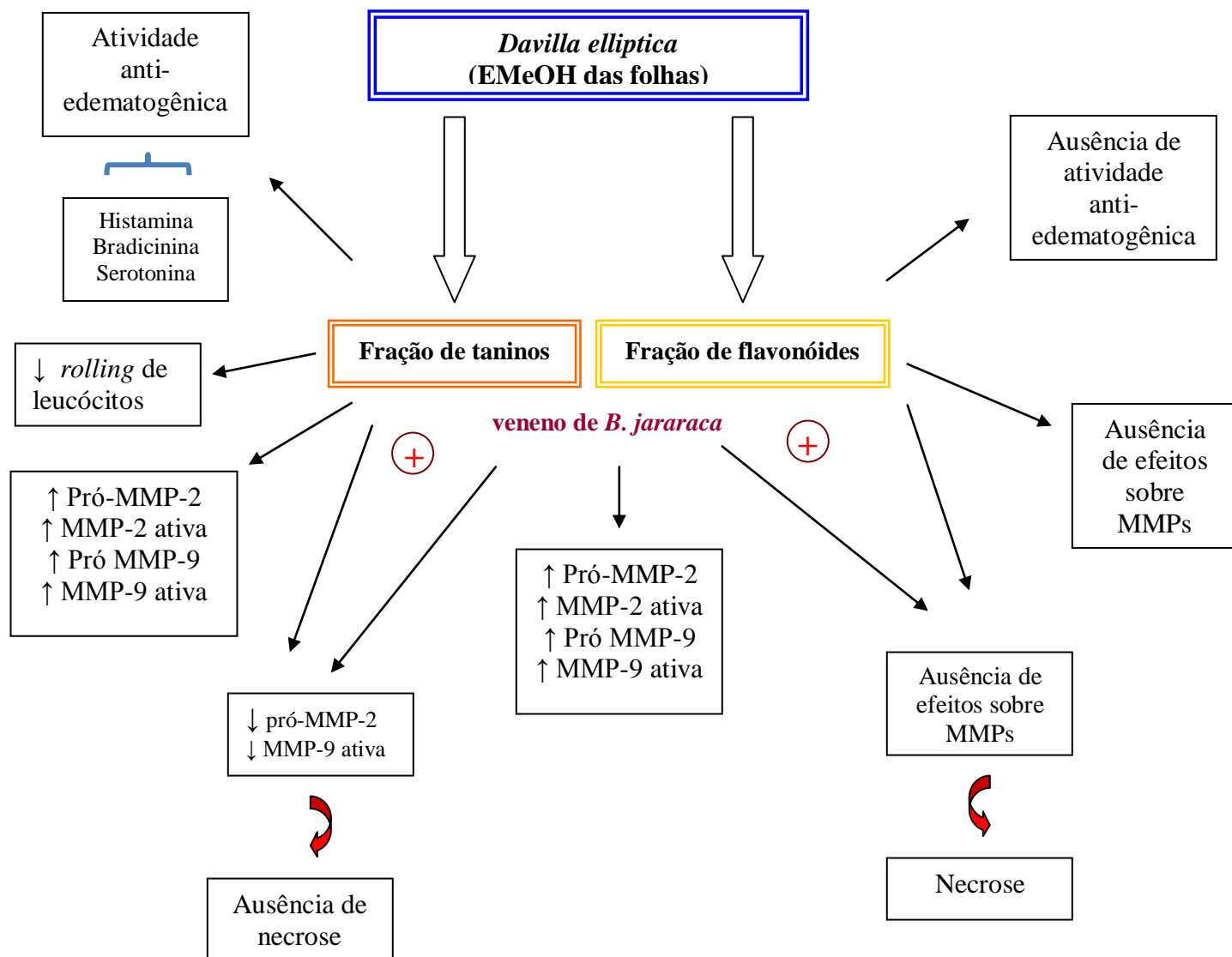
**Figura 5: Atividade anti-inflamatória de EMeOH *Rhamnidium elaeocarpum* (cascas).**



**Figura 6: Atividade anti-inflamatória de EMeOH *Davilla elliptica* (folhas).**



**Figura 7: Atividade anti-inflamatória das frações de taninos e flavonóides *Davilla elliptica*.**



## VII. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse projeto demonstram uma promissora atividade anti-inflamatória dos extratos que obtiveram capacidade de neutralização contra a hemorragia veneno de *Bothrops jararaca* com destaque para o extrato metanólico de *Rhamnidium elaeocarpum* e *Davilla elliptica*.

O envolvimento do sistema serotoninérgico, sistema opióide, diminuição de TNF- $\alpha$  e óxido nítrico estão entre os principais mecanismos de ação de *Rhamnidium elaeocarpum* no efeito anti-nociceptivo e anti-inflamatório .

Observamos a diminuição da atividade de MMP-9 ativa nas dermes desafiadas com veneno + extrato metanólico de *D. elliptica* e da diminuição da atividade da pró-MMP-2 e MMP-9 ativa nas dermes desafiadas com veneno + fração de taninos de *D. elliptica*. Taninos de *D. elliptica* diminuíram em 50 % o *rolling* de leucócitos durante o processo inflamatório induzido pelo LPS e provavelmente são os constituintes químicos responsáveis pela atividade anti-inflamatória desse extrato.

Sendo assim, essas espécies vegetais poderão ser úteis no desenvolvimento de anti-inflamatórios e de coadjuvantes no tratamento da lesão tecidual local nos acidentes botrópicos.



## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aimes, R.T., Quigley, J.P. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. **J. Biol. Chem.** 270 (11), 5872–5876, 1995.
- Alhaider A.A. Antinociceptive effect of ketanserin in mice: involvement of supraspinal 5-HT<sub>2</sub> receptors in nociceptive transmission. **Brain Res.** 543, 335–340, 1991.
- Amarquaye, A., Che, C.T., Bejar, E., Malone, M.H., Fong, H.H.S. A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. **Planta Medica** 60, 85-86, 1994.
- Anai, K., Sugiki, M., Yoshida, E., Maruyama, M. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon** 40, 63-68, 2002.
- Andreo, M.A., Ballesteros, K.V.R., Hiruma-Lima, C.A., Rocha, da L. R.M., Brito, A.R.M.S, Vilegas, W. Effect of *Mouriri pusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: Role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **Journal of Ethnopharmacology** 107, 431-441, 2006.
- Araújo, F.A.A., Santalúcia, M., Cabral, R.C. *Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos*. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Malaque, C.M.S., Haddad, Jr., V. (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Sarvier, São Paulo, pp. 6–12, 2003.
- Aruoma, O.I. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. **Free Radical Biology and Medicine** 20, 675–705, 1996.
- Azevedo, A.O., Campos, J.J., Galdino, G.S., Braga, F.C., Duarte, I.D.G., Perez, A.C. Antinociceptive effect from *Davilla elliptica* hydroalcoholic extract. **Journal of Ethnopharmacology** 113, 354-356, 2007.
- Barravieira, B. *Venenos animais: uma visão integrada*. Ed. de Publicações científicas, pp. 261-274, 1994.

- Bardin L., Lavarenne, J., Eschalier, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. **Pain** 86, 11 –18, 2000.
- Battelino, C., Piazza, R., Silva, A. M. M., Cury, Y., Farsky, S.H. Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon** 41, 583-593, 2003.
- Bee, A., Theakston, R.D.G., Harisson, R.A., Carter, S.D. Novel in vitro assays for assessing the haemorrhagic activity of snake venoms and for demonstration of venom metalloproteinase inhibitors. **Toxicon** 39, 1429, 2001.
- Beutler, B., Cerami, A. Tumor necrosis, cachexia, shock and inflammation: a common mediator. **Ann. Rev. Biochem.** 57, 505-518, 1988.
- Bjarnason, J.B., Fox, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol. Ther.** 62, 325- 372, 1994.
- Black, R.A., White, J.M. ADAMs: focus on the protease domain. **Curr. Opin. Cell Biol.** 10, 654-659, 1998.
- Bonavita, A.D.C, Costa, A.S., Pires, A. L. A., Neves-Ferreira, A.G.C., Perales, J., Cordeiro, R.S.B. Contribution of mast cells and snake venom metalloproteinases to the hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon** 47, 885-893, 2006.
- Borges, M.H., Alves, D.L.F., Raslam, D.S., Pilo-Veloso, D., Rodrigues, V.M., Homsibrandeburgo, M.I., de Lima., M.E. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on PLA2, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of *Crotalidae* venoms. **Journal of Ethnopharmacology** 98, 21-29, 2005.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle protein- dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248- 254, 1976.
- Caiaffa, W.T., Vlahov, D., Antunes, C.M.F, Oliveira, H.R., Diniz, C.R. Snake bite and antivenom complications in Belo Horizonte, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 88, 81-85, 1994.
- Calixto, J.B., Medeiros, R., Fernandes, E.S., Ferreira, J., Cabrini, D.A., Campos, M.M. Kinin B1 receptors: key G- protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **British Journal of Pharmacology** 143, 803-818, 2004.

- Calvo, T.R., Hiruma-Lima, C.A., Souza Brito, A.R.M., Vilegas, W. Triagem química em *Davilla elliptica*. **Anais do V Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu**, p. 19, 2002.
- Carli, C. B. A., Matos, D. C., Lopes, F. C. M., Maia, D.C.G., Dias, M. B., Sannomiya, M., Rodrigues, C. M., Andreo, M. A., Wagner, V., Colombo, L. L., Carlos, I. Z. Isolate flavonoids against Mammary Tumour Cells LM2. **Journal of Biosciences** 64c, 32-36, 2009.
- Caruso, C., Durand, D., Watanobe, H., Lasaga, M. NMDA and group I metabotropic glutamate receptor activation modulates substance P release from the arcuate nucleus and median eminence. **Neuroscience Letters** 393, 60-94, 2005.
- Catania, M.V., Hollingsworth, Z., Penney, J.B., Young, A.B. Phospholipase A2 modulates different subtypes of excitatory amino acid receptors: autoradiographic evidence. **J. Neurochem.** 60, 236–245,1993.
- Chacur, M., Picolo, G., Teixeira, C.F.P.,Cury, Y. Bradykinin is involved in hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon** 40, 1047-1051, 2002.
- Chen, Y., F., Tsai, H.Y., Wu, T.S. Anti-inflammatory and analgesic activities from root of *Angelica pubescens*. **Planta Medica** 61, 2-8, 1995.
- Chiesi, M. Schawaller, R. Inhibition of constitutive endothelial NO-synthase activity by tannin and quercetin. **Biochem. Pharmacol** 49 (4), 495-501, 1995.
- Clutterbuck, A.L., Harris, P., Allaway, D., Mobasher, A. Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. **The Veterinay Journal** xx (xx-xx), 2008.
- Collins, T. Acute and chronic inflammation. **Pathologic Basis of Disease**. 50-88, 1999.
- Costa, E.P., Clissa, P.B., Teixeira, C.F.P., Moura-da-Silva, A.M. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation. **Inflammation** 26, 13-17, 2002.
- Cunha, F.Q., Poole, S., Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology** 107, 660–664, 1992.
- Cury, Y, Teixeira, C.F.P., Farsky, S.H.P. Lack of effect of endogenous corticosteroids on the acute inflammatory reaction (edema) induced by *Bothrops jararaca* venom (Bjv) in rats. **Toxicon** 35, 773-776, 1997.

