



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

MANUEL CARLOS SERRA AZUL MONTEIRO

**EFEITOS CARDIOVASCULARES E RENAIIS DE UMA FRAÇÃO PROTEICA ISOLADA
DO LÁTEX DE *Calotropis procera***

FORTALEZA

2015

MANUEL CARLOS SERRA AZUL MONTEIRO

EFEITOS CARDIOVASCULARES E RENAIIS DE UMA FRAÇÃO PROTEICA ISOLADA
DO LÁTEX DE *Calotropis procera*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Nylane Maria
Nunes de Alencar

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

M774e

Monteiro, Manuel Carlos Serra Azul.

Efeitos cardiovasculares e renais de uma fração proteica isolada do látex de *calotropis procera* / Manuel Carlos Serra Azul Monteiro. – 2015.

104 f. : il. color.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Doutorado em Farmacologia, Fortaleza, 2015.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientação: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.

1. Rim. 2. Látex. 3. Pressão Arterial. 4. Toxicidade. I. Título.


CDD 615.32

**EFEITOS CARDIOVASCULARES E RENAIIS DE UMA FRAÇÃO
PROTEICA ISOLADA DO LÁTEX DE *Calotropis procera***

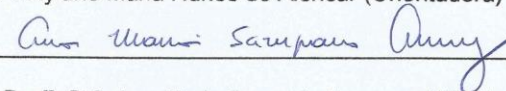
*Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia e Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para obtenção do grau
de Doutor, de Manuel Carlos Serra Azul
Monteiro.*

Aprovação em 03/09/2015

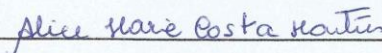
Banca Examinadora:



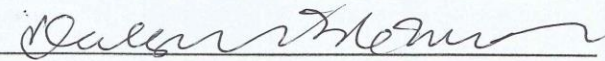
Profª. Drª. Nylane Maria Nunes de Alencar (Orientadora) - UFC



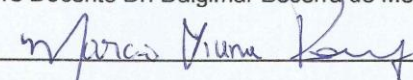
Profª. Drª. Ana Maria Sampaio Assreuy- UECE



Profª Drª Alice Costa Martins - UFC



Prof. Livre Docente Dr. Dalgimar Beserra de Menezes -UFC



Prof. Dr. Márcio Viana Ramos – UFC

A todo (a)s que de alguma maneira tornaram
possível esse ensaio. .

AGRADECIMENTOS:

DEUS.

AOS MEUS PAIS: HELENA SERRA AZUL MONTEIRO E FRANCISCO DAS
CHAGAS DIAS MONTEIRO (*IN MEMORIAM*)

À SANDRA MARIA NUNES MONTEIRO, MINHA ESPOSA.

AO SAMUEL NUNES SERRA AZUL MONTEIRO, MEU FILHO.

À JANAÍNA SERRA AZUL MONTEIRO EVANGELISTA, MINHA IRMÃ.

A MINHA ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. NYLANE MARIA NUNES DE ALENCAR

AOS LABORATÓRIOS E COLABORADORES PROF^a. DR^a. ALICE MARIA COSTA
MARTINS; PROF^a. DR^a. INÊS EVANGELISTA LIBERATO, PROF DR. MARCIO VIANA
RAMOS; PROF DR. PEDRO CALDAS MAGALHÃES; PROF LIVRE DOCENTE
DALGIMAR BESERRA DE MENEZES

AOS AMIGOS E PARENTES. SERVIDORES, ESTUDANTES E PROFESSORES
DO DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA E DO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA DA UFC.

AO PÓS DOUTORANDO ANTÔNIO RAFAEL COELHO JORGE E ÀS PÓS-
DOUTORAS MARIA DANIELE AZEVEDO TEIXEIRA SHUH E INGRID SAMANTHA
TAVARES DE FIGUEIREDO

AS TÉCNICAS DE LABORATÓRIO PATRÍCIA SAMARA E MARIA SILVIA
HELENA FREIRE DE FRANÇA

À VETERINARIA DR^A GABRIELA MARIÂNGELA FARIAS DE OLIVEIRA.

À UFC, CAPES E CNPq PELO APOIO FINANCEIRO.

O Saber
A gente Aprende
Com os mestres e
Com os Livros
A Sabedoria,
Se Aprende Com os
Humildes.

Cora Coralina.

Feliz aquele que transfere,
O que sabe.
E o que aprende o que ensina.

Cora Coralina.

RESUMO

Introdução e Justificativa: *Calotropis procera* (CP). Planta comum em climas árido e semiárido, após dano mecânico produz látex. CP na Ásia tem uso popular, medicinal. A fração borracha é muito tóxica, sendo desprezada e uma fração proteica do látex separada e liofilizada, a (LP). Metodologia: Aprovado o protocolo experimental no comitê de ética para animais (CEPA/UFC nº 67/2012) ratos adultos machos (n = 4 a 6 por grupo) submetidos a experimentos avaliando possíveis efeitos fisiológicos e toxicológicos: cardiovasculares e renais, na presença de LP, por técnicas *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*: Medida da pressão arterial média (PAM); Perfusão renal em rim isolado; Histologia hematoxilina/eosina (HE); Citometria de fluxo; Teste de Inibição de crescimento celular: MTT. Resultados: LP injetada na jugular mostra hipotensão em ratos, em 144 µg/ml, sendo -22% de queda da PAM, até -29% em 444 µg/ml, ambas as concentrações cumulativas, sem efeito na frequência cardíaca nem em vasos de resistência. Na perfusão renal a LP em todas as concentrações e tempos reduziu o ritmo de filtração glomerular ($0,1649 \pm 0,027^*$ versus (vs) $0,740 \pm 0,02$), e também o percentual de transporte de eletrólitos %TNa⁺ ($72,15 \pm 4,526^*$ vs $81,30 \pm 0,03$), %TCl⁻ ($69,31 \pm 4,441^*$ vs $77,10 \pm 0,29$) e %TK⁺ ($68,51 \pm 5,660^*$ vs $74,78 \pm 0,14$) versus o controle, sendo concentração e tempo dependentes. Já em 30 µg/ml, houve redução do fluxo urinário apenas nos tempos de 90 e 120 minutos, porém nessa concentração e tempos não reduziu %TK⁺ um fenômeno explicando o outro parcialmente. (HE) mostra lesão nos túbulos renais nas concentrações de 10 e 30 µg/ml, e mais severa em 100 µg/ml. A LP adicionada em células tubulares renais caninas (MDCK) em cultura iniciou morte celular na concentração de 6,25 µg/ml até 200 µg/ml Na citometria de fluxo a 100 µg/ml a maioria das células morreu por necrose ou apoptose tardia. Os escores de lesões renais feitos em lâminas histológicas mostram dano renal induzido por LP em áreas tubulares renais. Conclusão: Efeitos tóxicos no tecido renal, histologia (HE), perfusão renal, e MDCK podem explicar em parte alterações na filtração glomerular e reabsorção tubular, e indiretamente a hipotensão observada *in vivo*. Para elucidar melhor os mecanismos mais experimentos são necessários.

Palavras-chave: Perfusão renal, látex, pressão arterial, toxicidade renal.

ABSTRACT.

CARDIOVASCULAR AND RENAL EFFECTS FROM PROTEIC FRACTION ISOLATED OF *Calotropis procera* LATEX.

Introduction and aim: *Calotropis procera* (CP) is a laticifer plant adapted in arid and semiarid climates, when mechanically damaged it produces latex. CP in Asia is used in popular medicine. Its rubber fraction is removed cause is high toxic. A protein fraction is separated from the latex of CP, it is (LP). Methodology: After experimental protocol approved to ethic committee in animals (CEPA/UFC n°67/2012), male adults rats (n = 4 till 6 per group) submitted to cardiovascular and renal approaches, using *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro*, in order to investigate toxicological and physiological properties of LP. Mean arterial pressure measured (PAM); Renal perfusion from isolated kidney; Histology hematoxylin/eosin (HE); Flow cytometry; Test for inhibition cell growing: MTT. Results: LP showed a hypotensive effect initiated when LP 144 µg/ml injected in jugular of rat, leading a PAM decrease -22% , and falling -29%, 444 µg/ml, both cumulative concentrations with no cardiac frequency or small vascular resistance effects. In Renal perfusion had diminishing of glomerular filtration rate (RFG) ($0,1649 \pm 0,02734^*$ versus (vs) $0,740 \pm 0,02$) and electrolytes reabsorption at Na^+ (%TNa⁺) ($72,15 \pm 4,526^*$ vs $81,30 \pm 0,03$), and Cl^- (%TCl⁻) ($69,31 \pm 4,441^*$ vs $77,10 \pm 0,29$), and K^+ (%TK⁺) ($68,51 \pm 5,660^*$ vs $74,78 \pm 0,14$),. versus control and it depended on concentration and time. Already at 30 mg/ml decreased urinary flow only in times of 90 and 120 minutes, however in the same concentration and times had no reduction in% TK⁺, a phenomena which explained the other one. (HE) showed renal tubules damage at 10 and 30 µg/mL, more severe at 100 µg/ml concentration. LP had toxicity added at canine tubular renal cells in culture, Madin Darbin Canine Kidney (MDCK), since 6,25 µg/mL, increasing until 200 µg/ml concentration. At flow cytometry to 100 µg/ml the most of the cells died by necrosis or late apoptosis. The renal lesions scores measured in histologic laminas proved renal damage induced from LP mainly in tubular renal areas. Conclusion: The toxic effect at kidney perfused tissue, histology (HE), renal perfusion, and MDCK cells could partially explain changes on glomerular filtration and tubular reabsorption, and contributes indirectly hypotension *in vivo*. More experiments are need for ameliorate the elucidation these mechanisms.

Key-words: renal perfusion, latex, arterial pressure, renal toxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS.

ACC- Antagonistas de canais de cálcio.
Ach- Acetilcolina do inglês “acetylcholine”.
ANOVA- Análise de variância.
Ax- Anexina V.
AT1- Receptor da angiotensina 1.
ATP- Adenina trifosfato.
ATPase – Enzima clivadora de ATP.
Biocen/UFC- Biotério Central da Universidade Federal do Ceará.
Ca⁺⁺: Íon Cálcio.
CE- Ceará.
Céls.- Células.
CEPA- Comitê de ética em pesquisas com animais.
Cl⁻ íon cloreto.
Ci₅₀- Concentração Inibitória média.
CONCEA- Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal.
CP – *Calotropis procera*.
DC- Débito cardíaco.
DCV-Doenças cardiovasculares.
Depto.- Departamento.
DNA- ácido desoxirribonucleico.
DRC - Doença Renal Crônica.
ECA - Enzima Conversora da Angiotensina.
EDTA – Ácido etileno diamino treta acético
EPM- Erro padrão da média.
EUA- Estados Unidos da América.
FC- Frequência cardíaca.
FSH Hormônio folículo estimulante.
H OU h- horas.
HAS- Hipertensão Arterial Sistêmica.
HDL_c- Colesterol de alta densidade.

HE- Hematoxilina-Eosina.

IgA – Imunoglobulina A.

IgE – Imunoglobulina E.

IgG – Imunoglobulina G.

IECA- INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA.

IP ou i.p.- Intra- peritoneal.

FC- Frequência Cardíaca.

FITC- Isotiocinato de fluoresceína.

FU- Fluxo urinário.

g- grama.

HAS- Hipertensão Arterial Sistêmica.

HCl- ácido clorídrico.

K⁺- íon potássio.

Kg- kilograma.

KDa- Kilo Dalton.

L ou l- litro.

LC50- Concentração letal media.

LH - Hormônio luteinizante.

LP- Fração proteica do látex de *Calotropis procera*.

M- concentração Molar.

m² - metro quadrado.

min - minuto ou minutos.

MDCK - Células tubulares renais caninas em cultura. mcg ou µg- micrograma.

mg - miligrama.

MG - Minas Gerais.

ml -mililitro.

mm Hg- milímetros de mercúrio, medida de pressão.

mN - mili-Newton.

MTT- 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico .

n- Número experimental.

N - Newton, medida de força..

Na⁺- íon sódio.

NE - Nordeste.

ng - nanograma ou nanogramas.

ng/kg- nanograma por kilograma.
nm- nanômetro.
OMS- Organização Mundial de Saúde.
OPAS- Organização Pan-americana de Saúde.
PA- Pressão Arterial.
PAM- Pressão arterial medida.
PBS- salina tamponada por fosfato ou em inglês phosphate buffer saline.
PD- Pressão Diastólica.
PE- Pernambuco.
pH- potencial de hidrogênio iônico.
Phe- Fenilefrina do inglês "phenylephrine".
PP- Pressão de perfusão.
p/p- peso sobre peso.
p/v- peso sobre volume.
PR- Proteínas- Proteínas relacionadas a defesa.
PS- Pressão Sistólica.
RFG- Ritmo de filtração glomerular.
RIPs- Proteínas inativadoras de ribossomos.
RVR- Resistência vascular renal.
RVP- Resistência vascular periférica.
SBC- Sociedade Brasileira de Cardiologia.
SBD- Sociedade Brasileira de Diabetes.
SBF- Soro Bovino Fetal.
SBN- Sociedade Brasileira de Nutrição.
SCV- Sistema Cardiovascular
SDS - Dodecil sulfato de sódio.
SRAA- Sistema renina angiotensina aldosterona.
SP- São Paulo.
U – Unidade(s).
UFC- Universidade Federal do Ceará.
USP- Universidade de São Paulo.
U/ml- unidades por mililitro.
v/v- volume sobre volume.
w/w- o mesmo que p/p em inglês: weight per weight.

μg - micrograma.

μl ou μL - microlitros.

μM - micro Molar.

μm - micrometro.