- Di Carlo, G., Mascoto, N., Izzo, A.A. Capasso, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences** 65, 337-353, 1999.
- Dias da Silva, W., Tambourgi, D.V., Campos, A. C. M. R., Magnoli, F., Petriavich, V.L., Kipnis, T.L. Complement activation by animal venoms. **J. Toxicol-Toxin** 14, 375-400, 1995.
- Dimitriadou, V., Buzzi, M.G., Moskowitz, M.A., Theoharides, T.C. Trigeminal sensory fiber stimulation induces morphological changes reflecting secretion in rat dura mater mast cells. **Neuroscience** 44, 97-112, 1991.
- Domeij, H., Yucel-Lindberg, T., Modeer, T. Signal pathways involved in the production of MMP-1 and MMP-3 in human gingival fibroblasts. **European Journal of Oral Sciences** 110, 302–306, 2002.
- Dray, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.** 75, 125-131, 1995.
- Elisabetsky, E. Sociopolitical, economical and ethical issues in medicinal plant research. **Journal Ethnopharmacology** 32, 235-239, 1991.
- Escalante, T., Núñez, J., Moura-da-Silva, A.M., Rucavado, A., Theakston, R.G.D., Gutiérrez, J.M. Pulmonary hemorrhage induced by jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 193, 17-28, 2003.
- Farsky, S.H.P., Gonçalves, L.R.C.G., Cury, Y. Characterization of local tissue damaged evoked by *Bothrops jararaca* venom in the rat connective tissue microcirculation: an intravital microscopic study. **Toxicon** 37 (7),1079-1083, 1999.
- Fields, H.L., Heinricher, M.M., Mason, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annu. Rev. Neurosci.** 14, 219- 245, 1991.
- Gonçalves, L.R.C., Chudzinski-Tavassi, A.M. High molecular mass kininogen inhibits metalloproteinases of *Bothrops jararaca* snake venom. **Bioch. and Bioph. Res. Com.** 318, 53-59, 2004.
- Green, L.G., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.** 126, 55-63, 1982.
- Gutierrez, J.M., Lomonte, L.B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review, **Memórias do Instituto Butantan** 51, 211-223, 1989.

- Hackett, A.M. *Plant flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationship*. V. Cody, E. Middleton and J. Harboune, pp. 113-124, Alan R. Liss Inc. Nem York, 1986.
- Hasson, S.S., Theakston, R.D.G., Harrison, R.A. Antibody zymography: a novel adaptation of zymography to determine the protease neutralising potential of specific antibodies and snake antivenoms. **Journal of Immunological Methods** 292, 131–139, 2004.
- Hatano, T., Yoshida, T., Hemingway, R. Interactions of flavonoids with peptides and proteins and conformations of dimeric flavonoids in solution. **Academic/Plenum Publishers**, pp. 509–526, 1999.
- Heinricher, M.M., Tavares, I., Leith, J.L., Lumb, B.M. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain Research Review** 60, 214-225, 2009.
- Henriques, M.G., Silva, P.M., Martins, M.A., Flores, C.A., Cunha, F.Q., Assrey- Filho J., Cordeiro, R.S. Mouse paw edema. A nem model for inflammation ? **Braz J Med Biol Res.** 243-249, 1987.
- Hite, L.A., Jia, L.G., Bjarson, J.B., Fox, J.W., cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Archives of Biochemistry and Biophysis** 308, 182-191, 1994.
- Ho, S.C., Hwang, L.S., Shen, Y.I., Lin, C.C. Supsressive effect of a proanthocyanidin-rich extract from Logan (*Dimocarpus logan* Lour.) flowers on nitric oxide production in LPS-stimulated macrophages cells. **J. Agric. Food Chem.** 55, 10664–10670, 2007.
- Hohmann, A.G., Suplita, R.L., Bolton, N.M., Neely, M.H., Fegley, D., Mangieri, R., Krey, J.F., Walker, J.M., Holmes, P.V., Crystal, J.D., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., Piomelli, D. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature** 435, 1108–1112, 2005.
- Hunskar, S., Fasmer, O.B., Hole, K. Formalin test in mice a useful technique for evaluating mild analgesic. **J. Neurosci. Methods** 14, 69-76, 1985.
- Hunskar, S., Hole, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain** 30(1), 103-104, 1987.
- Hylden, J.L., Wilcox, G.L. Intrathecal serotonin in mice: analgesia and inhibition of a spinal action of substance P. **Life Sci** 33, 789–795, 1983.

- Isenburg, J.C., Simionescu, D.T., Vyavahare, N.R. Elastin stabilization in cardiovascular implants: improved resistance to enzymatic degradation by treatment with tannic acid **Biomaterials**, 3293, 3306, 2004.
- Ito, A., Mukaiyama, A., Itoh, Y., Nagase, H., Thogersen, I.B., Enghild, J.J., Sasaguri, Y., Mori, Y. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. The **Journal of Biological Chemistry** 271, 14657–14660, 1996.
- James, M.J., Penglis, P.S., Caughey, G.E., Demasi, M., Clenland, L.G. Eicosanoids production by human monocytes: does COX-2 contribute to a self-limiting inflammatory response ? **Inflamm. Res.** 50, 249-253, 2001.
- Just, M.J., Recio, M.C., Giner, R.M., Cuellar, M.J., Manez, S., Bilia, A.R., Rios, J.L. Anti-inflammatory activity of unusual lupine saponins from *Bupleurum fruticosens*. **Planta Medica** 64, 404-407, 1998.
- Kamiguti, A.S., Hay, C.R.M., Theakston, R.D.G, Zuzel, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon** 34, 627-642, 1996.
- Kamiguti, A.S., Theakston, R.D.G., Desmond, H., Hutton, R.A. Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon** 29, 1097- 1105, 1991.
- Kasama, T., Strieter, R.M., Lukcas, N.W., Lincoln, P.M., Burdick, M.D. Kunkel, S.L. Interferon gamma modulates the expression of neutrophil-derived chemokines. **Journal of Investigative Medicine** 43, 58-67, 1995.
- Kerrigan, K.R. Venomous snakebite in eastern Ecuador. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.** 44, 93-99, 1991.
- Koshy, P.J., Lundy, C.J., Rowan, A.D., Porter, S., Edwards, D.R., Hogan, A., Clark, I.M., Cawston, T.E. The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: a time-course study using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. **Arthritis and Rheumatism.** 46, 961–967, 2002.
- Król, W., Czuba, Z.P., Threadgill, M.D., Cunningham, B.D.M., Pietsz, G. Inhibition of nitric (NO) production in murine macrophages by flavones. **Biochemical Pharmacology** 50, 1031-1035, 1995.

- Kwon, K.H., Murakami, A., Tanaka, T., Ohigashi, H. Dietary rutin, but not its aglycon quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium induced experimental colitis in mice: attenuation of proinflammatory gene expression. **Biochem. Pharmacol.** 69, 395-406, 2005.
- Lam, H.H.D., Hanley, D.F., Trapp, B.D., Saito, S., Raja, S., Dawson, T.M., Yamaguchi, H. Induction of spinal cord neuronal nitric oxide synthase (NOS) after formalin injection in the rat hind paw. **Neuroscience Letters** 210, 201–204, 1996.
- Landolfi, R., Mower, R.L., Steiner, M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. **Biochemical Pharmacology** 33, 1525-1530, 1984.
- Laupattarakasem, P., Wangsrimongkol, T., Surarit, R., Hahnvajanawong, C. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory potential of *Cryptolepis buchanani*. **Journal of Ethnopharmacology** 108, 349-354, 2006.
- Lee KS, Jin SM, Kim HJ, Lee YC (2003) Matrix metalloproteinase inhibitor regulates inflammatory cell migration by reducing ICAM-1 and VCAM-1 expression in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.** 111, 1278–84.
- Le Bars, D., Goraziu, M., Cadden, S.W. Animal models of anti-nociception. **Pharmacological Review** 53, 597-652, 2001.
- Leith, J.L., Wilson, A.W., Donaldson, L.F., Lumb, B.M. Cyclooxygenase-1-derived prostaglandins in the periaqueductal gray differentially control C- versus A-fiber-evoked spinal nociception. **J. Neurosci.** 27, 11296–11305, 2007.
- Levy, L. Carrageenan paw oedema in the mouse. **Life Sciences** 8, 601-606, 1969.
- Maleki, N., Nayebi, A.M., Gariani, A. Effects of central and peripheral depletion of serotonergic system on carrageenan-induced paw oedema. **International Immunopharmacology** 5, 1723-1730, 2005.
- Malucelli, B.E., Mariano, M. The haemorrhagic exudate and its possible relationship to neurogenic inflammation. **J. Pathol.** 130, 193-200, 1980.
- Martz, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon** 30, 1131-1142, 1992.

- Maruyama, M., Sugiki, M., Yoshida, E., Shimaya, K., Mihara, H. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage. **Toxicon** 30, 1387-1397, 1992.
- Meller, S.T., Gebhart, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain** 52, 127–136, 1993.
- Menezes, C.M., Furtado, M.F., Travaglia-Cardoso, S.R., Camargo, A.C.M., Serrano, S.M.T. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon** 47, 304- 312, 2006.
- Middleton, E. Kandaswami, C., Theoharides, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews** 52, 673-751, 2000.
- Middleton, E., Drzewiecki, G. Flavonoids inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. **Biochemical Pharmacology** 33, 3333- 3338, 1984.
- Millan, M.J. Serotonin (5-HT) and pain: a reappraisal of its role in the light of receptor multiplicity. **Semin. Neurosci** .7, 409– 419, 1995.
- Millan, M.J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.** 66, 355-474, 2002.
- Milner, J.M., Cawston, T.E. Matrix metalloproteinase knockout studies and the potential use of matrix metalloproteinase inhibitors in the rheumatic diseases. **Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy** 4 (3), 363–375, 2005.
- Ministério da Saúde, Brasil. *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes Ofídicos. Coordenação de Zoonoses e Animais Peçonhentos*. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 1998.
- Moreira, V., Zamuner, R.S., Wallack, J.L., Teixeira, C.F.P. *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms elicit distinct responses regarding to production of prostaglandins E2 e D2, and expression of cyclooxygenases. **Toxicon** 49, 615-624, 2007.
- Mors, W.B., Nascimento, M.C., Pereira, N.A. Plant natural products active snake bite the molecular approach. **Phytochemistry** 55, 627-642, 2000.
- Mosmann, T. **J. Immunol . Methods** 65, 55-63, 1983.
- Moura- da- Silva, A.M., Laing, G.D., Paine, M.J.I., Dennison, J.M.T.J., Politi, V., Crampton, J.M., Theakston, R.D.G. Processing of protumor necrosis factor- $\alpha$  by venom



- metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Eur. J. Immunol.** 26, 2000-2005, 1996.
- Moura-da-Silva, A.M., Cardoso, D.F., Tanizaki, M.M. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. **Toxicon** 28, 1293-1301, 1990.
- Mousa, S.A., Zhang, Q., Sitte, N., Ji, R., Stein, C. Beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. **J. Neuroimmunol.** 115 (1-2), 71-78, 2001.
- Mousa, S.A., Cheppudira, B.P., Shaqura, M., Fischer, O., Hofmann, J., Hellweg, R., Schafer, M. Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain. **Brain** 130, 502-513, 2007.
- Murphy, G., Nagase, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine** 29, 290-308, 2008.
- Nagase, H., Woessner, J.F. Matrix metalloproteinases. **J. Biol. Chem.** 274, 21491-21494, 1999.
- Nakagawa, H., Sakata, K. Partial purification and characterization of exudate gelatinase in the acute phase of carrageenan- induced inflammation in rats. **J. Biochem.** 100, 1499-1506, 1996.
- Newby, A.C. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. **Physiol Rev.** 85 (1), 1-31, 2005.
- Okuda, K., Sakurada, C., Takahashi, M., Yamada, T., Sakurada, T. Characterization of nociceptive responses and spinal releases of nitric oxide metabolites and glutamate evoked by different concentrations of formalin in rats. **Pain** 92, 107-115, 2001.
- Osadebe, P.O., Okoye, F.B.C. Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of *Alchornea cordifolia* leaves. **Journal of Ethnopharmacology** 89, 19-25, 2003.
- Paixão-Cavalcante, D., van den Berg, C.W., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Fernandes-Pedrosa, M.F., Okamoto, C.K., Tambourgi, D.V. Role of matrix metalloproteinases in Ha CaT keratinocytes apoptosis induced by loxocles venom sphingomyelinase D **Journal of Investigative Dermatology** 127, 1410-1418, 2007.

- Parada, C.A., Tambeli, C.H., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience** 102, 937–944, 2001.
- Parks, W.C. Matrix metalloproteinases in repair. **Wound Rep. Reg.** 7, 423–432, 1999.
- Patterson, M.L., Atkinson, S.J., Knauper, V., Murphy, G. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. **FEBS Lett.** 503 (2-3), 158–162, 2001.
- Paula, L.S., W.F., Malheiro, A., Carlos, D., Faccioli, L.H. Differential modulation of cell recruitment and acute edema in a modelo of *Polybia paulista* venom-induced inflammation. **International Immunopharmacology** 6, 182-189, 2006.
- Petrevich, V.L., Teixeira, C.F.P., Tambourgi, D.V., Gutierrez, J.M. Increments in serum cyotokines and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. **Toxicon** 38, 1253- 1266, 2000.
- Pott, A., Pott, V.J. *Plantas do Pantanal*. Editora da Embrapa, Corumbá, p.103, 1994.
- Pradelles, P., Grassi, J., Mac Louf, J. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. **Analyt. Chem.** 57, 1170-1173, 1985.
- Rao, Y.K. Fang, S.H., Tzeng, Y.M. Anti-inflammatory activies of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. **Journal of Ethnopharmacology** 100, 249-253, 2005.
- Ribeiro, L.A., Pires de Campo, V.A.F., Albuquerque, M.J., Takaoka, N.Y. Acidentes Ofídicos no Estado de São Paulo. **Revista da Associação Médica do Brasil** 39, 4-7, 1993.
- Rittner, H.L., Machelska, H., Stein, C. Immune system, pain and analgesia. In: Basbaum, A.I., Kaneko, A., Shepherd, G.A., Westheimer, G. (Eds.), Pain. The Senses: A Comprehensive Reference, Vol. 5. Academic Press, San Diego, pp. 407–428, 2008.
- Rodrigues, C.M., Rinado, D., Sannomiya, M., dos Santos, L.C., Montoro, P., Piacente, S., Pizza, C., Vilegas, W. High-performance liquid chromatographic separation and identification of polyphenolic compounds from the infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. **Phytochem. Anal.** 19, 17-24, 2008.

- Rodrigues, V. E.; Carvalho, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais do Cerrado na região do Alto Rio – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras – MG, 25 (1), 102-123, 2001.
- Rosenfeld, G. Syntomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. *Venomous Animals and their Venoms*. **Academic Press**, pp. 345-384, 1971.
- Rotelli, A.E., Guardia, T., Juárez, A.O., Rocha, N.E., Pelzer, L.E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research** 48, 601-606, 2003.
- Rucavado, A., Nuñez, J., Gutiérrez, J.M. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Int. J. Exp. Pathol.** 79, 245–254, 1998.
- Rucavado, A., Escalante, T., Teixeira, C.F., Fernandes, C.M., Díaz, C., Gutiérrez, J.M. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of snake *Bothrops asper*. **Mediator Inflamm.** 11, 121-128, 2002.
- Sannomiya, M., Rodrigues, C.M., Coelho, R.G., Santos, dos L.C., Hiruma-Lima, C.A., Souza-Brito, A.R.M., Vilegas, W. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). **Journal of Chromatography A** 1035, 47-51, 2004.
- Saravia-Otten, P., Frisan, T., Thelestam, M., Gutiérrez, J.M. Membrane independent activation fibroblast proMMP-2 by snake venom: a novel roles for venom proteinases. **Toxicon** 44, 749-764, 2004.
- Sasaki, M., Ishizaki, K., Obata, H., Goto, F. Effects of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors on the modulation of nociceptive transmission in rat spinal cord according to the formalin test. **Eur. J. Pharmacol.** 424, 45–52, 2001.
- Sayyah, M., Hadidi, N., Kamalinejad, M. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats. **Journal Ethnopharmacology** 92, 325-329, 2004.
- Sawynok J., Reid A. Interactions of descending serotonergic systems with other neurotransmitters in the modulation of nociception. **Behav Brain Res** 73, 63 – 68, 1996.

- Scalbert, A., Déprez, S., Mila, I., Albrecht, A.M., Huneau, J.F., Rabot, S. Proanthocyanidins and human health: Systemic effects and local effects in the gut. **Biofactors** 13, 115-120, 2000.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach C., Rémésy, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. **Biomedicine Pharmacotherapy** 276-282, 2002.
- Shapiro, S.D. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. **Curr. Opin. Cell. Biol.** 10, 602–608, 1998.
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain** 38, 347- 352, 1989.
- Silbernagl, S., Lang, F. *Atlas de Fisiopatologia*. Flammarion 20, 320-321, 2000.
- Silva, S.R., Silva, A.P., Munhoz, C.B., Silva Jr., M.C., Medeiros, M.B. Guia de plantas do Cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros. **Ed. WWF**, Brasilia, p.42, 2001.
- Sommerfeld, O.S., Melanchauski, L.S., Hiruma-Lima, C.A., Honda, N.K., Brum, R.L., Coelho, R.G. Análise química preliminar e avaliação farmacológica do extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* (Rhamnaceae). **30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira (SBQ)**, 2006.
- Stein, C., Schäfer, M., Machelska, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nat. Med.** 9 (8), 1003–1008., 2003.
- Stein, C., Zöllner, C. Opioids and sensory nerves. In: **Pharmacology of Sensory Nerves. Handbook of Experimental Pharmacology** 194, 2009.
- Sternlicht, M.D. Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 17, 463- 516, 2001.
- Takeya H., Nishida, S., Nishino, N., Makinose, Y., Omori Satoh, T., Nikai, T., Sugihara, H., Iwagana, S. Primare structures of platelet aggregation inhibitors (desintegrin) autoproteolytically released from snake venom hemorrhagic metalloproteinases and new fluorogenic peptide substrates for these enzymes. **J. Biochem.** 113, 473-483, 1993.
- Tapiero, H., Ba, G.N., Couvreur, P., Tew, K.D. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomedicine and Pharmacotherapy** 56, 215-222, 2002.

- Tassorelli, C., Greco, R., Wang, D., Sandrini, G., Nappi, G. Prostaglandins, glutamate and nitric oxide synthase mediate nitroglycerin-induced hyperalgesia in the formalin test. **European Journal of Pharmacology** 534, 103-107, 2006.
- Teather, L.A. Packard, M.G., Bazan, N.G, Post-training cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition impairs memory consolidation. **Learning & Memory** 9, 41-47, 2002.
- Teixeira, C.F.P., Cury, Y., Oga, S., Jancar, S. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activation factor (PAF). **Toxicon** 32, 419-426, 1994.
- Teixeira, S. Bioflavonoids: proanthocyanidins and quercetin and their potential roles in treating musculoskeletal conditions. **Orthop. Sports Phys. Ther.**, 357-363, 2002.
- Teixeira, C., Cury, Y., Moreira, V., Picolo, G., Chaves, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon** 54, 67-76, 2009.
- Thabrew, M.I., Senaratna,L.,Samarawickrema, N., Munasinghe, C. Antioxidant potential of two polyherbal. preparations used in ayurveda for the treatment of rheumatoid arthritis. **Journal of Ethnopharmacology** 76, 285–291, 2001.
- Treben, H.A., Calixto, J.B. Pharmacological evaluation of rat paw edema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents Action** 26, 292-300, 1989.
- Tsuzaki, M., Guyton, G., Garrett, W., Archambault, J.M., Herzog, W., Almekinders, L., Bynum, D., Yang, X., Banes, A.J. IL-1 beta induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 beta and IL-6 in human tendon cells. **Journal of Orthopaedic Research** 21, 256–264, 2003.
- Uchida, S.,Hirai, K., Hatanaka, J.,Hanato,J., Umegaki, K.,Yamada, S. Antinociceptive effects of St. John's Wort, *Harpagophytum Procumbens* extract and grape seed proanthocyanidins extract in mice. **Biol. Pharm. Bull.** 31(2) 240—245, 2008.
- Van den Worm, E., Beukeiman, C.J., Van den Berg, Kores, B.H., LARBADIE, R.P., Van Dijk, H. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. **European Journal of Pharmacology** 433, 225-230, 2001.
- Voronov, E., Apte, R.N., Sofer, S. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. **J. Venom. Anim. Toxins** 5, 5-33, 1999.