$^{\circ}\text{C}$ - graus Celcius.

$\%\text{Cl}^{-}$ - Porcentagem de transporte tubular renal de Cloreto.

$\%\text{Na}^{+}$ - Porcentagem de transporte tubular renal de Sódio.

$\%\text{K}^{+}$ - Porcentagem de transporte tubular renal de Potássio.

7-AAD: Aminoactinomicina D.

LISTA DE FIGURAS (QUADROS, TABELAS, GRÁFICOS E FOTOGRAFIAS).

- Tabela 1:** Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual no consultório (> 18 anos). **P. 24.**
- Figura 1:** Fotografias da planta *Calotropis procera*. **P. 35.**
- Figura 2:** Látex de *Calotropis procera*. **P. 41.**
- Figura 2:** Eletroforese em gel de poliacrilamida(12,5%). **P. 42.**
- Figura 4:** Colocação do cateter utilizado para administração da fração do látex LP, e registro da pressão arterial média no programa computadorizado *Windaq/Lite*. **P. 44.**
- Figura 5:** Representação gráfica do sistema utilizado nos experimentos de contratilidade *ex-vivo* em ramo de artéria mesentérica de rato (n = 4). **P. 46 e 47.**
- FIGURA 6** - Representação esquemática do sistema de perfusão de rim isolado Fonte: LAFAVET – UFC. **P. 48 e 49.**
- Tabela 2: Cálculo dos parâmetros renais.** **P. 58.**
- Tabela 3: Parâmetros de transporte tubular renais.** **P. 58.**
- Figura 7:** Esquema simplificado das etapas do cultivo e tratamento das células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*). **P. 58.**
- Figura 8:** A administração do látex de *C.procera* (PL) nos animais (n = 4), nas concentrações (1 + 3 + 10 + 30 +100 + 300 µg/ml ou 1, 4, 14, 44, 144, 344 µg/ml); (8A) e (8B). Média ± EPM (*p<0,05). **P. 61.**
- Figura 9:** Pressão Arterial Média dose dependente de concentrações crescentes e cumulativas de LP: 1A, Efeito hipotensor, em relação ao tempo de observação para início do efeito (300 segundos). **P. 62.**
- Quadro 1:** Percentual de redução da pressão arterial média em ratos normotensos após injeção i.v. contendo fração proteica LP. **P. 63.**
- Figura 10:** Valores médios 30, 60, 90, 120 minutos; dos parâmetros funcionais renais de ratos frente à adição de LP (10 µg/mL) ao sistema de perfusão *ex-vivo* (n=4). Os primeiros 30 minutos de perfusão são considerados como controle interno do experimento. Dados

apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$.

P. 64.

Figura 11: Valores médios 30, 60, 90, 120 minutos; dos parâmetros funcionais renais de ratos frente à adição de LP (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ao sistema de perfusão *ex-vivo* (n=4). Os primeiros 30 minutos de perfusão são considerados como controle interno do experimento. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$.

P. 65.

Figura 12: Valores médios 30, 60, 90, 120 minutos; dos parâmetros funcionais renais de ratos frente à adição de LP (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ao sistema de perfusão *ex-vivo* (n=4). Os primeiros 30 minutos de perfusão são considerados como controle interno do experimento. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$.

P. 66.

Figura 13: Valores médios totais ao final dos 120 minutos de perfusão; dos parâmetros funcionais renais de ratos frente à adição de LP (10, 30 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ao sistema de perfusão *ex-vivo* (n=4/dose). Os primeiros 30 minutos de perfusão são considerados como controle interno do experimento. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$.

P. 66.

Figura 14: Representação gráfica dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos renais da perfusão renal com LP, nas doses de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (n=4/grupo) .

P. 67.

Figura 15: Representação gráfica dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos renais da perfusão renal com LP, na dose de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (n=4/grupo).

P. 70.

Figura 16 Representação gráfica dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos renais da perfusão renal com LP, na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (n=4/grupo).

P. 73.

Figura 17: Efeito da fração LP em células tubulares renais (MDCK)

P. 76.

Figura 18: Citometria de fluxo em células de cultura MDCK na ausência e presença de LP na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

P. 77.

Figura 19: Distribuição das células selecionada através do *Cellquest*, de acordo com a intensidade de marcação com Anexina V e 7AAD.

P. 78.

Figura 20: Estruturas esquemáticas do néfron.

P. 79.

Figura 21: Fotomicrografias de Lâminas histopatológicas.

P. 81.

SUMÁRIO

	PÁGINAS
1. INTRODUÇÃO.	16.
1.1. Justificativa.	18.
1.2. Objetivos.	20.
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.	21.
2.1. Doenças Cardiovasculares e Hipertensão Arterial Sistêmica.	21.
2.2. Aspectos Biológicos de Plantas Lactíferas.	28.
2.3. Aspectos Bioquímicos de Fluidos Lactíferos.	29.
2.3.1. Propriedades Funcionais de Fluidos Lactíferos.	30.
2.3.2. Utilização de Fluidos Lactíferos.	31.
2.3.3. Caracterização Botânica de <i>Calotropis procera</i> (Ait.)R.Br.	33.
2.3.4. Atividades Biológicas da <i>Calotropis procera</i> :	35.
3. MATERIAIS E MÉTODOS.	41.
3.1. Obtenção da Fração Proteica do Látex LP.	41.
3.2. Animais.	42.
3.3. Linhagens Celulares.	42.
3.4. Modelos Experimentais:	43.
3.4.1. Avaliação do Sistema Cardiovascular.	43.
3.4.1.1. Modelo Experimental para Aferição da PAM.	43.
3.4.1.2. Modelo Para Avaliação da Contratilidade em Músculo liso.	45.
3.4.2. Avaliação de Efeitos Renais.	47.
3.4.2.1. Grupos Experimentais.	47.
3.4.2.2. Sistema de Perfusão Renal.	47.
3.4.2.3. Técnica Cirúrgica da perfusão renal <i>ex-vivo</i> .	50.
3.4.2.4. Protocolo Experimental.	50.
3.4.2.5. Avaliação Bioquímica.	52.
3.4.2.6. .Análise Histopatológica.	52.
3.4.2.7. .Escore de Lesão Renal.	53.
3.4.3. Avaliação da Toxicidade Renal <i>in vitro</i> .	56.
3.4.3.1. Cultivo e Tratamento das Células MDCK.	56.
3.4.3.2. Ensaio de Viabilidade Celular.	57.
3.4.3.2.1. Ensaio com MTT.	57.
3.4.3.4. Citometria de Fluxo.	59.
3.5. Análise Estatística.	59.
4. RESULTADOS	60.
4.1. Efeitos de LP na PAM de Ratos.	60.
4.2. Efeitos Renais da Fração Proteica LP.	60.
4.2.1. Modelo de Perfusão Renal de Rato.	64.
4.2.2. Efeito da LP em Células MDCK.	76.
4.2.3. Citometria DE Fluxo em Células de Cultura MDCK.	76.
4.3. Alterações Histopatológicas e Morfológicas Renais.	79.
5. DISCUSSÃO	82.
6. CONCLUSÕES.	91.
REFERÊNCIAS	92.

1. INTRODUÇÃO.

A política nacional de fomento diferenciado para o Norte e Nordeste brasileiro tem estimulado a formação de novos pesquisadores e grupos de pesquisa nas mais diversas áreas do conhecimento, principalmente nas Universidades públicas. Pesquisadores dedicados ao estudo da biodiversidade destas regiões têm destaque na produção do conhecimento científico novo e inovador.

Entretanto há um forte apelo ao estudo de substâncias naturais de origem vegetal, algumas as quais, as rotas biossintéticas derivam do metabolismo secundário das plantas. No caso do látex é extraordinário o número de novas estruturas químicas identificadas e a imediata busca de suas aplicações.

Tal iniciativa é denotada como química de produtos naturais que associada a estudos em modelos fisiológicos, farmacológicos e toxicológicos entre outros em animais, órgãos e células tem gerado um conhecimento da química funcional de espécies da Caatinga.

Plantas laticíferas representam uma fonte potencial para produção de fármacos, tanto para uso popular, através de uso direto dos vegetais sem processamento industrial, tanto quanto para a alopatia e homeopatia.

Compostos ativos identificados em diferentes tecidos ou órgãos vegetais são frequentemente responsáveis pelo contínuo desenvolvimento de novos fármacos. Os fármacos são amplamente acessíveis aos cidadãos dos países ditos desenvolvidos, menos acessíveis noutros países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos.

Como resultado as moléculas biologicamente ativas, muitas encontradas em seres vivos, são utilizadas no mundo como agentes biotecnológicos, sejam fitoterápicos, medicamentos ou outras formulações conhecidas. Ou ainda, apenas por sua atividade toxicológica.

Enquanto que extratos naturais são mais explorados nos países ditos não desenvolvidos, de forma empírica, e até mesmo rudemente experimental pela população carente. Dentro desta ótica pode ser concluído que os vegetais são fontes fundamentais de biomoléculas ativas e que necessitam de um estudo aprofundado e sequencial para a condução da geração de fármacos e fitoterápicos, observando primeiramente efeitos tóxicos, esses que sugerem muitos outros fins, além dos já citados, podem agregar valor, linha de produção e, por conseguinte empregos e impostos, além de levar o benefício de suas propriedades a um maior número de cidadãos de forma mais padronizada e

controlada.

O primeiro passo na investigação da toxicidade de um produto natural culmina na descoberta de substâncias com potenciais farmacológicos diversos.

Exemplo disto foram os estudos realizados a partir do veneno da *Bothrops jararaca*, os quais resultaram na descoberta de moléculas originando fármacos com ação sobre a enzima conversora da angiotensina (Ferreira SH, 1998). Com o mesmo raciocínio, têm-se linhas de pesquisa voltadas para investigação de efeitos farmacológicos de plantas lactíferas, resultando em descobertas como a da atividade antibiótica e anticancerígena do látex de janaguba (*Himanthus drasticus*). (de CARVALHO et. al., 2015) e (UPADHYAY, 2011).

Entretanto, a presente Tese foca na investigação da fração proteica do látex de *Calotropis procera*, um pequeno arbusto podendo alcançar até uns três metros e meio de altura, com grande distribuição no semiárido nordestino, e facilmente visualizado em Fortaleza-CE. No Brasil, grupos de pesquisa plenamente envolvidos no estudo de vegetais laticíferos assim como em nosso contexto estão sendo formados e fortalecidos de suas propriedades básicas, funcionais e ou aplicadas.

Esta linha de pesquisa representa uma ação inovadora no campo da farmacologia bioquímica brasileira e que visa estudar um material biológico bem definido (látex), oriundo de plantas abundantes, porém não exploradas no Estado do Ceará, salvo pela medicina popular. Assim é ainda mais relevante o estudo toxicológico deste material, visto que formulações contendo látex de plantas são comercializadas, e consumidas sem comprovação científica de sua eficácia ou da presença de toxicidade associada a esses produtos.

Portanto, como reforço nesta investigação, o Laboratório de Farmacologia Bioquímica aonde eu trabalho, inclui em suas linhas de pesquisa, proteínas extraídas de plantas não cultivadas encontradas na região Nordeste. Sementes, e mais recentemente, fluidos laticíferos, constituem a matéria prima biológica, fonte de investigação.

Tal iniciativa é de grande relevância sob o prisma da necessidade de conhecimento e exploração das proteínas como classe de biomoléculas com grande potencial farmacológico. Nos resultados acumulado destes estudos, inclui-se *Calotropis procera* e *Plumeria rubra*, representando assim de fato, fontes de biomoléculas de valor biológico pungente. (FREITAS, 2006)

O estudo de vegetais laticíferos com ênfase proteica de *Calotropis procera* no laboratório de Bioquímica Farmacológica foi iniciado no ano de 2006, com a avaliação da

toxicidade *in vivo* e *in vitro* (Alencar *et. al.*, 2004) e dos efeitos de sua ação tóxica (Ramos *et. al.*, 2006). Desde então substâncias extraídas do látex bruto, continuamente fracionado, são exploradas em diversos modelos biológicos.

O vegetal *Calotropis procera*, objeto principal desta Tese, é um exemplar laticífero amplamente distribuído em toda região Nordeste do Brasil, embora os relatos mostrem que não seja uma planta nativa e que foi introduzida em 1900, no Brasil (planta de caráter árido e semiárido). Esta planta é reconhecidamente de caráter medicinal, e também tem propriedades tóxicas, inseticidas (Ramos *et. al.*, 2006) e tóxicas a caprinos (EL BADWI *et. al.*, 1998).

O uso popular de suas folhas, raízes e látex com propósitos curativos está documentado em artigos científicos oriundos da Ásia, Oriente Médio e Norte da África.

Nosso grupo de pesquisa tem nos últimos anos, investigando este potencial através do estudo bioquímico e farmacológico de proteínas extraídas do látex de *C. procera*.

Em uma mesma preparação já foram identificadas a presença de uma eficaz atividade anti-inflamatória (ALENCAR *et. al.*, 2004), associada a uma ação nociceptiva (SOARES *et. al.*, 2005) que é somada a atividade anti-neoplásica e hepatoprotetora (CHOEDON *et. al.*, 2006), aumento dos níveis sanguíneos de óxido nítrico (Ramos *et. al.* 2009), efeito vasodilatador e os ensaios de análises toxicológicas desenvolvidas não haviam detectado efeitos adversos (RAMOS *et. al.* 2009).

Esta espécie vegetal foi incorporada no século XIX no Brasil.

É relatado seu uso terapêutico da medicina ocidental homeopática. É rica em princípios ativos, especialmente do grupo dos cardenolídeo cardioativos, cuja principal molécula é a Calotropina (SEIBER *et. al.*, 1982).