- Vu, T.H., Werb, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology [Review]. **Genes Dev.** 14 (17), 2123–2133, 2000.
- Wasil, M., Biologically significant scavenging of the myeloperoxidase derived oxidant hypochlorous acid by some anti-inflammatory drugs. **Biochemical Pharmacology** 36, 3847, 1987.
- Williams, C.N., Honet, J.R.S., Harbone, J.B., Greenham, J., Eeagles, J.A biologically active lipophilic flavonols from *Tanacetum parthenium*. **Phytochemistry** 38, 267-270, 1995.
- Yang, L.L., Lee, C.-Y., Yen, K.-Y. Induction of apoptosis by hydrolysable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. **Cancer Letters** 157, 65–75, 2000.
- Zamuner, S.R., Gutiérrez, J.M., Muscará, M.N., Teixeira, S.A., Teixeira, C.F.P. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venom trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. **Toxicon** 39, 1505-1513, 2001.
- Zamuner, S.R., Zuliani, J.P., Fernandes, C.M., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F.P. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. **Toxicon** 46, 806-813, 2005.
- Zhou, L., Yan, C., Gieling, R.G. Kida, Y., Garner, W., Li, W., Yuan- Ping, H. Tumor necrosis factor-alpha induced expression of matrix metalloproteinase-9 through p21-activated Kinase-1. **BMC Immunology** 10; 15, 2009.

**ANEXO 1**

## ANEXO 1:

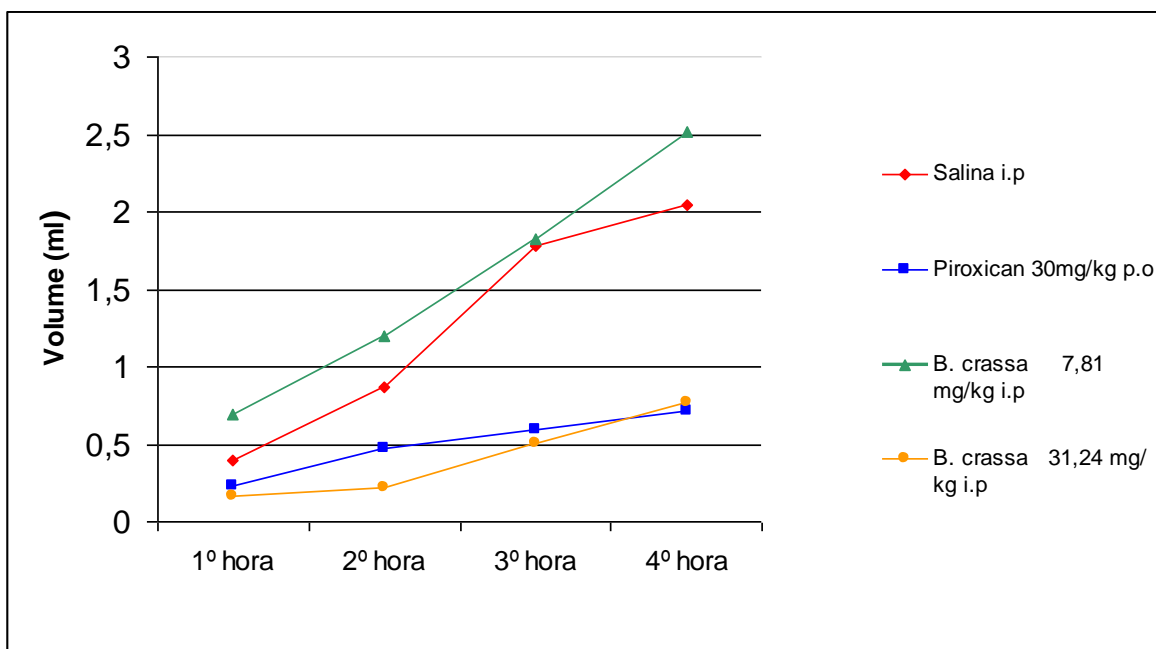
**Tabela 1: Atividade anti-edematogênica do extrato metanólico das folhas de *Byrsonima crassa* nas doses de 7,81 mg/kg e 31,24 mg/kg.**

<i>Tratamento</i>	<i>1º hora</i>	<i>2º hora</i>	<i>3º hora</i>	<i>4º hora</i>
Salina (i.p)	0.40 ± 0.09	0.87 ± 0.18	1.78 ± 0.27	2.04 ± 0.25
Piroxicam 30mg/kg (p.o)	0.23 ± 0.06	0.47 ± 0.12	0.59 ± 0.17**	0.72 ± 0.25**
<i>B. crassa</i> 7.81 mg/kg (i.p)	0.69 ± 0.24	1.20 ± 0.26	1.83 ± 0.25	2.52 ± 0.31
<i>B. crassa</i> 31.24 mg/kg (i.p)	0.16 ± 0.04	0.22 ± 0.04	0.50 ± 0.11**	0.77 ± 0.16**

ANOVA  $F_{(3,23)} = 2.75$  para 1º hora.  $F_{(3,23)} = 5.92$  para 2º hora.  $F_{(3,23)} = 12.40$  para 3º hora.  $F_{(3,23)} = 13, 50$  para 4º hora. \*\*  $p < 0,01$ . Teste de Dunnett Os resultados foram expressos como média em mililitros ± erro padrão (n=5-7).

**Gráfico 1: Evolução da atividade anti-edematogênica do extrato metanólico das folhas de *Byrsonima crassa* nas doses de 7,81 mg/kg e 31,24 mg/kg durante 4 horas.**



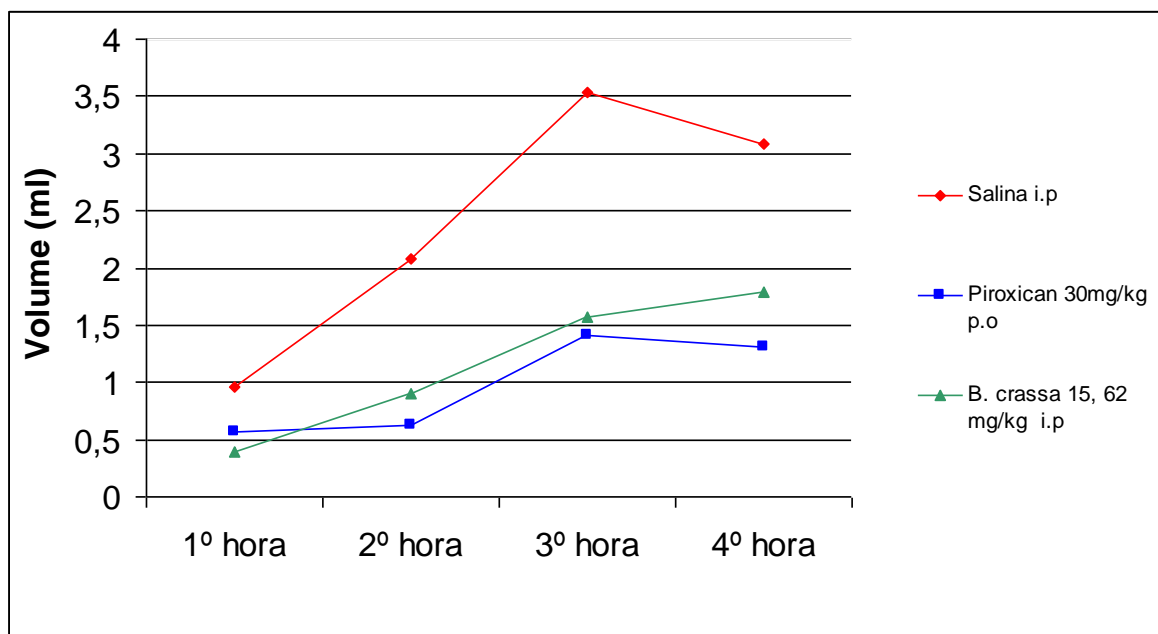


**Tabela 2: Atividade anti-edematogênica do extrato metanólico das folhas de *Byrsonima crassa* na dose de 15,62 mg/kg.**

Tratamento	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora
Salina (i.p)	0,96 ± 0,22	2,07 ± 0,47	3,54 ± 0,31	3,08 ± 0,31
Piroxicam 30mg/kg (p.o)	0,56 ± 0,11	0,62 ± 0,18**	1,41 ± 0,32**	1,31 ± 0,17**
<i>B. crassa</i> 15,62 mg/kg (i.p)	0,40 ± 0,08**	0,89 ± 0,26*	1,57 ± 0,55**	1,78 ± 0,47*

ANOVA  $F_{(2,16)} = 3,74$  para 1ª hora.  $F_{(2,16)} = 6,409$  para 2ª hora.  $F_{(2,16)} = 8,645$  para 3ª hora.  $F_{(2,16)} = 8,658$  para 4ª hora. Teste de Dunnett \*\*  $p < 0,01$ . \*  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média em mililitros ± erro padrão (n=5-7).