A planta e seu látex fazem parte do sistema de medicina popular da Índia e Paquistão, além de outros países asiáticos.

O látex possui ainda esteróides, carbonatos orgânicos, além de enzimas envolvidas no metabolismo proteolítico (KHAN & MALIK, 1989; OLEA *et. al.*, 2002).

1.1. Justificativa.

O trabalho descrito a seguir foi inteiramente contextualizado dentro das linhas de pesquisa desenvolvidas pelo Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC e Biologia de Proteínas Vegetais do departamento

de Bioquímica da UFC.

Para tal ação contamos com demais laboratórios colaboradores, o laboratório de farmacologia de venenos e toxinas e lectinas (LFAVET), laboratório de farmacologia do músculo liso (LAFARMULI) do departamento de Farmacologia da UFC e o laboratório de cultura de Células (LCC) do departamento de análise clínicas da UFC.

No sentido de dar continuidade aos estudos sobre a caracterização bioquímica e farmacológica de proteínas do látex de *C. procera*, bem como seu potencial toxicológico. Seguimos então, investigando os efeitos vasculares e renais, a partir de sua ação hipotensora num estudo piloto por nós conduzido.

Assim, acreditamos que com a realização desta Tese estaríamos somando evidências científicas que apontariam para o credenciamento do látex de *C. procera* (CP) para a produção de fármaco, fitoterápico ou outra ferramenta farmacológica.

Segundo seu uso popular e devido o aumento dos níveis sanguíneos de óxido nítrico (RAMOS *et. al.*, 2009).

Essa planta laticífera: *Calotropis procera* tem sido usada na medicina popular com vários propósitos, a exemplo da laticífera *Calotropis procera*. Popularmente, o látex é utilizado como instrumento para combater a dor de dente, aplicado através de um cotonete embebido do mesmo, sobre o dente afetado. Considerando essa descrição, a fração de proteínas do látex já detentora de atividades anti-inflamatória e anticancerígena foi avaliada quanto à ação antinociceptiva em animais experimentais através de três modelos experimentais (SOARES *et. al.*, 2005).

O látex da CP possui entre outros compostos, frações proteicas. Uma delas foi objeto desta Tese, sendo nomeada de fração LP. Os procedimentos iniciais para obtenção da LP foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC coordenado pelo Professor Doutor Márcio Viana Ramos. O potencial toxicológico do látex da CP também constou como um importante enfoque nesta Tese, dado às características tóxicas e alergênicas detectadas em outros estudos.

1.2. Objetivos.

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar os efeitos de uma fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) sobre os sistemas cardiovascular e renal em ratos.

Para tanto, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- Investigar a ação da fração LP quanto aos parâmetros fisiológicos no sistema cardiovascular;
- Estudar o efeito da fração LP em rim isolado de rato;
- Avaliar as possíveis alterações histológicas renais induzidas pela fração LP;
- Avaliar o efeito da fração LP em células tubulares renais.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.

2.1- Doenças cardiovasculares: Epidemiologia, terapia medicamentosa e não medicamentosa.

As doenças cardiovasculares são atualmente responsáveis por aproximadamente 40% da mortalidade mundial. A hipertensão arterial sistêmica (HAS) representa o principal fator de risco para as doenças cardiovasculares e seu diagnóstico precoce vem sendo enfatizado como importante estratégia de saúde pública.

No Brasil, estudos apontam uma prevalência da HAS que varia de 22 até 44% na população adulta. Embora a maior parte dos diagnósticos de HAS seja firmada na idade adulta, sabe-se que essa doença pode ter seu início na infância. Assim, a medida de pressão arterial (PA) tem sido recomendada pelas VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, bem como pela Segunda Força Tarefa Americana para Controle da PA em Crianças, desde 1975 como importante componente na rotina pediátrica, permitindo o diagnóstico precoce da doença (MAGALHÃES *et. al.*, 2013).

A hipertensão é uma epidemia que afeta um bilhão de pessoas, sendo o maior fator de risco de morte no mundo. Estatísticas mundiais de saúde, em 2012, estimaram que a prevalência da hipertensão fosse de 29,2% em homens e de 24,8% em mulheres.

A hipertensão não se limita à população rica, mas afeta os países em todos os grupos de renda. Afora o total de 58,8 milhões de mortes no mundo em 2004, a pressão arterial elevada foi responsável por 12,8% (7,5 milhões de mortes). A hipertensão é responsável por 51% das mortes por doenças vasculares cerebrais e 45% das mortes por doenças isquêmicas do coração no mundo.

Ao contrário da crença popular de que a hipertensão é mais importante nos países de alta renda, as pessoas dos países de baixa ou média renda tem o dobro do risco de morrer por hipertensão (KUMAR, J. 2013). (GUIDELINES FOR THE MANAGEMENT OF HYPERTENSION. WORLD HEALTH ORGANIZATION - INTERNATIONAL SOCIETY OF HYPERTENSION.1999)

De acordo com o Comitê Conjunto de Prevenção Nacional, Detecção e Avaliação e Tratamento (EUA) da hipertensão, em indivíduos com mais de 50 anos, a Pressão Arterial Sistólica maior que 140 mm Hg é um fator de risco cardiovascular. A partir da Pressão Arterial de 115/ 75 mm Hg, o risco de doença cardiovascular dobra para cada incremento de 20/10 mm Hg. Indivíduos normotensos (PAS< 120 mm Hg; PAD<80 mm Hg) com 55 a 65 anos tem 90% de risco de desenvolver hipertensão por volta dos 80 a 85 anos de

idade (DREISBACH, 2014).

Quanto a Prevalência da hipertensão os dados disponíveis são limitados quanto à prevalência da hipertensão e as tendências temporais dos valores de Pressão arterial em diferentes países da Europa. Geralmente a prevalência da hipertensão aparece por volta de 30 a 45% da população em geral, sem diferença na média da pressão arterial entre os países.

Uma forte relação entre a prevalência da hipertensão e a mortalidade por infarto foi relatada ESC/ESH 2013. A incidência e tendência da mortalidade por infarto na Europa foi analisada pelo uso das estatísticas da Organização Mundial de saúde (OMS). Países do Oeste Europeu exibiram tendência de queda em contraste com países do leste, os quais apresentaram um claro aumento em mortes por infarto.

Desta maneira quanto a Hipertensão e o risco cardiovascular, por um longo tempo, os consensos sobre hipertensão focaram-se em valores da pressão arterial como únicos parâmetros ou variáveis que determinavam o tipo de tratamento.

Em 1994, O ESC, ESH e Sociedade europeia de aterosclerose, desenvolveram recomendações conjuntas na prevenção de doenças das coronárias na prática clínica e enfatizavam a prevenção de doenças coronarianas, relacionadas com o risco cardiovascular. Essa abordagem atualmente é aceita e integrada desde 2003 aos consensos ESH/ESC para o gerenciamento da pressão arterial.

O conceito é baseado no fato que somente uma pequena fração da população hipertensa tem apenas elevação da pressão arterial, com a maioria exibindo fatores de risco cardiovasculares adicionais.

Além disso, quando concomitantemente presentes, pressão arterial e outros riscos cardiovasculares, apresentam complicações maiores que a soma dos componentes individuais. Finalmente em indivíduos de alto risco, devem-se usar estratégias de tratamento anti-hipertensivas com combinações de fármacos, que podem ser diferentes daqueles que apresentam baixos riscos individuais. Evidências demonstram que em altos riscos individuais, o controle de pressão arterial é mais difícil e mais frequentemente requer combinação de drogas anti-hipertensivas com outras terapias associadas, como anti-lipidêmicas, o que encarece o tratamento da hipertensão. (MANCIA *et. al.*, 2013).

Quanto a Avaliação do risco cardiovascular: em todas as condições doenças cardiovasculares de alto ou muito alto, esse risco deve ser estimado, para uma necessária redução, considerando as co-morbidades.

Alguns métodos computadorizados foram desenvolvidos para estimar o risco

cardiovascular total. Seus valores e limitações foram revisados recentemente. Um modelo de avaliação da sistemática do risco coronário foi desenvolvido através de escores baseado em estudos contínuos.

O modelo estima o risco de morte cardiovascular, não apenas coronário, com doença há mais de dez anos, baseada na idade, gênero, hábito de fumar, níveis de colesterol total e Pressão arterial sistêmica. O modelo de escores permite a calibração dos gráficos de países individuais, os quais são numerosos na Europa, com dois tipos de gráficos prováveis, países de alto risco e outro de baixo risco (MANCIA *et. al.*, 2013).

A versão eletrônica interativa dos escores é conhecida como escore do coração. (www.heartscore.org).

A hipertensão arterial sistêmica é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (SBC/SBH/SBN, 2013).

A HAS é o mais importante fator de risco para o desenvolvimento de doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, doença cerebrovascular, doença renal crônica e fibrilação atrial e tem sido associada ao desenvolvimento de déficit cognitivo e demência. A mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV) aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial a partir de 115/75 mm Hg de forma linear, contínua e independente.

Em uma década, cerca de 7,6 milhões de mortes no mundo foram atribuídas à HAS, 54% por acidente vascular encefálico e 47% por doença isquêmica do coração, sendo a maioria em países de baixo e médio desenvolvimento econômico e mais da metade em indivíduos entre 45 e 69 anos. Considerando-se valores de PA iguais ou superiores a 140/90 mm Hg, 22 estudos encontraram prevalências de HAS na população adulta entre 22,3% e 43,9% (média de 32,5%), sendo superior a 50% entre 60 e 69 anos e 75% acima de 70 anos (SBC, 2013).

Definição e classificação (VI DBH/SBC).

Para a classificação da HAS pelos valores de pressão arterial sistólica e diastólica observe na próxima página a **Tabela 1**.

Tabela 1 – Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual no consultório (> 18 anos).

Classificação	Pressão sistólica (mmHg)	Pressão diastólica (mmHg)
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limitrofe*	130 - 139	85 - 89
Hipertensão estágio 1	140 - 159	90 - 99
Hipertensão estágio 2	160 - 179	100 - 109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada	≥ 140	< 90

Quando as pressões sistólica e diastólica situam-se em categorias diferentes, a maior deve ser utilizada para classificação da pressão arterial.

* Pressão normal-alta ou pré-hipertensão são termos que se equivalem na literatura.

Fonte: VI Diretriz Brasileira de Hipertensão/Sociedade Brasileira de Cardiologia (2013).

A avaliação inicial de rotina para o paciente hipertenso deve ser constituída de exames complementares tais como: análise de urina; potássio plasmático; creatinina plasmática e estimativa do ritmo de filtração glomerular; glicemia de jejum; colesterol total, HDLc, triglicérides plasmáticos; ácido úrico plasmático; eletrocardiograma convencional.

O processo de aparecimento da HAS depende da relação entre fatores genéticos e ambientais, no entanto não sabido como estas interações acontecem. Sobretudo, sabe-se que está associada a modificações funcionais do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), do sistema nervoso autônomo simpático, além da disfunção endotelial e outros mecanismos humorais.

A Pressão sistólica é a pressão medida durante a sístole cardíaca, quando o coração se contrai e o volume cardíaco de sangue é ejetado. E a pressão diastólica é medida quando o coração relaxa e recebe o sangue que está nos vasos sanguíneos. A diferença entre o volume ejetado, sístole, e o recebido pelo coração, diástole, é denominado de débito cardíaco.

A pressão arterial é determinada pelo produto do débito cardíaco (DC) e da resistência vascular periférica (RVP). Nos indivíduos normais e nos portadores de hipertensão arterial essencial existe um espectro de variação do DC com respostas concomitantes da RVP para um determinado nível de PA. Essa heterogeneidade existe em condições de repouso e mesmo em situações de estímulo. A contratilidade e o relaxamento do miocárdio, o volume sanguíneo circulante, o retorno venoso e a

frequência cardíaca podem influenciar o DC. Assim como, a RVP é determinada por vários mecanismos vasoconstrictores e vasodilatadores como o sistema nervoso simpático, o sistema renina angiotensina e a modulação endotelial. A RVP depende também da espessura da parede das artérias, existindo uma potencialização ao estímulo vasoconstrictor nos vasos nos quais há espessamento de suas paredes.

A regulação da pressão arterial (PA) é uma das funções fisiológicas mais complexas do organismo, dependendo das ações integradas dos sistemas cardiovasculares, renal, neural e endócrino. A HAS parece ter causa multifatorial para a sua gênese e manutenção. A investigação da sua fisiopatologia necessita de conhecimentos dos mecanismos normais de controle da PA para procurar então, evidências de anormalidades que precedem a elevação da PA para níveis considerados patológicos.

A associação entre HAS e doença renal crônica (DRC) é bem conhecida, tendo em vista que a doença renal é de longe a maior causa de HAS secundária. Sua prevalência é bastante elevada em pacientes com doença renal, situando-se entre 60%–100%, de acordo com o tipo de população estudada. Entretanto, existem diferentes tipos de acometimento renal, sendo o diagnóstico causal importante para a escolha adequada do tratamento anti-hipertensivo a ser instituído (SBC/SBH/SBN, 2013).

No Brasil a hipertensão arterial é um grave problema de saúde pública, sendo o agravo mais comum na população adulta e um fator de risco para as doenças cardiovasculares (SILVA, PENILDON, 2010).

O objetivo primordial do tratamento da hipertensão arterial é a redução da morbidade e da mortalidade cardiovasculares. Assim, os anti-hipertensivos devem não só reduzir a pressão arterial, mas também os eventos cardiovasculares fatais e não fatais, e, se possível, a taxa de mortalidade. As evidências provenientes de estudos de desfechos clinicamente relevantes, com duração relativamente curta, de três a quatro anos, demonstram redução de morbidade e mortalidade em estudos com diuréticos, betabloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA), bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina II e antagonistas dos canais de cálcio, embora a maioria dos estudos utilize, no final, associação de anti-hipertensivos.

Sendo essas as principais classes de anti-hipertensivos disponíveis para uso clínico além dos Inibidores adrenérgicos (de ação central), agonistas alfa-2 centrais, beta bloqueadores; alfa-bloqueadores, bloqueadores alfa-1 adrenérgicos, entre eles a metildopa, vasodilatadores diretos e inibidor direto da renina. (SILVA, PENILDON, 2010).

Esse benefício é observado com a redução da pressão arterial *per se* e, com base nos estudos disponíveis até o momento, parece independe da classe de medicamentos utilizados.

Meta - análises recentes indicam que esse benefício é menor com betabloqueadores, em especial com atenolol, quando em comparação com os demais anti-hipertensivos. (VI - DIRETRIZ BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010). Uma meta - análise de 147 ensaios clínicos randomizados de anti-hipertensivos e sua associação com diminuição de mortalidade, eventos cardiovasculares e acidente vascular cerebral. 108 estudos avaliaram diferenças na pressão arterial e 46 compararam fármacos, totalizando 464.000 participantes (LAW, et.al., 2009).

Divididos em três categorias mutuamente excludentes: participantes sem história de doença vascular, participantes com história de doença coronariana e participantes com história de acidente vascular cerebral.

Os resultados obtidos na meta-análise atual foram avaliados e interpretados no contexto dos dados da maior meta-análise de estudos de “cohort” já realizada, que incluiu um total de 958.000 pessoas, particularmente os resultados dos estudos em que o desfecho era apenas a diferença na pressão arterial obtida com a intervenção terapêutica.

Na meta-análise de estudos observacionais, verificou-se que quanto mais baixa a pressão arterial menor a mortalidade e eventos cardiovasculares, sem evidências de que exista um ponto de corte a partir do qual não haveria benefícios em pressões mais baixas pelo menos até níveis pressóricos ao redor de 115/75 mm Hg. (LAW *et.al.*, 2009).

No Brasil, segundo pesquisadores¹⁴ estudos populacionais realizados nos últimos quinze anos, com 14.783 indivíduos (PA < 140/90 mm Hg), revelaram baixos níveis de controle da PA (19,6%). Faz-se necessária, para a prevenção das doenças cardiovasculares, a identificação precoce de lesões subclínicas de órgãos-alvo por meio do acompanhamento da depuração de creatinina estimada < 60 ml/min/1,72 m²; do baixo ritmo de filtração glomerular ou depuração de creatinina (< 60 ml/min); da microalbuminúria 30-300 mg/24 horas ou ainda, da relação albumina/creatinina > 30 mg/g. (TABASSUM & AHMAD, 2012).

A hipertensão arterial pode ser prevenida ou postergada. As mudanças no estilo de vida são entusiasticamente recomendadas na prevenção primária da HAS, notadamente nos indivíduos com PA limítrofe. Tais adequações de estilo de vida reduzem a PA, bem como a mortalidade cardiovascular (SBC, 2013). Hábitos saudáveis de vida devem ser adotados desde a infância e a adolescência, respeitando-se as características regionais,

culturais, sociais e econômicas dos indivíduos. As principais recomendações não medicamentosas para prevenção primária da HAS são: alimentação saudável, baixo consumo de sódio e álcool, adequada ingestão de potássio, combate ao sedentarismo e ao tabagismo e controle da massa corpórea. Tais recomendações são indicadas tanto para a prevenção da hipertensão como coadjuvantes do tratamento medicamentoso de hipertensos. (SBC, 2013).

A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) reconhece a necessidade de uma ação integrada contra as DCV e irá propor aos países membros que estabeleçam a meta global de reduzir a taxa de mortalidade por DCV em 20% na década de 2011-2020 em relação à década precedente (SBC/SBH/SBN, 2013).

Mas o tratamento farmacológico da HAS muda de forma expressiva o prognóstico da doença, independente dos fármacos anti-hipertensivos utilizados tanto em monoterapia quanto em combinação. Inúmeros estudos randomizados e meta - análises demonstraram os benefícios da redução dos níveis pressóricos sobre a morbidade e mortalidade cardiovasculares.

Diversos ensaios clínicos demonstram reduções relevantes em estudos com diuréticos, betabloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina, bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina II e com antagonistas dos canais de cálcio (ACC). Uma vez que a monoterapia controla a pressão em menos de 1/3 dos hipertensos, a maioria dos ensaios clínicos utilizou associações de fármacos para o controle tensional, demonstrando que os benefícios alcançados independem das classes utilizadas (ESH/ESC, 2013).

Segundo as VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão deve-se iniciar o tratamento com monoterapia nos pacientes em estágio 1 com risco baixo ou moderado, e com combinações de fármacos nos estágios 2 ou 3, ou estágio 1 com risco alto ou muito alto (SBC/SBH/SBN, 2013).

A inibição da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA) é um alvo terapêutico moderno e eficaz no tratamento da hipertensão arterial. Na cascata enzimática que envolve o sistema renina-angiotensina, a ECA promove a remoção dos aminoácidos histidil-leucina da angiotensina I para formar o octapeptídeo angiotensina II, a qual é fisiologicamente ativa, em diversos sistemas, e considerada como um dos mais potentes vasoconstritores endógenos conhecido.

Portanto, uma racionalidade no tratamento da hipertensão seria administrar drogas ou compostos de origem natural que inibam seletivamente a ECA. Já em 2006, havia na

literatura cerca de 158 compostos isolados de plantas e moléculas de origem natural com potencial anti-hipertensivo, baseado na inibição *in vitro* da ECA (CHAVAN BHAGYASHRI, 2015).

A Hipertensão arterial primária possui causa desconhecida ou sem uma relação causal direta, sendo diagnosticada em 90 a 95% dos pacientes hipertensos, enquanto que a hipertensão secundária possui uma causa identificável tais como doença renal, desordens metabólicas, obesidade, defeito congênito (TABASSUM & AHMAD, 2011).

A associação entre HAS e DRC é bem conhecida, tendo em vista que a doença renal é de longe a maior causa de HAS secundária. Sua prevalência é bastante elevada em pacientes com doença renal, situando-se entre 60%–100%, de acordo com o tipo de população estudada. Entretanto, existem diferentes tipos de acometimento renal, sendo o diagnóstico causal importante para a escolha adequada do tratamento anti-hipertensivo a ser instituído (SBC/SBH/SBN, 2013).

As principais ações dos anti-hipertensivos são relacionadas a alterações: na Pressão arterial, frequência cardíaca, débito cardíaco, resistência vascular periférica, fluxo sanguíneo, pressão venosa central.

As principais consequências da HAS são hipertrofia ventricular esquerda, insuficiência cardíaca congestiva, ataque isquêmico transitório, acidente vascular cerebral, aneurisma dissecante da aorta, insuficiência renal crônica (SILVA, PENILDON, 2010).

2.2.- Aspectos biológicos de plantas laticíferas.

Quando uma referência é feita à palavra látex, a seringueira, árvore nativa da Amazônia é imediatamente lembrada. Isto é válido tanto para o conhecimento popular como para o científico.

Cerca de 10% de todas as angiospermas, exsudam látex após dano tecidual, e este látex possui funções desconhecidas no metabolismo primário das plantas (CHAVAN BHAGYASHRI, 2015). Mais de 95 % de todo o conhecimento bioquímico e funcional de fluidos laticíferos advêm de trabalhos com esta espécie.

A *Hevea brasiliensis* cuja designação popular é seringueira foi o primeiro vegetal laticífero a ter seu fluido leitoso estudado. A motivação é clara. O fluido biológico designado de látex é rico em polímeros, poli-isopreno, que conferem a propriedade da borracha, artigo industrial de elevado valor econômico agregado.

Entretanto, milhares de espécies de plantas produzem constitutivamente algum tipo de látex. Entre as mais comuns e conhecidas estão espécies de “Euphorbiaceae”, seringueira, mamona, Cróton mandioca ou mandioca brava “Apocynaceae”: espirradeira e jasmim manga e “Asclepidaea”, ciúme “Violacea”: violeta, “Annonaceae”: ata, ou pinha, ou fruta do conde, além de graviola, e “Rubiaceae”: café “Caricaceae”, mamoeiro etc. (UPADHYAY, 2011)

O látex vegetal pode ser definido como sendo um fluido endógeno que se acumula em um sistema de canais denominados laticíferos. Alguns fungos também produzem látex, mas essencialmente as plantas são suas fontes primordiais.

Os laticíferos formam verdadeiros citoplasmas celulares com organelas circulantes e onde ocorre intensa síntese de biomoléculas, quase sempre prevalecendo poliisoprenos, que formam a borracha. Laticíferos podem estar presentes em toda a planta, mas prevalecem no caule, nos frutos e principalmente nas folhas.

O látex geralmente é uma resposta imunológica, regenerativa e ou defensiva dos vegetais contra danos de possíveis predadores e até mesmo parasitas. O teor proteico de fluidos laticíferos é considerável em muitos casos e rico em atividades enzimáticas diversificadas (YEANG *et. al.*, 2002).

De acordo com a constituição química já estudada em alguns fluidos laticíferos, a presença de proteínas envolvidas em atividades antioxidantes, proteolíticas e outras enzimas hidrolíticas fortalece a hipótese de que a distribuição dos laticíferos e seu conteúdo bioquímico estão implicados na defesa da planta.

2.3.- Aspectos Bioquímicos de Fluidos Laticíferos.

Além de componentes celulares, essa secreção é composta por uma grande variedade de substâncias como proteínas enzimáticas e não enzimáticas, flavonóides, triterpenos, carbonatos, alcalóides, vitaminas, carboidratos, lipídios e aminoácidos (MORCELLE, *et. al.*, 2004).

Cardenólídeos estão presentes no látex de *C. procera* (SEIBER *et. al.*, 1982). Proceragenina, um cardenólídeo antibacteriano isolado da extração metanólica de *C. procera* apresenta peso molecular de 374,2 e fórmula molecular correspondente a $C_{23}H_{34}O_4$. Este composto mostrou atividade antibacteriana frente à *Micrococcus luteus*, *Aeromonas caviae*, *Pseudomonas pseudomalliae* e *Streptococcus agalactiae* (CHAVAN BHAGYASHRI, 2015).

O látex possui uma grande diversidade de proteínas, sendo especialmente rico em enzimas com atividades proteolíticas. Relata-se a ocorrência de inúmeras proteinases no látex de diversas espécies do gênero *Euphorbia*. Denominadas de euforbaínas, estas proteinases são classificadas como do tipo serínicas (LYNN & CLEVETTE-RADFORD, 1987b).

No látex de *Hevea brasiliensis*, relata-se também a ocorrência de proteases similares que foram denominadas heveminas (LYNN & CLEVETTE-RADFORD, 1986b) e o mesmo constata-se no látex de *Elaeophorbium drupifera* (LYNN AND CLEVETTE-RADFORD, 1985) e de *Carica papaya*, o mamoeiro, também estudada pelo seu conteúdo de proteinases do tipo cisteínicas, tais como: papaína e quimopapaínas (MCKEE & Smith, 1986) e (JACQUET *et. al.*, 1989) e (FREITAS, 2006).

Também têm sido estudados no látex de plantas, especialmente em *H. brasiliensis*, outros tipos de proteínas, como: lectinas, quitinases (JEKEL *et. al.*, 1991), beta-1,3-glucanases (CHEYE & CHEUNG, 1995), lisozimas, Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs), glicosidases (GIORDANI, 1993), amilases (LYNN AND CLEVETTE-RADFORD, 1987a), inibidores de proteinases (ARCHER, 1983; SRITANYARAT *et. al.*, 2006) e (FREITAS, 2006). Dentre outros.

A diversidade molecular encontrada nos diferentes fluidos laticíferos estudados sugere que este tecido especializado deva estar ativamente envolvido em eventos biológicos distintos, desde o acúmulo de carbonos nos polímeros de isopreno (borracha) até em aspectos defensivos traduzidos pela ocorrência de diversas proteínas caracterizadas como proteínas relacionadas à resposta a patogênese vegetal e substâncias causadoras de eventos toxicológicos e até letais para mamíferos.

Os fluidos laticíferos também parecem se constituírem em um instrumento de defesa contra os mamíferos. Além de induzir processos alérgicos, como no caso do látex de *H. brasiliensis*, fluidos laticíferos já foram descritos como irritantes; causam lesões sérias quando em contato com os olhos e quando ingeridos podem levar ao óbito (AL-MEZAINI *et.al*, 2008).

2.3.1- Propriedades Funcionais de Fluidos Laticíferos.

Os vegetais estão constantemente expostos a uma variedade de estresses ambientais. Considerando a desvantagem de estarem ancorados no solo e de serem desprovidos de locomoção, têm desenvolvido várias estratégias sofisticadas de proteção

contra patógenos e predadores, como bactérias, fungos, vírus e herbívoros, assim como contra estresses abióticos. (FREITAS, 2006).

Uma forma de defesa contra a invasão de patógenos e insetos encontrada pelos vegetais são os sistemas de canais que contêm várias secreções, tais como os laticíferos, ductos, resinas e mucilagens (PICKARD, 2008; MOURSY *et. al.*, 1997).

No caso de vegetais que produzem látex, comumente este pode ser extravasado após o vegetal sofrer algum dano mecânico. Imediatamente após este evento, fluidos laticíferos tendem a sofrer um processo mecânico que lembra a formação de um coágulo, embora não haja certamente qualquer correlação bioquímica ou fisiológica no evento.

Entretanto, este processo confere ao látex a propriedade adesiva, ou colante, o que seria capaz de imobilizar pequenos insetos e também protege a área afetada no contexto físico e químico, evitando que a área injuriada seja penetrada por patógenos (MOURSY, 1997).