**Gráfico 2: Evolução da atividade anti-edematogênica do extrato metanólico das folhas de *Byrsonima crassa* na dose de 15,62 mg/kg durante 4 horas.**

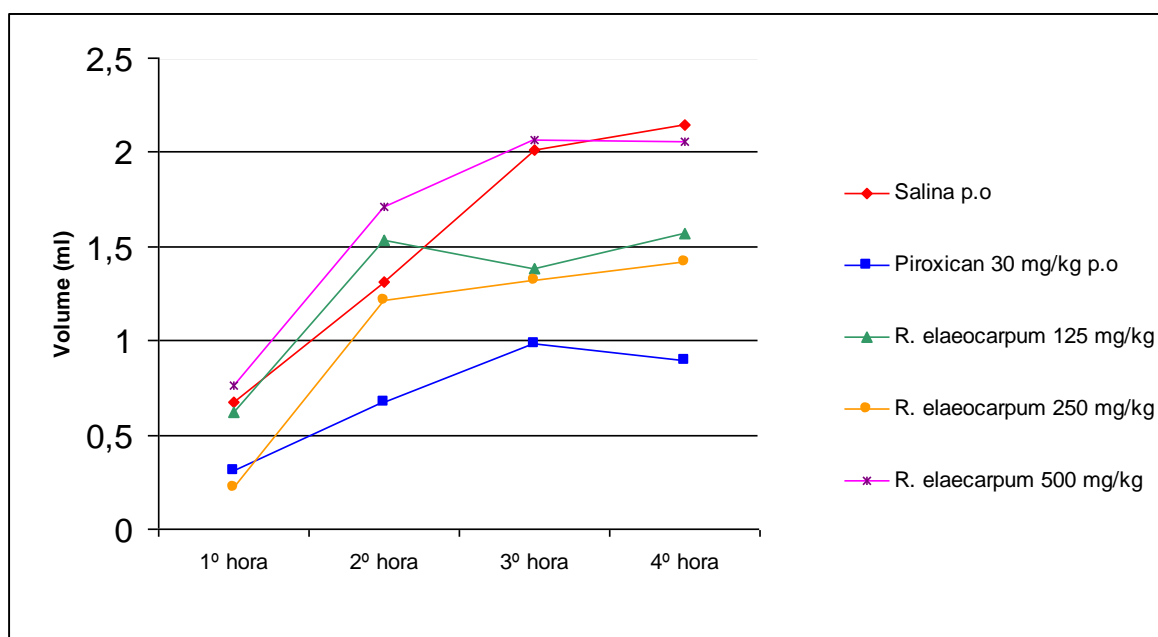


**Tabela 3: Efeito anti-edematogênico da administração oral do extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* nas doses de 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg.**

Tratamento	1 <sup>o</sup> hora	2 <sup>o</sup> hora	3 <sup>o</sup> hora	4 <sup>o</sup> hora
Salina (p.o)	0.67 ± 0.13	1.31 ± 0.18	2.01 ± 0.15	2.15 ± 0.22
Piroxicam 30 mg/kg (p.o)	0.31 ± 0.08	0.68 ± 0.15	0.98 ± 0.19**	0.89 ± 0.15**
<i>R. elaeocarpum</i> 125 mg/kg (p.o)	0.62 ± 0.21	1.53 ± 0.18	1.39 ± 0.23	1.57 ± 0.44
<i>R. elaeocarpum</i> 250 mg/kg (p.o)	0.22 ± 0.07	1.21 ± 0.33	1.32 ± 0.20	1.42 ± 0.25
<i>R. elaeocarpum</i> 500 mg/kg (p.o)	0.77 ± 0.19	1.71 ± 0.28	2.06 ± 0.27	2.06 ± 0.36

ANOVA  $F_{(5,34)} = 2,29$  para 1<sup>o</sup> hora.  $F_{(5,34)} = 3,80$  para 2<sup>o</sup> hora.  $F_{(5,34)} = 5,53$  para a 3<sup>o</sup> hora.  $F_{(5,34)} = 3,80$  para 4<sup>o</sup> hora. Teste Dunnett \*\*  $p < 0,01$ . Os resultados foram expressos como média em mililitros ± erro padrão (n=5-9).

**Gráfico 3: Evolução da atividade anti-edematogênica do extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* nas doses de 125, 250, 500 mg/kg durante 4 horas.**

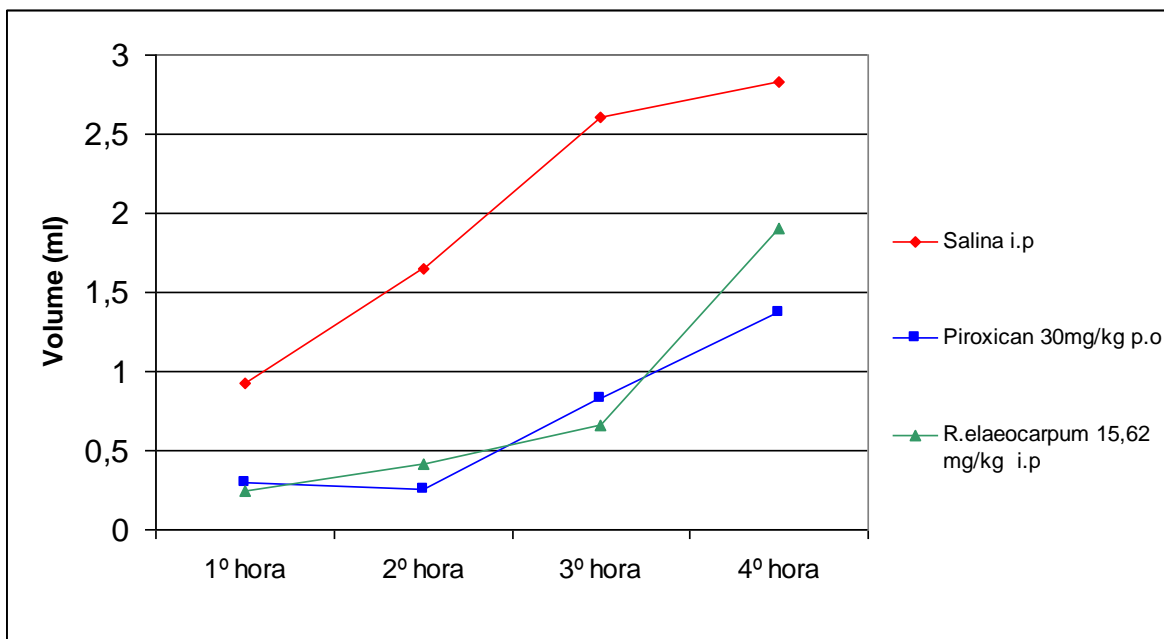


**Tabela 4: Efeito anti-edematogênico da administração intraperitoneal do extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* na dose de 15,62 mg/kg.**

Tratamento	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora
Salina (i.p)	0.93 ± 0.19	1.64 ± 0.30	2.61 ± 0.21	2.83 ± 0.20
Piroxicam 30mg/kg (p.o)	0.30 ± 0.11**	0.26 ± 0.04**	0.83 ± 0.14**	1.37 ± 0.24*
<i>R.elaeocarpum</i> 15.62 mg/kg (i.p)	0.25 ± 0.12*	0.42 ± 0.11**	0.66 ± 0.18**	1.91 ± 1.68

ANOVA  $F_{(2,14)} = 6,90$  para 1ª hora.  $F_{(2,14)} = 16,12$  para 2ª hora.  $F_{(2,14)} = 36,52$  para 3ª hora.  $F_{(2,14)} = 5,11$  para 4ª hora. Teste Dunnett \*\*  $p < 0,01$ . Os resultados foram expressos como média em mililitros ± erro padrão (n=5).

**Gráfico 4: Evolução da atividade anti-edematogênica do extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* na dose de 15,62 mg/kg durante 4 horas.**

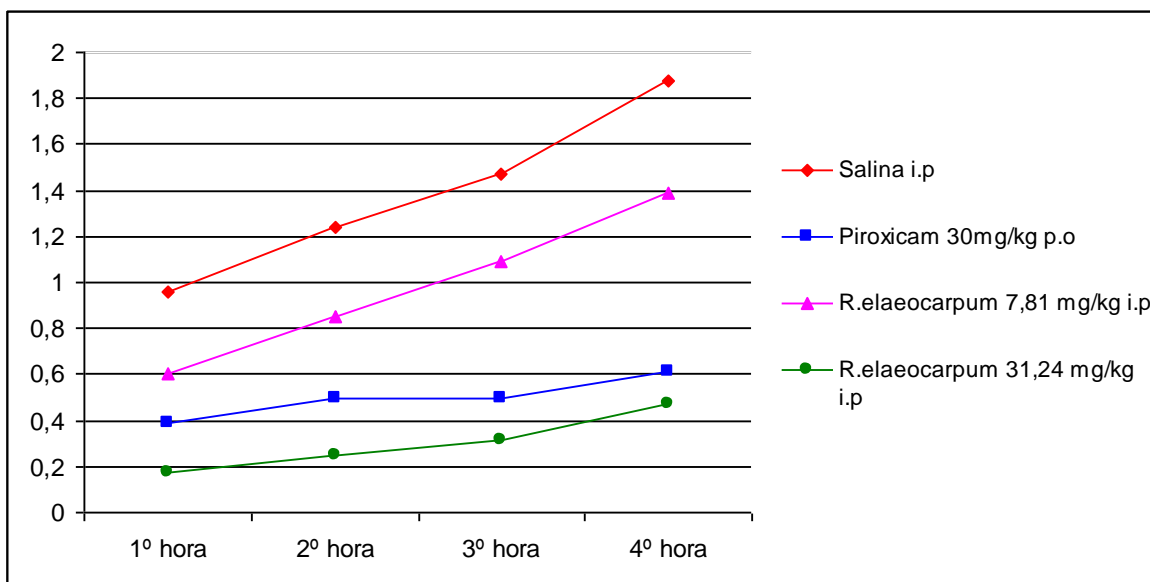


**Tabela 5: Efeito anti-edematogênico da administração intraperitoneal do extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* nas doses de 7,81 mg/kg e 31,24 mg/kg.**

Tratamento	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora
Salina (i.p)	0,96 ± 0,20	1,24 ± 0,25	1,47 ± 0,29	1,88 ± 0,25
Piroxicam 30mg/kg (p.o)	0,39 ± 0,08*	0,50 ± 0,09*	0,50 ± 0,12*	0,61 ± 0,25**
<i>R. elaeocarpum</i> 7,81 mg/kg (i.p)	0,60 ± 0,04	0,85 ± 0,07	1,09 ± 0,39	1,39 ± 0,41
<i>R. elaeocarpum</i> 31,24 mg/kg (i.p)	0,17 ± 0,14**	0,25 ± 0,30**	0,31 ± 0,08**	0,47 ± 0,19**

ANOVA  $F_{(3,25)} = 7,30$  para 1ª hora.  $F_{(3,25)} = 5,65$  para 2ª hora.  $F_{(3,25)} = 5,77$  para a 3ª hora.  $F_{(3,25)} = 7,23$  para 4ª hora. Teste Dunnett \*\*  $p < 0,01$  \*  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média em mililitros ± erro padrão (n=5-7).