Neste contexto, vários resultados apontando para uma ação defensiva de fluidos laticíferos no combate a fungos e insetos têm sido propostos (PEREIRA *et. al.*, 1999; RAMOS *et. al.*, 2007). A presença de proteínas relacionadas à defesa contra patógenos (PR-Proteínas), como glucanases e quitinases (VAN LOON & VAN STTRIEN, 1999; JEKEL *et. al.*, 1991), proteinases (FREITAS *et. al.*, 2007; KONNO *et. al.*, 2004; MOUSSAOUI *et. al.*, 2001) e inibidores de proteinases (SRITANYARAT *et. al.*, 2006; MONTIL *et. al.*, 2004), fortalece a hipótese que essa secreção age como uma defesa do indivíduo contra o ataque de insetos e patógenos.

Os fluidos laticíferos também parecem se constituem em um instrumento de defesa contra os mamíferos. Além de induzir processos alérgicos, como no caso do látex de *H. brasiliensis*, fluidos laticíferos já foram descritos como irritantes; causam lesões sérias ao contato com os olhos e quando ingeridos podem levar ao óbito (AL-MEZAINE *et. al.*, 2008).

2.3.2- Utilizações dos Fluidos Laticíferos.

A utilização do látex produzido por vegetais teve seu início registrado desde o início da colonização das Américas. A borracha, derivada do látex da planta *H. brasiliensis*, nativa do Brasil era conhecida dos habitantes das Américas bem antes de Cristóvão Colombo. Os artefatos encontrados pelos visitantes do novo continente levam a crer, contudo, que o seu uso deve preceder a séculos. Os indígenas amazônicos faziam a

partir do látex (o sangue branco da floresta), extraído da árvore que chora objetos domésticos, como vasos, sapatos e bolas.

Um produto instável durante muito tempo a borracha permaneceu uma simples curiosidade. Sua redescoberta se deu com os estudos científicos realizados no Equador, entre 1736 e 1744 pelos naturalistas franceses Charles Marie de La Condamine e na Guiana por François Fresneau, ficando este com as honras de ter descrito a seringueira, *H. brasiliensis*, praticado a sangria e estudado o látex (UPADHYAY, 2011).

O gênero *Hevea* foi descrito em 1775 pelo também francês Fusée-Aublet, a partir de material vegetal obtido na Guiana Francesa. Em 1770, o cientista britânico Joseph Priestley, um famoso químico inglês, produziu a primeira borracha, que hoje é utilizada para apagar traços de lápis esfregando-a sobre os riscos no papel (daí o nome "rubber" de "rub" que significa esfregar).

Em 1772, cubos de borracha eram vendidos em Londres como apagadores. Então, em 1839, Charles Goodyear inventou a vulcanização, descobriu que as propriedades elásticas da borracha podiam tornar-se mais duradouras com enxofre e calor, transformando, assim, uma mera curiosidade em um produto essencial para a era industrial. (ARCHER, *et. al.*, 1983) (FREITAS, *et. al.*, 2006)

O látex natural ocorre no reino "Plantae" em mais de 12.000 espécies pertencentes a uns 900 gêneros. Destas plantas laticíferas, aproximadamente 1000 espécies contêm a borracha. A borracha natural comercial é derivada de somente uma planta cultivada a seringueira, mas que é cultivada hoje, principalmente, no sudeste da Ásia. O látex, seus constituintes principais (à exceção da água) são a borracha natural, o hidrocarboneto polímero *cis*-poliisopreno, e proteínas (MEKKRIENGKRAI *et. al.*, 2004).

Devido à grande utilização do látex da seringueira desde o início do século XIX grande parte da literatura disponível sobre o estudo de plantas que produzem látex refere-se quase que exclusivamente ao estudo da *H. brasiliensis*, portanto há um extenso percurso a seguir no estudo de outras plantas produtoras de látex e várias delas ocorrem no Nordeste brasileiro.

A utilização do látex da seringueira em diversos produtos consumidos pela maioria da população gerou um problema para uma classe específica de pessoas, a alergia. No trabalho e em casa, produtos manufaturados a partir do látex de *H. brasiliensis* são encontrados em diversos utensílios tais como luvas, brinquedos, bico de mamadeira, chupeta, balões de festa, preservativos etc. As razões de processos alérgicos podem incluir um aumento da frequência no uso das luvas produzidas de látex e mudanças no

processo de fabricação (SHOUP, 1998).

Na verdade a alergia aos diversos produtos derivados do látex não é causada pela borracha, mas sim por proteínas do látex. Investigações mais detalhadas da fração do látex sem a fração emborrachada levaram a identificação e caracterização de uma família de proteínas alergênicas (YEANG *et. al.* 2002). Entretanto, estes relevantes estudos tiveram unicamente como alvo, a planta *H. brasiliensis*, não havendo suficiente informação adicional sobre proteínas presentes no látex de outras tantas plantas laticíferas.

Considerando o látex de *C. procera*, suas aplicações potenciais parecem sobrepor fortemente suas limitações. A literatura tem crescido neste sentido e os resultados obtidos dos estudos de nossa equipe têm gerado conhecimentos que aumentam as expectativas aplicadas de proteínas deste látex em ações que envolvem desde modelos animais até modelos de proteção contra pragas agrícolas. Porém existem propriedades tóxicas de muito significado pra nós.

2.3.3- Caracterização Botânica da *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.

O Vegetal *Calotropis procera* (CP) pertence ao gênero *Calotropis* e à família “Asclepiadaceae” que é rica em plantas com propriedades medicinais. A origem do nome é derivada de “Asclépiós” – deus grego da medicina, do grego “kalos” = belo, “tropis” = barco e *procera* do latim “procerus” significa alto, esbelto. Entretanto a classificação de *C. procera* entre as “Apocynaceae” tem sido igualmente sugerida por alguns taxonomistas. É uma planta perene, arbusto ou sub-arbórea podendo chegar a 3 metros e meio de altura. Os seus ramos, folhas, pedúnculos e frutos são recobertos por serosidade, mais intensa nas partes mais jovens. A planta é provavelmente originária da Índia e África Equatorial. Tem sido levada para muitas regiões, como ornamental e tem se difundido para ao ambiente livre, em regiões quentes.

Consta que no Brasil foi introduzida como ornamental, em Recife, no início do século XIX. É encontrada com grande frequência no Nordeste brasileiro, mas também em outras regiões, principalmente no cerrado (KISSMANN & GROTH, 1992).

A *C. procera* possui vários nomes populares de acordo com a região: queimadeira (NE), algodão-de-seda (PE), flor-de-seda, ciúme (CE), paininha-de-seda (SP), leiteiro (SP, MG), (FREITAS, 2006).

Esta espécie vegetal foi incorporada no século XIX como útil ao uso terapêutico da

medicina ocidental homeopática. É rica em princípios ativos, especialmente do grupo dos cardenólídeos cardioativos, cuja principal molécula é a Calotropina (CHAVAN BHAGYASHRI, 2015; Seiber *et. al.*, 1982).

A planta e seu látex fazem parte do sistema de medicina popular da Índia e Paquistão, além de outros países asiáticos. O látex possui ainda esteróides, carbonatos orgânicos, além de enzimas envolvidas no metabolismo proteolítico (KHAN & MALIK, 1989; OLEA *et. al.*, 2002).

Entre as suas atividades medicinais mais conhecidas popularmente está o uso da casca como tônica e estimulante. O látex é relatado ser vermífugo, odontálgico, tônico e externamente é empregado para remover verrugas e manchas, possuindo também poderosa ação depilatória; as folhas cozidas são antirreumáticas e calmantes. Secas na forma de cigarros, as folhas aliviam a tosse e facilitam a respiração de pacientes asmáticos. As raízes são diaforéticas, aumentam a sudorese; eméticas, induzem o vômito; e colagogas, aumentam a produção de bile (CHAVAN BHAGYASHRI, 2015).

Além do uso medicinal, a *Calotropis procera* apresenta outras utilidades. As folhas maduras são forraginosas. O líber produz fibra de boa qualidade, entretanto seu mais valioso produto é a paina das sementes, aproveitada na confecção de tecidos, brinquedos, bolsas e enchimento de travesseiros, colchões (BRAGA, 1982).

Segundo (TORRES *et. al.*, 2013), o milho e a soja do concentrado podem ser substituídos parcialmente pelo feno de *C. procera*, em até 30% sem comprometer o desempenho e o consumo de nutrientes, isso em ovinos da raça Morada Nova. De forma que *C. procera* pode ser usada como coadjuvante na alimentação animal.

A.

B.



A: http://2.bp.blogspot.com/_LOsE8ltM2eE/R-G7XwRLmvl/AAAAAAAAAAmo/ROYIDle3S-0/s320/IMG_3864.jpg

B: <http://www.agrolink.com.br/agromidias/problemas/g/Calotropis%20procera4.jpg>

Figura 1: Fotografias da planta *Calotropis procera*.

2.3.4- Atividades biológicas da *Calotropis procera*: Potencial e Limitações.

Além de todas as atividades descritas anteriormente estabelecidas pelo uso popular da planta, muitos são os relatos sobre diferentes atividades e efeitos biológicos produzidos pela planta *C. procera*.

Quer sejam relatos de origem popular ou divulgados como resultados da pesquisa científica, tais descrições mostram que praticamente todas as partes da planta são capazes de promover atividades importantes sobre sistemas animais ou micro-organismos, desde as folhas e raízes até o próprio látex.

Embora alguns resultados sejam atribuídos a compostos orgânicos do metabolismo secundário produzidos pela planta. Assim, embora uma riqueza de atividades tenha sido observada em estudos exploratórios. Diversas observações advêm do conhecimento popular e também não foram cientificamente investigadas.

Recentemente, (KUMAR & ROY, 2009), registraram que a administração de proteínas do látex da *C. procera* melhora as limitações funcionais em ratos com monoartrite induzida por complexo adjuvante de "Freund". (CHOEDON *et. al.*, 2006) E descreveram propriedades anticancerígenas do látex de *C. procera* em um modelo de camundongos portadores de carcinoma hepatocelular. Em 2007, um grupo de pesquisa

concluiu um estudo sobre a atividade anticancerígena usando apenas frações proteicas do látex de *C. procera*. Demonstramos ainda que na fração proteica do látex há pelo menos uma proteína capaz de induzir citotoxicidade direcionada a células neoplásicas de carcinomas humanos, não afetando células normais (MAGALHÃES *et. al.*, 2013).

Em análises químicas dos extratos brutos de látex de *C. procera* têm sido identificados compostos como cardenolideos, enzimas proteolíticas, alcalóides e carboidratos (SEIBER *et. al.*, 1982), esteróides e triterpenos, carbonatos orgânicos (GALLEGOS-OLEA *et. al.*, 2002).

O látex íntegro de *C. procera* induz reação inflamatória concentração dependente quando utilizado em modelos de edema de pata e bolsa de ar subcutânea em ratos. Injeções subcutâneas de soluções aquosas de látex (0,1 ml de 1%) na superfície plantar da pata de ratos produz inflamação significativa. A resposta inflamatória é acompanhada por aumento da permeabilidade vascular (SINGH *et. al.*, 2000). Não era sabido se tais efeitos são oriundos de atividade proteica ou outra atividade qualquer. Entretanto, nenhuma caracterização de moléculas envolvidas nestes efeitos havia sido apresentada.

As investigações nesse sentido já produziam resultados. Já demonstramos claramente que a atividade anti-inflamatória do látex está presente em sua fração proteica (ALENCAR *et. al.*, 2004). Nesta mesma fração demonstramos que existe uma atividade nociceptiva associada (SOARES *et. al.*, 2005).

Em 2006, nosso grupo de pesquisa publicou um conjunto de resultados que mostrou claramente que no látex de *C. procera* coexistem atividades anti- e pró-inflamatória. Após o fracionamento do látex de acordo com parâmetros de solubilidade e massa molecular, duas frações foram obtidas, sendo uma delas àquela de proteínas já descrita e, por conseguinte detentora da atividade anti-inflamatória. Na fração complementar foi verificada a presença da atividade pró-inflamatória. Assim, pela primeira vez estas atividades foram separadas e demonstradas (ALENCAR *et. al.*, 2006).

Um elegante experimento apresentado no trabalho mostrou que a atividade anti-inflamatória era capaz de modular a ação pró-inflamatória da outra fração. Nestes termos, temos contribuído sobremaneira não apenas na determinação do potencial aplicativo do material, mas também na exclusão de suas moléculas envolvidas em atividades adversas e ou, tóxicas descritas na literatura. Duas ações antagônicas sendo moduladas pelo mesmo látex. Embora o efeito pró-inflamatório não seja necessariamente adverso, pois a inflamação é uma defesa imune do indivíduo, podendo ser adversa se for muito grande ou prolongada causando efeitos patológicos e até fatais. (ALENCAR *et. al.*, 2006).

Outros autores observaram que a fase aquosa do látex de *C. procera* apresenta atividade larvicida contra o terceiro e quarto “instar” da larva do mosquito *Anopheles lachanchial*, o principal vetor da malária no Marrocos, apresentando uma DL₅₀ de 28 ppm (Markouk *et. al.*, 2000). O extrato etanólico de diferentes partes de *Calotropis procera* apresenta atividade antimalárica *in vitro* com valores de concentração inibitória variando de 0,11 a 0,47 mg/ml contra *Plasmodium falciparum* (SHARMA & SHARMA, 1999; SHARMA & SHARMA, 2000). O extrato etanólico hemolisou eritrócitos humanos (SHARMA *et. al.*, 2001), cuja toxicidade sobre as membranas das células vermelhas auxilia no esclarecimento do possível mecanismo de ação entre a atividade antiplasmodial e o processo de hemólise em eritrócitos normais.