**Gráfico 5: Evolução da atividade anti-edematogênica do extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum* nas doses de 7,81 mg/kg e 31,24 mg/kg durante 4 horas.**

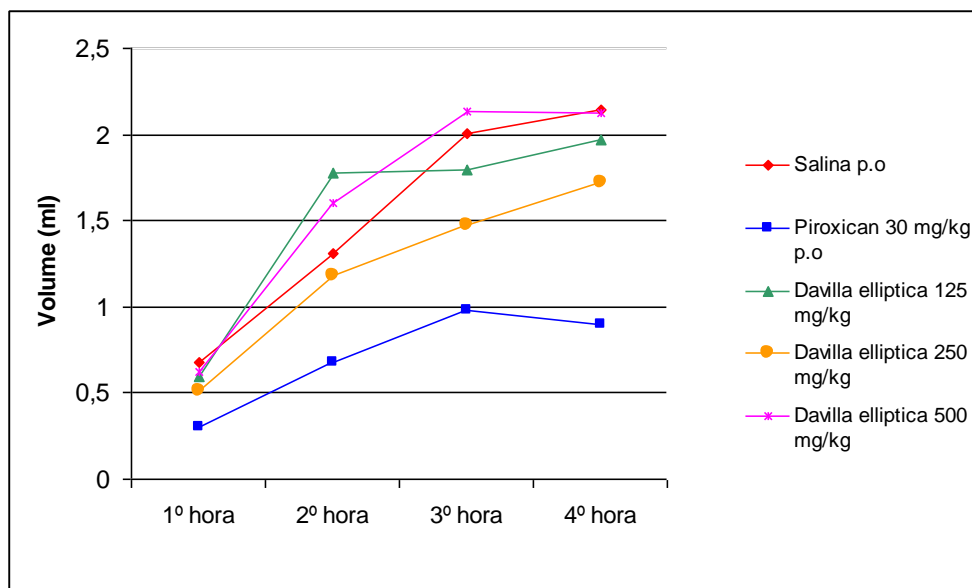


**Tabela 6: Efeito anti-edematogênico da administração oral do extrato metanólico das folhas de *Davilla elliptica* na dose de 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg.**

Tratamento	1º hora	2º hora	3º hora	4º hora
Salina (p.o)	0.67 ± 0.13	1.31 ± 0.18	2.01 ± 0.15	2.15 ± 0.22
Piroxicam 30 mg/kg (p.o)	0.30 ± 0.08	0.68 ± 0.15	0.98 ± 0.18**	0.89 ± 0.15**
<i>Davilla elliptica</i> 125 mg/kg (p.o)	0.59 ± 0.09	1.77 ± 0.20	1.80 ± 0.20	1.96 ± 0.18
<i>Davilla elliptica</i> 250 mg/kg (p.o)	0.51 ± 0.15	1.18 ± 0.20	1.47 ± 0.27	1.72 ± 0.31
<i>Davilla elliptica</i> 500 mg/kg (p.o)	0.62 ± 0.13	1.60 ± 0.28	2.13 ± 0.22	2.12 ± 0.27

ANOVA  $F_{(4,35)} = 1,37$  para 1º hora.  $F_{(4,35)} = 4,22$  para 2º hora.  $F_{(4,35)} = 5,64$  para 3º hora.  $F_{(4,35)} = 5,76$  para 4º hora. Teste Dunnett \*\*  $p < 0,01$  \*  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média em mililitros ± erro padrão (n=5-9).

**Gráfico 6: Evolução da atividade anti-edematogênica do extrato metanólico das folhas de *Davilla elliptica* nas doses de 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg durante 4 horas.**

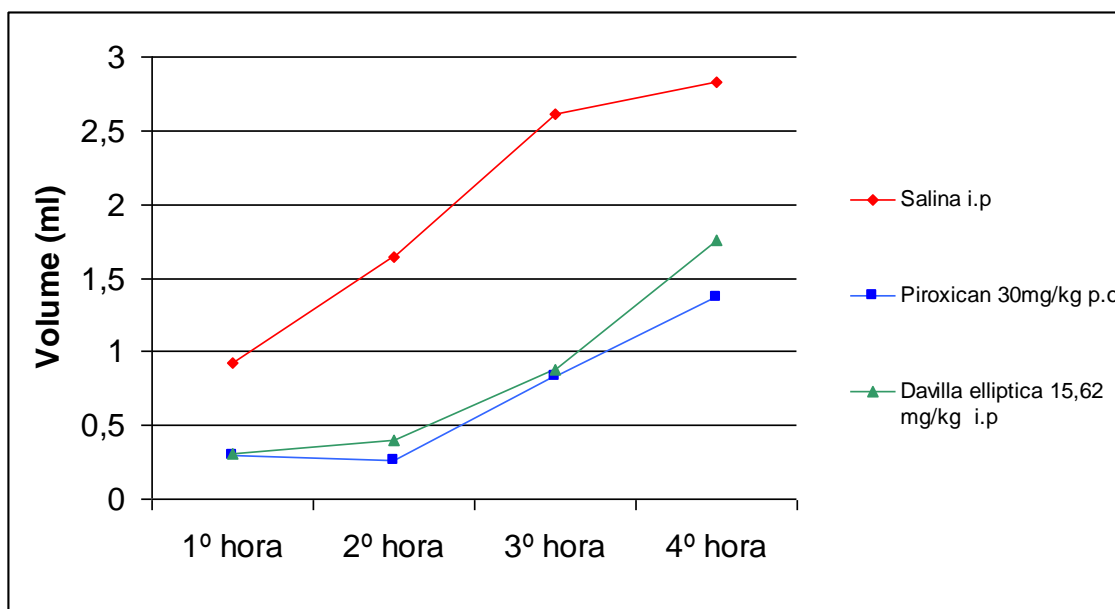


**Tabela 7: Efeito anti-edematogênico da administração intraperitoneal do extrato metanólico das folhas de *Davilla elliptica* nas dose de 15,62 mg/kg.**

Tratamento	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora
Salina (i.p)	0,93 ± 0,19	1,65 ± 0,30	2,61 ± 0,21	2,83 ± 0,20
Piroxicam 30mg/kg (p.o)	0,29 ± 0,11**	0,26 ± 0,04**	0,83 ± 0,14**	1,37 ± 0,24*
<i>Davilla elliptica</i> 15.62 mg/kg (i.p)	0,30 ± 0,06**	0,40 ± 0,07**	0,88 ± 0,15**	1,76 ± 0,21**

ANOVA  $F_{(2,15)} = 7,914$  para 1ª hora.  $F_{(2,15)} = 17,639$  para 2ª hora.  $F_{(2,15)} = 35,405$  para a 3ª hora.  $F_{(2,15)} = 11,613$  para 4ª hora. Teste Dunnett \*\*  $p < 0,01$  \*  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média em mililitros ± erro padrão (n=5-6).

**Gráfico 7: Evolução da atividade anti-edematogênica do extrato metanólico das folhas de *Davilla elliptica* na dose de 15,62 mg/kg durante 4 horas.**

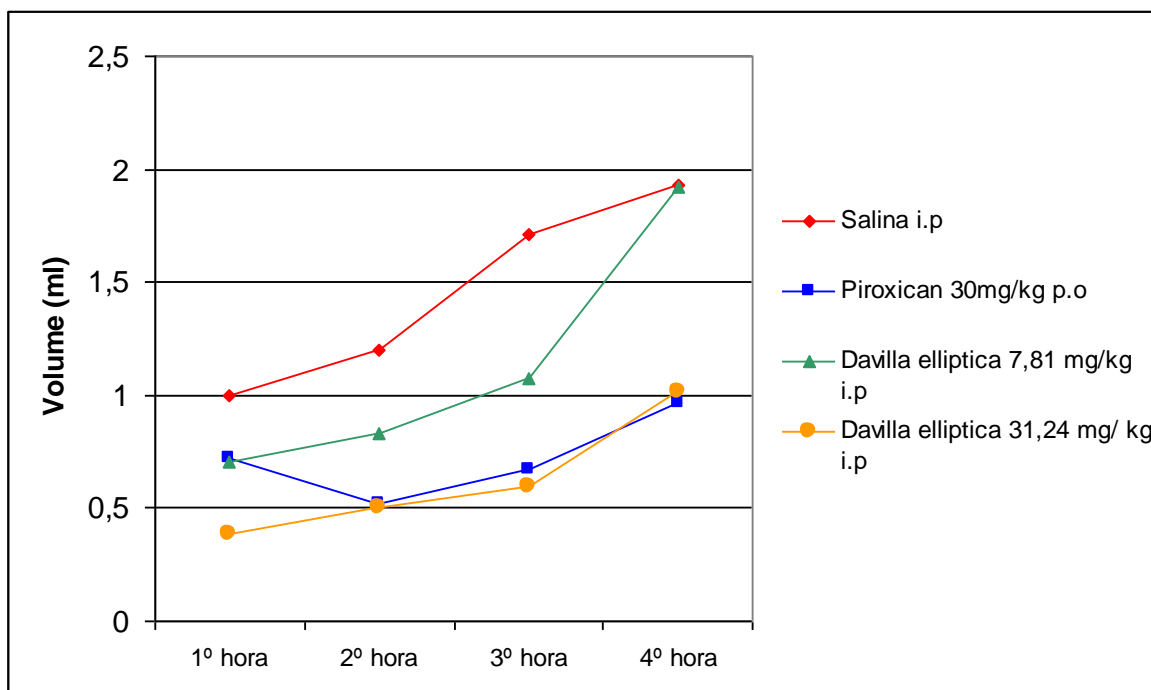


**Tabela 8: Efeito anti-edematogênico da administração intraperitoneal do extrato metanólico das folhas de *Davilla elliptica* nas doses de 7,81 mg/kg e 31,24 mg/kg.**

Tratamento	1 <sup>o</sup> hora	2 <sup>o</sup> hora	3 <sup>o</sup> hora	4 <sup>o</sup> hora
Salina (i.p)	1.01 ± 0.16	1.20 ± 0.14	1.71 ± 0.11	1.93 ± 0.18
Piroxicam 30mg/kg (p.o)	0.72 ± 0.14	0.52 ± 0.08*	0.67 ± 0.15**	0.96 ± 0.21*
<i>Davilla elliptica</i> 7,81 mg/kg (i.p)	0.71 ± 0.12	0.83 ± 0.26	1.07 ± 0.25*	1.92 ± 0.13
<i>Davilla elliptica</i> 31,24 mg/ kg (i.p)	0.38 ± 0.01**	0.50 ± 0.12**	0.59 ± 0.12**	1.01 ± 0.27*

ANOVA  $F_{(3,23)} = 4,53$  para 1<sup>o</sup> hora.  $F_{(3,23)} = 5,01$  para 2<sup>o</sup> hora.  $F_{(3,25)} = 12,34$  para a 3<sup>o</sup> hora.  $F_{(3,23)} = 6,275$  para 4<sup>o</sup> hora. Teste Dunnett \*\*  $p < 0,01$  \*  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média em mililitros ± erro padrão (n=5-7).

**Gráfico 8: Evolução da atividade anti-edematogênica do extrato metanólico das folhas de *Davilla elliptica* nas doses de 7,81 mg/kg e 31,24 mg/kg durante 4 horas.**



**Tabela 9: Efeito da administração intraperitoneal de um agente inflamatório (carragenina) no edema de pata induzido pela carragenina.**

Tratamento	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora
Salina i.p	0.31 ± 0.06	0.61 ± 0.08	1.17 ± 0.21	1.45 ± 0.17
Piroxican 30mg/kg p.o	0.14 ± 0.03*	0.18 ± 0.05**	0.42 ± 0.09**	0.68 ± 0.16*
Carragenina 1 % (1ml/kg) i.p	0.37 ± 0.06	0.77 ± 0.08	1.13 ± 0.19	1.22 ± 0.26

ANOVA  $F_{(2,20)} = 5,64$  para 1ª hora.  $F_{(2,20)} = 17,01$  para 2ª hora.  $F_{(2,20)} = 7,80$  para a 3ª hora.  $F_{(2,20)} = 3,89$  para 4ª hora. Teste Dunnett \*\*  $p < 0,01$  \*  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média em mililitros ± erro padrão (n=7).

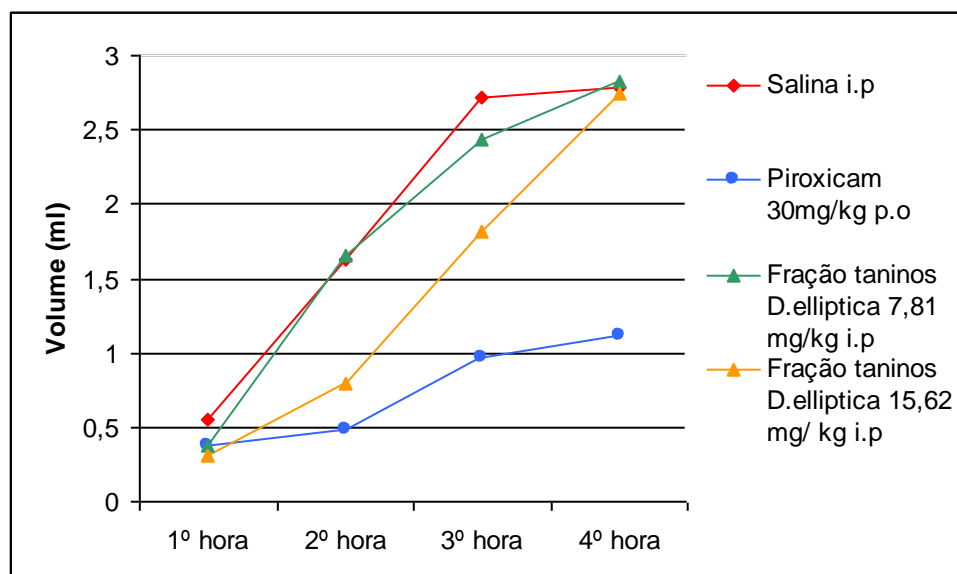


**Tabela 10: Efeito anti-edematogênico da administração intraperitoneal da fração de taninos das folhas de *Davilla elliptica* nas doses de 7,81 mg/kg e 15,62 mg/kg.**

<i>Tratamento</i>	<i>1º hora</i>	<i>2º hora</i>	<i>3º hora</i>	<i>4º hora</i>
Salina (i.p)	0.55 ± 0.06	1.63 ± 0.24	2.71 ± 0.25	2.79 ± 0.22
Piroxicam 30mg/kg (p.o)	0.38 ± 0.08	0.49 ± 0.09**	0.97 ± 0.08**	1.12 ± 0.18**
Fração de taninos <i>D.elliptica</i> 7.81 mg/kg (i.p)	0.37 ± 0.09	1.66 ± 0.34	2.43 ± 0.19	2.83 ± 0.19
Fração de taninos <i>Davilla</i> <i>elliptica</i> 15.62 mg/ kg (i.p)	0.30 ± 0.04*	0.79 ± 0.06*	1.81 ± 0.20**	2.75 ± 0.17

ANOVA  $F_{(3,23)} = 2,31$  para 1º hora.  $F_{(3,23)} = 5,00$  para 2º hora.  $F_{(3,23)} = 7,08$  para a 3º hora.  $F_{(3,23)} = 14,49$  para 4º hora 16,81. Teste Dunnett \*\*  $p < 0,01$  \*  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média em mililitros ± erro padrão (n=5-7).

**Gráfico 10: Evolução da atividade anti-edematogênica das frações de taninos das folhas de *Davilla elliptica* nas doses de 7,81 mg/kg e 15,62 mg/kg durante 4 horas.**

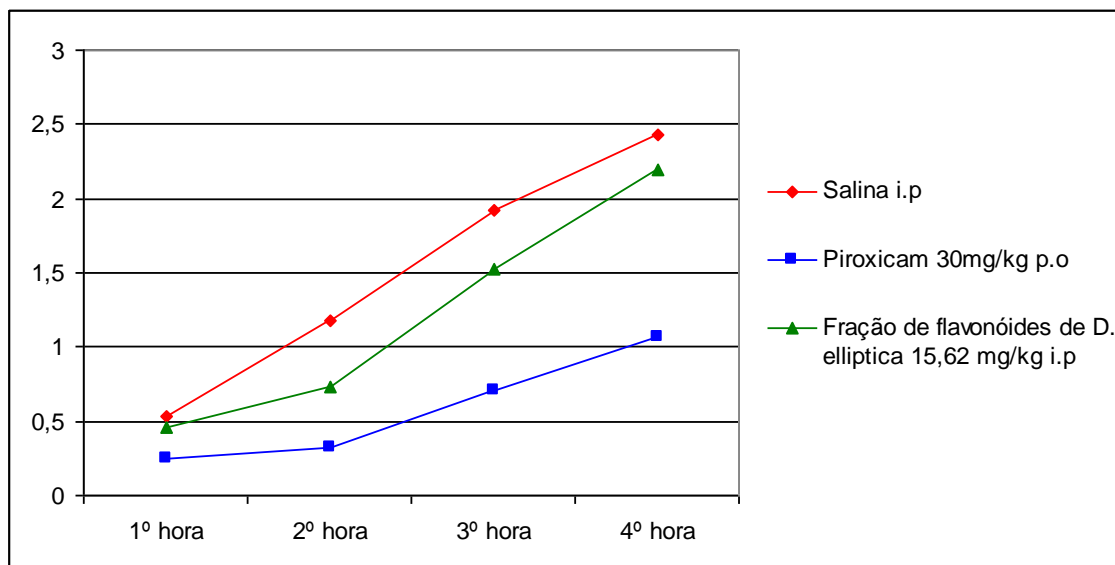


**Tabela 11: Efeito anti-edematogênico da administração intraperitoneal da fração de flavonóides das folhas de *Davilla elliptica* na dose de 15,62 mg/kg.**

Tratamento	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora
Salina i.p	0.53 ± 0.09	1.18 ± 0.20	1.92 ± 0.18	2.43 ± 0.20
Piroxicam 30mg/kg p.o	0.25 ± 0.05 *	0.32 ± 0.05 **	0.71 ± 0.13**	1.06 ± 0.19 **
Fração de flavonóide <i>Davilla elliptica</i> 15.62 mg/kg i.p	0.46 ± 0.06	0.73 ± 0.13	1.53 ± 0.17	2.20 ± 0.19

ANOVA  $F_{(3,23)} = 3,52$  para 1ª hora.  $F_{(3,23)} = 8,00$  para 2ª hora.  $F_{(3,23)} = 7,49$  para a 3ª hora.  $F_{(3,23)} = 10,07$  para 4ª hora. Teste Dunnett \*\*  $p < 0,01$  \*  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média em mililitros ± erro padrão (n=6-7).

**Gráfico 11: Evolução da atividade anti-edematogênica da fração de flavonóides das folhas de *Davilla elliptica* na dose de 15,62 mg/kg.**

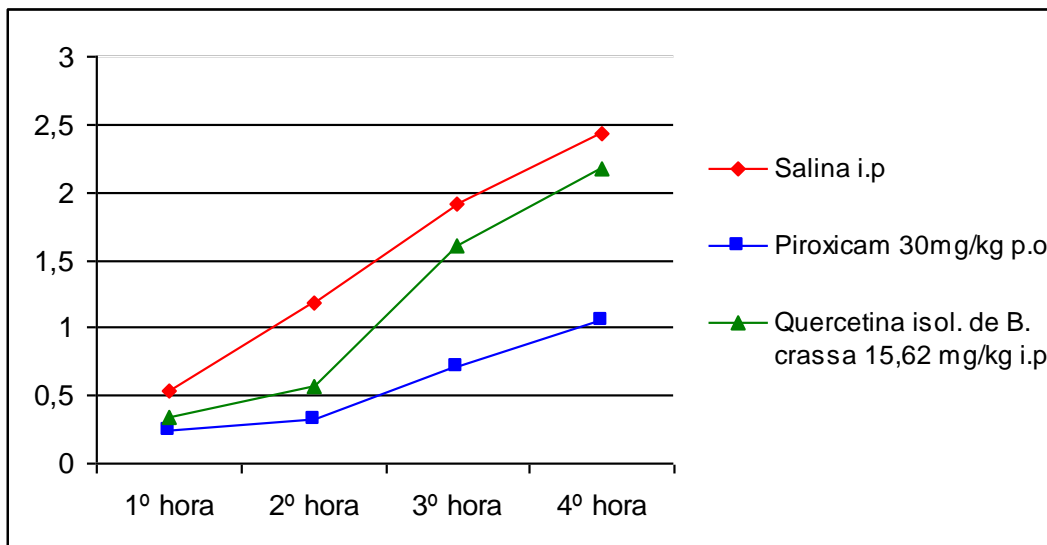


**Tabela 12: Efeito anti-edematogênico da administração intraperitoneal da fração enriquecida de quercetina 3-O-α-D arabinopiranosídeo isolada das folhas de *Byrsonima crassa* na dose de 15,62 mg/kg.**

Tratamento	1º hora	2º hora	3º hora	4º hora
Salina i.p	0,53 ± 0,09	1,18 ± 0,20	1,92 ± 0,18	2,43 ± 0,20
Piroxicam 30mg/kg p.o	0,25 ± 0,05 *	0,32 ± 0,05**	0,71 ± 0,13**	1,06 ± 0,19 **
<i>Quercetina</i> 15.62 mg/kg i.p	0,34 ± 0,06	0,57 ± 0,10**	1,60 ± 0,25	2,17 ± 0,20

ANOVA  $F_{(3,23)} = 3,52$  para 1º hora.  $F_{(3,23)} = 8,00$  para 2º hora.  $F_{(3,23)} = 7,49$  para a 3º hora.  $F_{(3,23)} = 10,07$  para 4º hora. Teste Dunnett \*\*  $p < 0,01$  \*  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média em mililitros ± erro padrão (n=6-7).