Um poderoso agente bacteriolítico capaz de romper a membrana plasmática de *Micrococcus lysodeikticus* está presente no látex de *C. procera*, sendo esta ação inibida por metais pesados (MURTI, 1961).

A atividade antimicrobiana tem sido observada em extratos etanólicos de raízes de *C. procera* contra as bactérias *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae* e também contra os fungos *Aspergillus flavus*, e *Fusarium moniliforme* e a levedura *Candida albicans*, embora o látex obtido de talos e folhas seja utilizado na medicina popular como um inibidor microbiano, nenhuma atividade antimicrobiana do látex foi observada, podendo ser investigado mais além (Freitas, 2006).

Em extratos *n*-butanol e acetato de etila das flores de *C. procera* foi vista atividade contra *C. albicans* e o extrato etanólico mostrou efeito letal sobre o molusco *Bulinus truncatus* (LARHSINI *et. al.*, 1997). O extrato etanólico das flores de *C. procera* mostrou significativa atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella typhi*, entretanto o extrato *n*-butanol das flores foi observado ser muito efetivo contra *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *S. typhi*. Este fato sugere que *n*-butanol seja um solvente mais eficiente para extração de agentes antibacterianos das flores e folhas de *C. procera* (LARHSINI *et. al.*, 2001).

Outra atividade larvicida do látex de *C. procera* foi observada contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*, principal transmissor da dengue, febre amarela, chikungunia e zica, podendo ser utilizado como método alternativo no controle destes mosquitos transmissores de doenças (RAMOS, *et. al.*, 2009).

O nosso grupo tem caracterizado a atividade larvicida de diferentes frações do látex sobre ovos e larvas de *Aedes aegypti*. Todas as três frações originárias do látex íntegro se mostraram extremamente tóxicas para as larvas do inseto, inibindo inclusive a

eclosão dos ovos e indivíduos nascidos, larvas de primeiro estágio (RAMOS *et. al.*, 2006).

Um esteróide, hidroxicetona procesterol, foi isolado das flores de *C. procera*, com fórmula molecular correspondendo a $C_{29}H_{48}O_2$ e massa molecular 4287010, confirmado por espectrometria de massas (KHAN & MALLIK, 1989). O extrato etanólico de raízes de *C. procera* quando administrado via oral em ratas possui significativa atividade estrogênica mostrada por efeitos uterotrópicos em ratas imaturas e pela habilidade de aumentar o peso do útero em fêmeas ovariectomizadas.

Outra ação observada é a de potencializar o efeito de etinilestradiol e também possui uma forte atividade anti-implantação a qual pode ser devido à atividade estrogênica, pois é conhecido que substâncias estrogênicas inibem a gravidez por supressão dos níveis tanto de hormônio folicular estimulante FSH como hormônio luteinizante LH os quais previnem a implantação (KAMATH & RANA, 2002).

A atividade antinoceptiva é outro relato encontrado na literatura que ocorre no látex de *C. procera*. Entretanto apenas uma descrição da atividade, não muito detalhada foi descrita (SOARES *et. al.*, 2005). O látex total de *C. procera* em ratos diminui as contrações abdominais induzidas por ácido acético. A inibição máxima das contrações foi observada com uma concentração oral de 415 mg/kg produzindo 69% de inibição quando comparado a 50% de inibição produzida por uma concentração oral padrão de aspirina de 100 mg/kg (DEWAN *et. al.*, 2000).

O látex de *C. procera* preparado em propilenoglicol e aplicado em danos induzidos na epiderme de porcos, capaz de reduzir em 20% o tamanho da área agredida, provavelmente por ato angiogênico e mitogênico (RASIK *et. al.*, 1999).

Encontra-se em desenvolvimento em nosso grupo, um estudo do potencial cicatrizante de vários fluidos laticíferos, a exemplo da *Plumeria rubra* (FREITAS *et. al.*, 2007) com envolvimento de prostaglandinas. Esta propriedade corrobora com o seu uso popular, sendo o látex coletado diretamente da planta e imediatamente aplicado sobre infecções fúngicas de pele. Não há, entretanto relatos científicos que confirmem ou rejeitem esta atividade. Ensaios *in vitro* com fungos de pele humana, realizados pelo nosso grupo não mostrou ação do látex sobre estes organismos. Entretanto, hoje entendemos que o látex não age sobre o fungo e sim no sistema imunológico, levando a uma resposta de defesa efetiva.

O extrato etanólico das flores de *C. procera* apresenta um forte efeito citotóxico contra células cancerígenas de cólon, linhagem 320 (SMITH *et. al.*, 1995). Extratos alcoólicos e de acetato de etila das folhas de *C. procera* mostraram atividades

antibacteriana e citotoxicidade para células F-L (ALI *et. al.*, 2001).

Há na literatura também relatos sobre efeitos do látex íntegro de *C. procera* quando administrado via oral. Estes estudos evidenciam com clareza o quanto investigações mais aprofundadas deveriam ser realizadas. O extrato etanólico do látex total de *C. procera* produz uma considerável redução da frequência e gravidade da diarreia induzida por óleo de rícino em ratos, sendo 80% dos animais protegidos (KUMAR *et. al.*, 2001; CHITME *et. al.*, 2004).

Posteriormente os mesmos autores mostraram que o látex de *C. procera* produz diminuição do fluxo intestinal diminuindo as contrações musculares (KUMAR & SHIVKAR, 2004). Esse mesmo grupo tem publicado diferentes artigos que evidenciam a capacidade dos extratos do látex em prevenir processos inflamatórios mesmo quando administrado por via oral a animais (KUMAR & ROY, 2009). Entretanto um estudo sobre esta atividade exclusiva a fração proteica ainda não foi realizado. Esta abordagem está em execução em nosso laboratório.

Próximo de anti-inflamatório. O extrato aquoso do látex de *C. procera* administrado por via oral em ratos antes da indução do edema de pata por carragenina foi capaz de inibir a formação do edema de pata em níveis significantes (MAJUMDER & KUMAR, 1997). O extrato aquoso de *C. procera* produz potente efeito antipirético quando comparado com o efeito máximo do ácido acetilsalicílico usado como droga antitérmica de referência (LARHSINI *et. al.*, 2002).

A fração clorofórmica do extrato de raízes de *C. procera* apresenta atividade gastroprotetora induzida por ácido acetilsalicílico, indometacina e estresse induzido, sugerindo que a atividade pode ser atribuída a inibição da via da 5-lipoxigenase (SEN *et. al.*, 1998). Todos ou quase todos estes estudos foram conduzidos a partir de preparações (extratos) de partes da planta, sendo a maioria preparada em solventes de origem orgânica, não contemplando uma efetiva extração de proteínas.

O conjunto de todos estes relatos evidencia o potencial farmacológico do látex de *C. procera*, mas também torna claro que muito há o que se fazer em estudos bioquímicos e identificação de moléculas envolvidas em tais atividades. Além de todos estes relatos novas publicações têm surgido rapidamente sobre atividades adicionais relacionadas ao látex de *C. procera*.

Uma das maiores limitações para o uso efetivo de moléculas oriundas de fluidos laticíferos como agentes biotecnológicos voltados à saúde está relacionada a possíveis aspectos toxicológicos. Considerando o látex da seringueira, como já descrito, há uma

família de proteínas envolvidas no desenvolvimento de alergias, o que poderia também ocorrer com proteínas do látex de *C. procera*.

Entretanto, um estudo realizado por nosso grupo, estabeleceu que a fração proteica de *C. procera* não foi capaz de induzir síntese de IgE, IgA e IgG/IgG₁ em protocolos de imunização oral desenvolvidos em animais experimentais (RAMOS *et. al.*, 2006) Um estudo mais detalhado e com proteínas, de fato, ativas deverá ser efetivado posteriormente para caracterizar este resultado.

Em cabras, a ingestão do látex bruto e íntegro de *C. procera* levou os animais à morte em até vinte minutos após o consumo da amostra (EL BADWI *et. al.*, 1998). Em concentrações sub-letais os animais apresentavam tremores, diarreia, hemorragias, e diurese além de outros parâmetros toxicológicos que expressavam profundo sofrimento. Entretanto, ensaios desenvolvidos em nosso laboratório têm esclarecido que efeitos tóxicos do látex podem facilmente ser eliminados a partir de seu fracionamento.

Os autores (AHMED, *et. al.*, 2004), observaram que do pré-tratamento com extrato etanólico de látex de *C. procera* reduziu significativamente os níveis elevados de marcadores enzimáticos em homogeneizados de soro e do coração em ratos com infarto do miocárdio induzidos por isoproterenol. A observação histopatológica revelou uma proteção marcada pelo extrato de dano necrótico do miocárdio.

Como observado, proteínas laticíferas de *C. procera* agregam atividades farmacológicas e não exibem aspectos toxicológicos dentro dos parâmetros até o momento abordados. Este material biológico passa então a figurar nesse estudo como uma fonte de proteínas bioativas, promissoras para o desenvolvimento biotecnológico na área das doenças cardiovasculares.

3. MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1. Obtenção da fração proteica do látex

A fração proteica foi obtida a partir do látex de *C. procera* (figura 2), coletado de plantas na região metropolitana de Fortaleza, no Ceará e no horto de plantas medicinais da Universidade Federal do Ceará. A autenticidade da espécie foi conferida pelo prof. Edson Paula Nunes, Taxonomista Vegetal do Herbário Prisco Bezerra da UFC.

A obtenção da fração proteica do látex de *C. procera* (PL) foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais do Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob a supervisão do Prof. Dr. Márcio Viana Ramos. A fração foi obtida através de cromatografias de princípios de afinidade e troca iônica. O perfil proteico da mesma foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida como descrito por (ALENCAR *et. al.*, 2004, ALENCAR *et. al.*, 2006), sendo as amostras estocadas na forma desidratada. Quando necessárias soluções recém-preparadas foram utilizadas nos ensaios. Ver **Figura 3**, na próxima página.



A

B

Fonte A: (https://www.flickr.com/photos/desert_ways/4518692452/in/photostream/)..

Fonte B: (<http://a398.idata.over-blog.com/600x450/2/61/75/91/senegal/Calotropis-procera-latex-O-Gonnet.jpg>)..

Figura 2: Látex de *Calotropis procera* (após dano tecidual no caule e na folha).

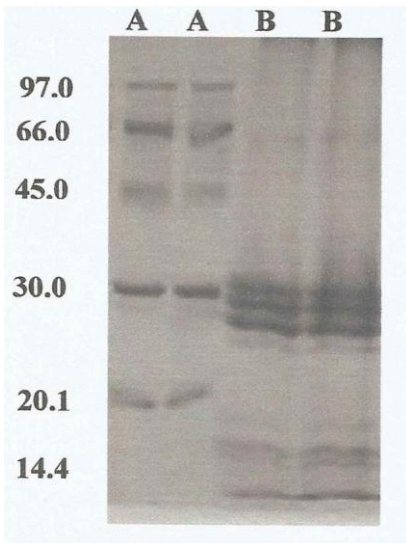


Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) da fração proteínas do látex de *Calotropis procera*. (A) Marcadores de massa molecular: Fosforilase B (97,0 KDa), Albumina Sérica Bovina (66,0 KDa), Ovalbumina (45,0 KDa), Anidrase Carbônica (30,0 KDa), Inibidor de Tripsina (20,1 KDa), Alfa-Lactalbumina (14,4 KDa). (B) Proteínas do látex de *C. procera* (30 µg).

Fonte: (Freitas, 2006). Página 61.

3.2. Animais.

Ratos *Wistar* machos, adultos, pesando entre 250 e 300 g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (Biocen - UFC), foram utilizados. Os animais foram mantidos no Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e receberam ração e água, *ad libitum*, em condições de luz e temperatura adequadas. Todos os procedimentos de manipulação dos animais foram realizados de acordo com normas institucionais designadas pela Comissão de Ética em Pesquisas com Animais da UFC (CEPA nº 67/2012).

Neste estudo foram seguidas as normas de boas práticas preconizadas para a realização de pesquisas que envolvem o uso de animais experimentais, pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.3. Linhagens celulares.

As linhagens celulares utilizadas foram células renais epiteliais tubulares caninas (células MDCK – *Madin Darby Canine Kidney*) obtidas do Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), e mantidas no Laboratório de Cultivo de Células/FFOE/UFC, este último sob a coordenação da Prof^a Dr^a Alice Maria

Costa Martins.

As células MDCK foram cultivadas em frascos plásticos, com meio RPMI-1640, suplementado com 10% soro bovino fetal (SBF), 1% de penicilina e estreptomicina. As células foram mantidas em estufa a 37 °C aeradas com 5% de CO₂, seguindo-se da observação de crescimento celular com auxílio de microscópio de inversão 400X (Olympus® CKX 41) a cada 24 horas.

3.4. Modelos Experimentais.

3.4.1. Avaliação no Sistema Cardiovascular.

3.4.1.1 .Modelo experimental para aferição da pressão arterial média.

Neste ensaio teste as alterações vasculares e pressóricas induzidas por várias concentrações da fração proteica de *Calotropis procera* (LP) foram comparadas com o grupo controle (Salina). LP nas concentrações de 1, 3, 10, 30, 100 e 300 µg/ml e salina foram injetadas lentamente pela veia jugular dos animais. A escolha das concentrações foi baseada em uma curva logarítmica conforme a literatura, para outros experimentos. Considerou-se o estudo anterior de toxicidade *in vivo* e *in vitro* (Magalhães *et. al.*, 2013) e para definição das concentrações administradas.