**Gráfico 12: Evolução da atividade anti-edematogênica da fração de quercetina 3-O-α-D-arabinopiranosídeo isolada das folhas de *Byrsonima crassa* na dose de 15,62 mg/kg.**

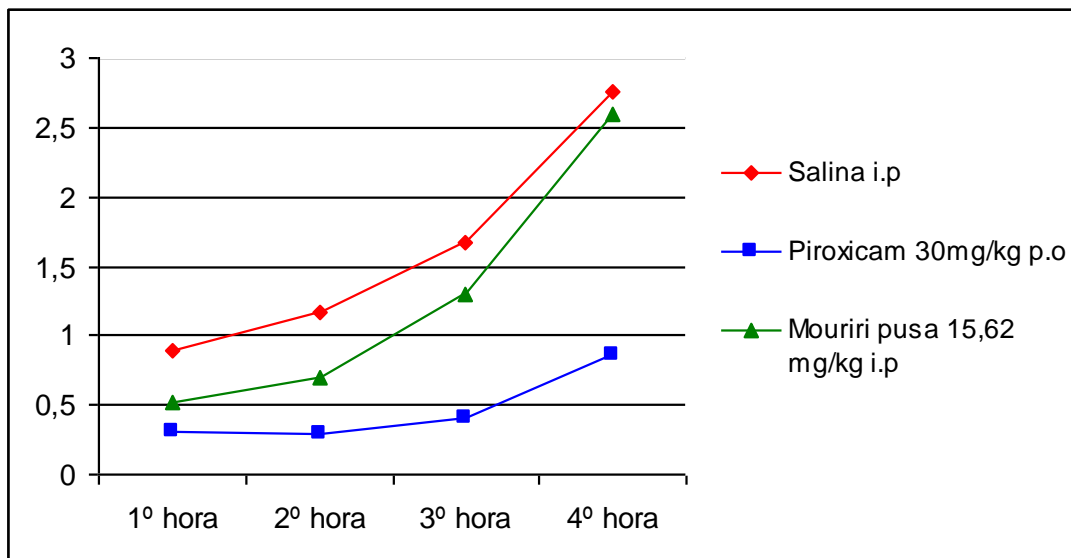


**Tabela 13: Efeito anti-edematogênico da administração intraperitoneal do extrato metanólico das folhas de *Mouriri pusa* na dose de 15,62 mg/kg.**

Tratamento	1º hora	2º hora	3º hora	4º hora
Salina i.p	0,90 ± 0,20	1,17 ± 0,26	1,67 ± 0,23	2,76 ± 0,34
Piroxicam 30mg/kg p.o	0,31 ± 0,07**	0,30 ± 0,07**	0,40 ± 0,05**	0,86 ± 0,17**
<i>M. pusa</i> 15.62 mg/kg i.p	0,52 ± 0,07	0,70 ± 0,13	1,29 ± 0,29	2,59 ± 0,12

ANOVA  $F_{(2,18)} = 5,33$  para 1º hora.  $F_{(2,18)} = 6,63$  para 2º hora.  $F_{(2,18)} = 6,52$  para a 3º hora.  $F_{(2,18)} = 20,95$  para 4º hora. Teste Dunnett \*\*  $p < 0,01$ . Os resultados foram expressos como média em mililitros ± erro padrão (n=7).

**Gráfico 13: Evolução da atividade anti-edematogênica do extrato metanólico das folhas de *Mouriri pusa* na dose 15,62 mg/kg durante 4 horas.**





**Anexo 2:****ATIVIDADES EXTRAS****Artigos publicados:**

- 1) Anti-hemorrhagic Activity of Four Brazilian Vegetable Species against *Bothrops jararaca* Venom. (Molecules 14 (3), 1072-1080, 2009): **Catarine Massucato Nishijima**, Clenilson Martins Rodrigues, Marcelo Aparecido Silva, Mônica Lopes-Ferreira, Wagner Vilegas, Clélia Akiko Hiruma-Lima
- 2) Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhydryls and nitric oxide. (Journal of Ethnopharmacology 117, 170-174, 2008): Mariana de Paula Ferreira, **Catarine Massucato Nishijima**, Leonardo Norobu Seito, Anne Ligia Dokkedal, Monica Lopes-Ferreira, Luiz Cláudio Di Stasi, Wagner Vilegas, Clélia Akiko Hiruma-Lima.
- 3) *Davilla elliptica* and *Davilla nitida*: gastroprotective, anti-inflammatory immunomodulatory and anti-*Helicobacter pylori* action. (Journal of Ethnopharmacology 123, 430-438, 2009): Hélio Kushima; **Catarine Massucato Nishijima**; Clenilson Martins Rodrigues; Daniel Rinaldo; Micheli Fernanda Sassá; Taís Maria Bauab, Luiz Claudio Di Stasi; Iracilda Zeppone Carlos; Wagner Vilegas; Clélia Akiko Hiruma-Lima
- 4) *Qualea parviflora* Mart: An integrative study to validate the gastroprotective, antidiarrheal, antihemorrhagic and mutagenic action (Journal of Ethnopharmacology 2009): Lucilene Patrícia Mazzolin, Ana Lúcia Martiniano Nasser, Thiago Mello Moraes, Raquel Cássia Santos, **Catarine Massucato Nishijima**, Fábio Vieira Santos, Eliana Aparecida Varanda, Taís Maria Bauab, Lúcia Regina Machado da Rocha, Luis Cláudio Di Stasi, Wagner Vilegas, Clélia Akiko Hiruma-Lima.

**Disciplinas Cursadas:**

- *Tópicos de Atualização em Ciências*. (1 crédito)
- *Parâmetros de sensibilidade a drogas: modelos experimentais*. Prof. Dr. Oduvaldo Marques Pereira (4 créditos).
- *Testes Estatísticos Aplicados à Farmacologia*. Profa. Dra. Mirtes Costa (2 créditos).
- *Tópicos de Atualização em Ciências*. (1 crédito).
- *Redação Científica*. Prof. Dr. Gilson Volpato (4 créditos).
- *Sistema Nervoso Autônomo Simpático*. Profa. Dra. Sandra Cordellini. (4 créditos).
- Neuropsicofarmacologia do comportamento. Profa. Dra. Mirtes Costa (4 créditos).

**Participações em congressos:**

- VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/FAPESP, realizado no Departamento de Química da Universidade Estadual Paulista- UNESP, na cidade de Araraquara (SP), de 08 a 12 de Julho de 2008.

→ Mini-curso: Recentes avanços no isolamento e detecção de produtos naturais, com carga horária de 8 horas.

- XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, realizado no Centro de Convenções Frei Caneca, na cidade de São Paulo (SP), de 16 a 19 de setembro de 2008.

→ Mini-curso: Aplicação de técnicas hifenadas na análise de produtos naturais de plantas medicinais, com carga horária de 3 horas.

- 40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, realizado no Hotel Vacance, na cidade de Águas de Lindóia (SP), de 16 a 19 de outubro de 2008.

→ Mini-curso: “Papéis fisiológicos opostos, de nocicepção e antinocicepção, induzido pelo mesmo agente endógeno – a Bradicininina”, ministrado pelo Prof. Dr. Alexandre P. Corrado



(USP- Ribeirão Preto), realizado em Águas de Lindóia (SP) no período de 16 a 19 de outubro de 2008, com carga horária de 8 horas.

- XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental-FeSBE realizado na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 19 a 22 de agosto de 2009.

→ Mini-curso: “ Problemas éticos e científicos relacionados com a invalidez e a ineficiência de trabalhos com animais de laboratório, com carga horária de 3 horas.

- 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental.

→ Mini-curso: “ Alvos biológicos relevantes para o desenvolvimento de novos analgésicos, realizado de 17 a 20 de outubro de 2009 em Ribeirão Preto, com duração de 3 horas.

#### **Trabalhos apresentados:**

“**Trial of extracts and enriched fractions from vegetable species with potential anti-hemorrhagic effect against *Bothrops jararaca* venom.**” Apresentado como pôster no XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congresso of Ethnopharmacology, realizado em São Paulo (SP) no período de 16 a 19 de setembro de 2008.

“**Avaliação da atividade anti-inflamatória das cascas de extrato metanólico de *Rhamnidium elaeocarpum*.**” Nishijima, C.M.; Sommerfeld, O.S.; Honda, N.K.; Coelho, R.G.; Hiruma-Lima, C.A. - 40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, realizado no Hotel Vacance, na cidade de Águas de Lindóia (SP), de 16 a 19 de outubro de 2008.

“ **Atividade anti-edematogênica do extrato metanólico e fração de taninos das folhas de *Davilla elliptica* St. Hil (Dilleniaceae)**” C.M., Nishijima, Rodrigues, C., Wagner

Vilegas, Hiruma-Lima, C.A.- IX Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, realizada no Instituto de Botânica em São Paulo/SP, de 22 a 24 de setembro de 2009.

“**Atividade anti-nociceptiva do extrato metanólico das cascas de *Rhamnidium elaeocarpum*.**” Nishijima, C.M.; Sommerfeld, O.S.; Honda, N.K.; Coelho, R.G.; Hiruma-Lima, C.A. - XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental-FeSBE realizado na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 19 a 22 de agosto de 2009.