Inicialmente os animais, ratos normotensos, foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg) e submetidos à cirurgia onde se secciona a linha mediana da região cervical. Após isolamento das glândulas parótidas direita e esquerda, aprofundou-se a incisão até a traqueia. A traqueia foi isolada e uma curta cânula de polietileno (PE120) foi inserida nos animais por meio de traqueostomia, permitindo um fluxo respiratório espontâneo e a fácil aspiração de eventuais secreções brônquicas. Em seguida, identificou-se o feixe vascular-nervoso, do qual foi isolada a artéria carótida esquerda evitando-se a lesão do nervo vago. Procedeu-se então a canulação desta artéria para registro da pressão arterial média. Igual manobra foi realizada com vistas à canulação da veia jugular externa com o propósito de injetar as concentrações de LP, aminoguanidina 10⁻⁴ M e Acetilcolina 10⁻⁵ M e fenilefrina 10⁻⁶ M (NASCIMENTO *et. al.*, 2006, XAVIER-ELSAS *et. al.*, 2015, GENTILE *et. al.*, 2008). Ver **Figura 3**.

Antes do início das experiências procedeu-se à calibração do instrumento utilizado como padrão um manômetro de mercúrio numa escala de 50 a 250 mm Hg. Os registros das experiências foram realizados com um transdutor de pressão piezo-elétrico

(Braille BXSJ) acoplado ao sistema de amplificação de sinal com interface USB (DATAQ DI-148U) utilizando o programa de aquisição de dados *WinDaq/Life*.

Os parâmetros Pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e pressão sistólica (PS) foram diretamente calculados pelo programa computadorizado. Tais parâmetros foram registrados por períodos de 5 a 10 minutos, de acordo com a duração dos efeitos. A pressão arterial média foi calculada segundo a equação: $PAM = PD + (PS - PD) / 3$.

Protocolo experimental para medição da Pressão Arterial Média (PAM).

- Ratos Wistar (250-300 g)
- Anestesia: Pentobarbital (50 mg/Kg; i.p.)
- Canulação: Vasos Jugular e carótida oposta
- Parâmetros: Pressão arterial média, frequência cardíaca, pressão diastólica, pressão sistólica, frequência respiratória.
- Registro com transdutor de pressão
- “Software” WinDaq/Lite®.

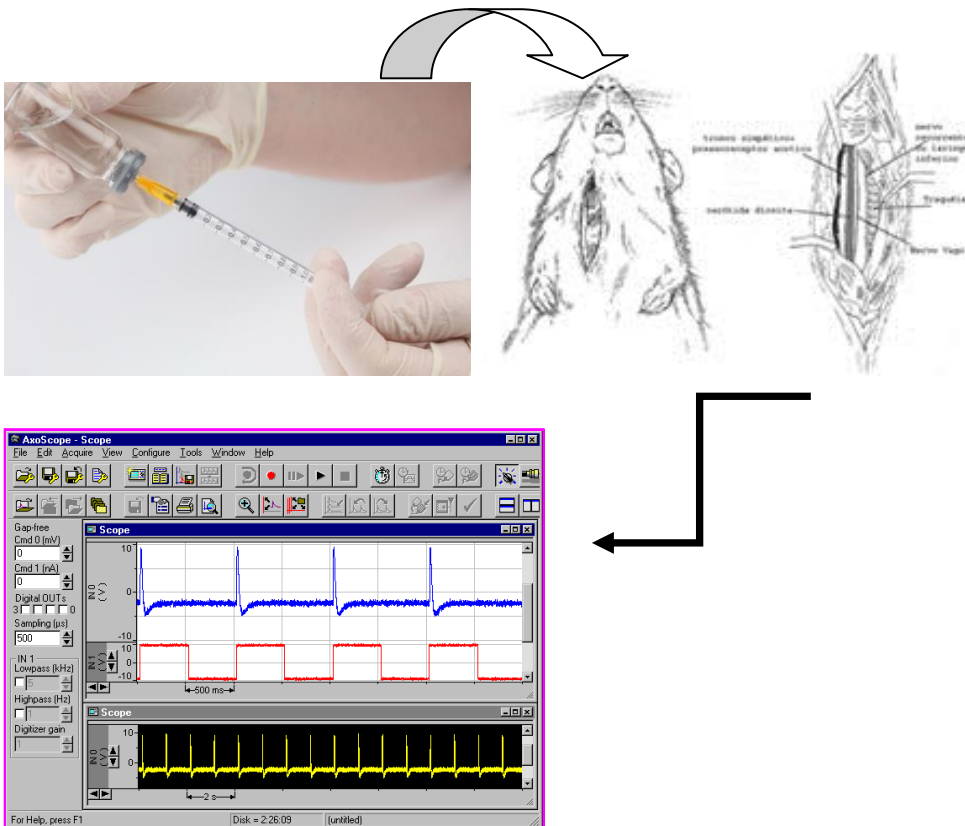


Figura 4: Colocação do cateter utilizado para administração da fração do látex LP, e registro da pressão arterial média no programa computadorizado *WinDaq/Lite®*.

3.4.1.2. Modelo para avaliação da contratilidade em músculo liso (vasos de resistência, *ex-vivo*).

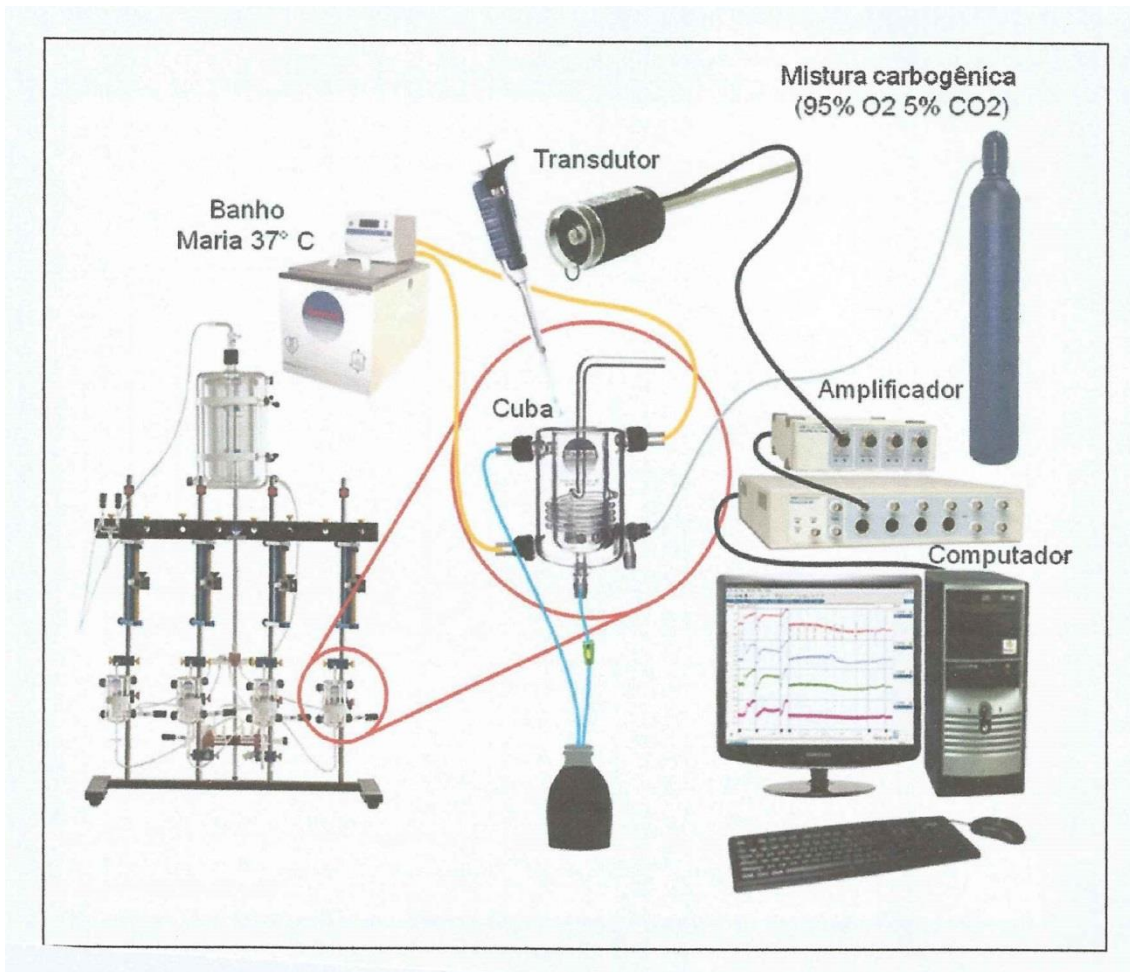
A artéria mesentérica (1^o ramo) de ratos *Wistar* machos foi isolada e utilizada com o objetivo de investigar se as proteínas do látex de *Calotropis procera* (LP) apresentavam atividade direta e aguda nos vasos, isto é, vasodilatação ou vasoconstrição. Independente de outra possível interferência fisiológica do animal como um todo (Ribeiro-Filho *et. al.*, 2012).

No início pensamos em usar a fração LP em leito mesentérico, mas o anel de artéria mesentérica, que é um vaso de resistência, é próximo aos rins, tem um resultado isolado sem interferência de outros sistemas, já o leito mesentérico por sua vez é muito maior e mais complexo embora seja também formado por vasos de resistência.

Após os animais anestesiados foi feita laparotomia então exposto o intestino delgado do rato e retirado cuidadosamente o leito mesentérico e foram cortados transversalmente segmentos cilíndricos em forma de anel da artéria mesentérica do primeiro ramo e ligados a peças triangulares com fio de aço mantidos em solução fisiológica aerada (imersos em cuba para órgão isolado de 5 ml contendo solução e Krebs a 37°C, continuamente aerada com mistura carbogênica, 95% de O₂ e 5% de Co₂, pH = 7,4).

Dois fios de tungstênio (40 μm) foram passadas através da luz do anel do ramo mesentérico. Um dos fios foi fixado a um micrômetro para ajustes e comprimento e o outro a um transdutor de força para medição da força isométrica (mN). Anéis de artéria mesentérica com ou sem endotélio preservado foram montados em Miógrafo de agulha 610M-DMT (DMT, do inglês *Download Wire Miograph System*, Ahaus, Dinamarca) mantidos sob tensão basal de 0,5 g sendo a tensão gravada usando-se transdutor de força isométrico (ML870B60/C-V, AD Instruments, Austrália) conectado a sistema de aquisição PowerLab™ 8/30 AD Instruments, Austrália) como esquematizado na **Figura 4**.

Segmentos de tecido com endotélio intacto imersos em banho com solução fisiológica de Krebs foram equilibrados por 90 minutos. A integridade do endotélio foi confirmada pela presença de uma resposta relaxante para acetilcolina (1 μM) na contração induzida por K⁺. A eutanásia por exsanguinação foi feita ainda com os animais anestesiados logo após a retirada do leito mesentérico (RIBEIRO-FILHO *et. al.*, 2012).



- **FIGURA 5**– Representação gráfica do sistema utilizado nos experimentos de contratilidade *ex-vivo* em ramo de artéria mesentérica de rato (n=4).

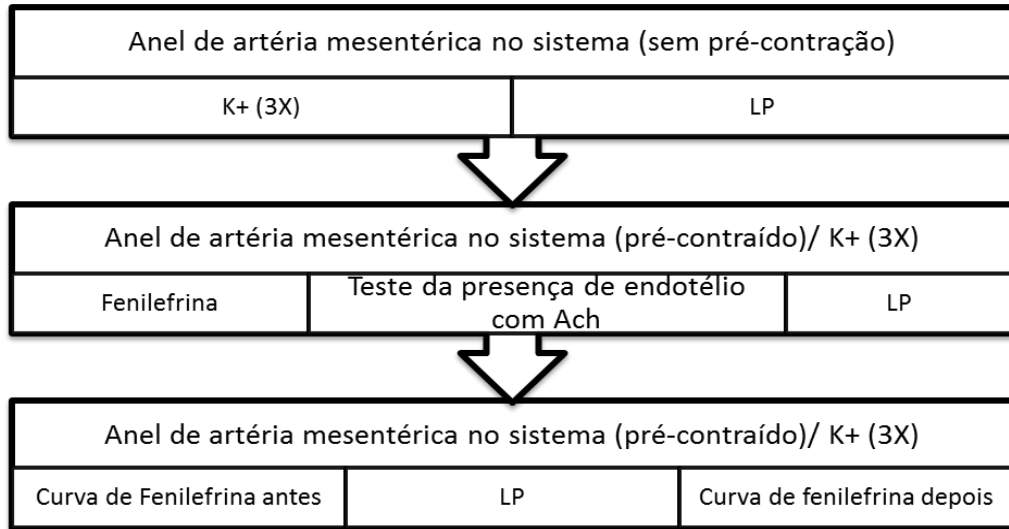
Fonte: LAFARMULI (Brito, 2012)

Em todos os experimentos os segmentos de tecido foram expostos a K⁺ na concentração de 60 mM;

As observações foram feitas a cada 5 minutos após a infusão de ACH10⁻⁵M e fenilefrina10⁻⁶M ou da LP em diferentes concentrações (0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10,0; 30,0; 100,0; 300,0 e 600,0 µg/ml).

Desenho experimental:

- Anel do 1º ramo de artéria mesentérica sem pré-contração.
- Anel do 1º ramo de artéria mesentérica pré-contraído: Exposição por 5 e 20 minutos com e sem endotélio.



Continuação da **Figura 5**.

3.4.2. Avaliação de Efeitos Renais.

3.4.2.1. Grupos Experimentais.

Grupo controle: Os rins dos animais deste grupo foram perfundidos apenas com solução de *Krebs-Henseleit* modificada, contendo 6 g% de albumina bovina (n = 6).

Grupos desafiados: os grupos foram subdivididos em três, de acordo com a concentração da fração proteica do látex de *C. procera* (LP) adicionada ao sistema de perfusão. Nestes grupos, os rins foram perfundidos com solução de *Krebs-Henseleit* modificada, sendo adicionada a esta, as concentrações de LP aos 30 min de perfusão (n = 4/concentração).

Fração proteica de *C. procera* administrada em três diferentes concentrações:

Grupo A: LP (10 µg/ml).

Grupo B: LP (30 µg/ml).

Grupo C: LP (100 µg/ml).

3.4.2.2. Sistema de perfusão renal.

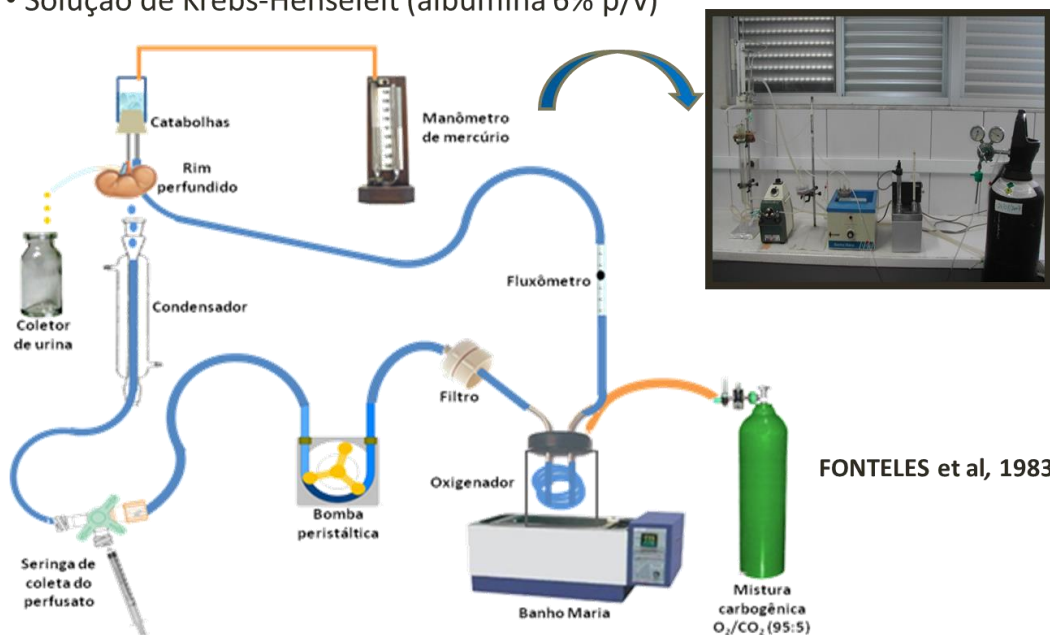
Existem atualmente dois sistemas de perfusão de rim isolado. O sistema aberto, no qual o perfusato não recircula através do rim possuindo como principal vantagem, a manutenção constante de parâmetros funcionais, porém apresenta um alto gasto de albumina. No outro tipo conhecido como sistema fechado, o perfusato recircula no rim e apresenta inúmeras vantagens sobre o primeiro, como a utilização de albumina e

outras substâncias na solução perfusora em pequenas quantidades. Além disso, as substâncias dialisadas se mantêm constantes na solução e a oxigenação pode ser adaptada ao próprio dialisador (MONTEIRO, 1990).

O sistema fechado, utilizado em nossos experimentos (figura 4), foi inicialmente baseado nos estudos desenvolvidos por (BOWMAN & MAACK, 1974, ROSS, 1978), com modificações feitas por (FONTELES, 1980), através da adaptação de um pulmão artificial do tipo silástico, baseado no modelo de (HAMILTON, 1974), e descrito por (MOREIRA LIMA, 1983). O nosso sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (FONTELES & MOREIRA LIMA, 1982; MONTEIRO, 1990) no qual o perfusato recircula no rim com uma quantidade de 100 ml de solução de *Krebs-Henseleit* modificada, com dois subsistemas, um *in situ* e outro com circuito fechado, para perfusão *in vitro* mantidos ambos a uma temperatura de 37°C.

SISTEMA DE PERFUSÃO RENAL

- Solução de Krebs-Henseleit (albumina 6% p/v)



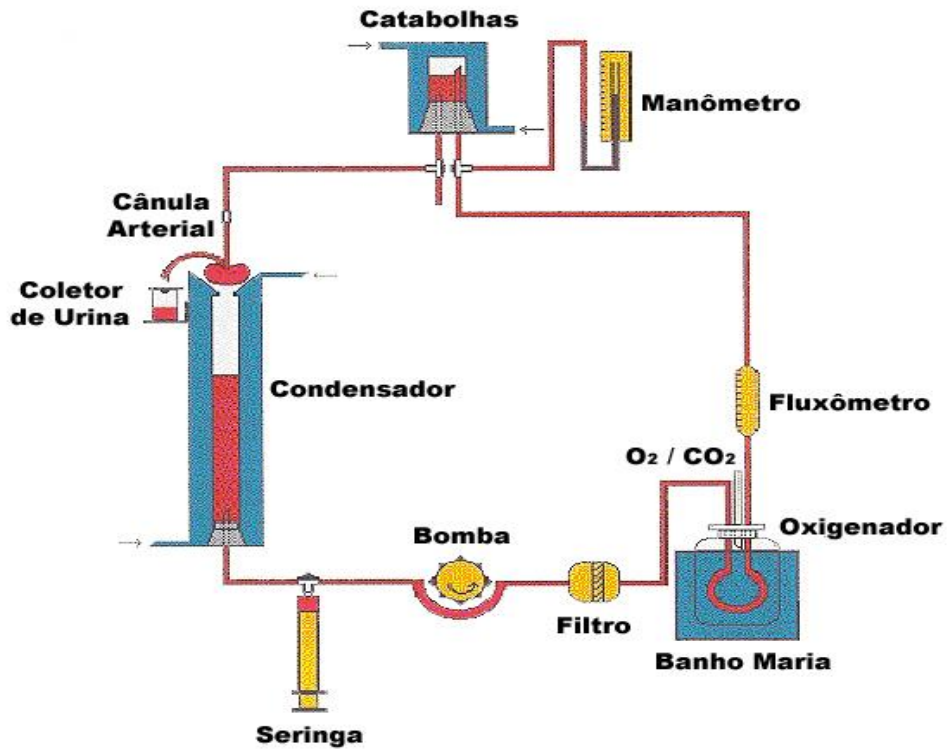
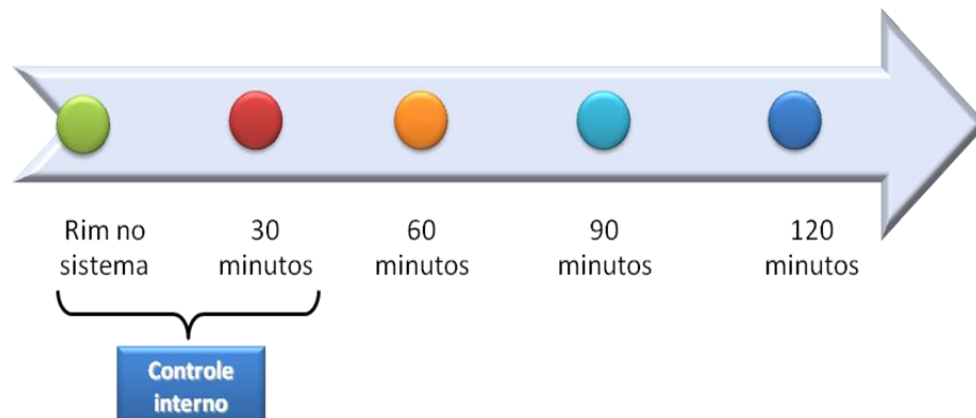


FIGURA 06 - Representação esquemática do sistema de perfusão de rim isolado (*ex-vivo*)
 n = 4 por experimento: Fonte: LFAVET – UFC



- Coleta de urina ou perfusato: 10 em 10min (determinações)
- Medida de pressão de perfusão e de fluxo urinário de 5 em 5 min
- Adição (30 min): Frações e sub-frações (látex de *Calotropis procera*)
- Tempo do experimento: 120 minutos
- Coleta de urina ou perfusato: 10 em 10 min (determinações bioquímicas)
- Medida de pressão de perfusão e de fluxo urinário de 5 em 5 min

3.4.2.3. Técnica Cirúrgica da perfusão renal *ex-vivo*.

Após a verificação da massa corpórea em gramas, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com pentobarbital sódico na concentração de 50 mg/Kg de peso corporal. Em seguida os animais foram transportados para a uma mesa cirúrgica, a veia femoral esquerda será isolada e 3 ml de manitol a 20% serão administrados com intuito de melhorar o acesso cirúrgico ao ureter. Após assepsia da parede abdominal, é feita uma incisão com base na linha alba e duas incisões perpendiculares à primeira, para aumentar o campo cirúrgico. Com isso a cavidade abdominal fica exposta e as vísceras abdominais afastadas para o lado esquerdo para visualização do rim direito e efetuado a limpeza do excesso de tecido gorduroso presente na área.

Após este procedimento, com uma lupa (aumento de 7 vezes), o ureter direito foi identificado, isolado e dissecado do tecido conjuntivo e do tecido adiposo que o envolve, sendo em seguida canulado através de tubo de polietileno (PE50) para a coleta de urina.

Com o intuito de evitar interferência fisiológica da glândula adrenal direita no experimento, esta foi identificada, isolada e seccionada, para isso providenciou-se anteriormente a descapsulação do rim. A artéria mesentérica superior e a artéria renal foram identificadas e dissecadas. Em seguida, a artéria mesentérica superior foi ocluída em seu lado direito e pinçada no seu lado esquerdo. Com pequeno corte em seu tecido introduziu-se a cânula por 3 a 5 mm e daí fixando-a na artéria.

Depois de cumpridos estes procedimentos, a artéria renal foi canulada a partir da artéria mesentérica superior. Uma parte da solução já oxigenada (40 ml) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim ainda *in vivo*, evitando qualquer isquemia ao órgão. Logo a seguir, o órgão foi isolado com pinças e seccionado, promovendo a retirada do rim e ureter, devidamente liberados. Com o rim já acoplado ao sistema, esperou-se um período de aproximadamente 30 minutos para sua adaptação ao sistema *in vitro*, sem interrupção do fluxo.

3.4.2.4. Protocolo Experimental.

Após o rim ter sido colocado no sistema, os 20 minutos iniciais foram considerados de estabilização e adaptação às novas condições. Após esse período,

marcou-se o tempo zero e determinou-se 30 minutos de controle interno. O tempo total de perfusão do órgão foi de 120 minutos. Durante esse período, sendo as medidas registradas a cada 5 minutos do fluxômetro e da pressão do perfusato. Em intervalos de 10 minutos, de maneira intercalada e sequenciada, foram coletadas a urina e o perfusato. Estes frascos com urina foram pesados e, juntamente com os de perfusato, mantidos em temperatura de -20°C para permitir posteriores dosagens de potássio, sódio, cloro, inulina e osmolaridade, importantes na determinação dos parâmetros de função renal. Sempre aos 30 minutos, foram adicionados (LP) em suas diferentes concentrações (10 30 e 100 µg/ml).

Com o rim direito montado no sistema, o rim esquerdo foi coletado para controle, o qual foi pesado e dele retirado um fragmento para posterior exame histopatológico. Após o fim do experimento, foi realizado o mesmo procedimento com o rim direito.

Foram avaliados parâmetros vasculares renais, e de transporte tubular renal de íons, água e de osmolaridade, além do fluxo urinário: Ver **3.4.2.8. Cálculo dos Parâmetros Renais.**

Relembrando:

- Tempo do experimento: 120 minutos
- Coleta de urina ou perfusato: 10 em 10 min (determinações bioquímicas)
- Medida de pressão de perfusão e de fluxo urinário de 5 em 5 minutos.

3.4.2.5. Avaliação bioquímica (perfusão renal).

Amostras de urina e perfusato foram coletadas em intervalos de 10 minutos, de forma intercalada, conforme o protocolo experimental anteriormente descrito. Foram feitas dosagens de sódio e potássio e cloreto pelo analisador de Bioquímica da Roche® eletrodo íon. As dosagens de cloro serão realizadas seguindo o método descrito pelo kit do fabricante Labtest®. A inulina foi dosada a partir do mesmo material, através de hidrólise direta descrita por (FONTELES & LEIBACH, 1982), com modificações que reduziram as quantidades de amostras e reagentes utilizados. A osmolaridade das amostras foi medida com um osmômetro (Vapor pressure osmometer - modelo 5100c ESCOR®).

3.4.2.6. Análise histopatológica.

As lâminas usadas em nosso estudo histológico foram confeccionadas no Laboratório de Anatomia Patológica – Biopse e no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, e avaliadas por um patologista das lâminas histológicas de rim, por leitura aonde o patologista não tinha conhecimento prévio das lâminas controle e das desafiadas com LP.

Após cada experimento, foi retirado um fragmento longitudinal do rim perfundido (direito) e do rim controle não perfundido (esquerdo), os quais foram acondicionados em frascos com formol 10%. Para proceder a análise histológica, estes fragmentos foram desidratados, diafanizados e em seguida cortados, numa espessura de 5 µm. Procedeu-se a coloração do material por hematoxilina-eosina (HE) e essas lâminas lidas para saber o grau de toxicidade renal nos rins perfundidos com LP em HE e as lâminas foram analisadas por microscópio óptico CKX41®/E330 OLYMPUS® (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). Então foram aplicados escores semi-quantitativos para possíveis lesões visualizadas nas lâminas. Temos como perspectiva o intuito aprofundar outros métodos histológicos, principalmente colorações diferentes para confirmar os dados encontrados.

Também foi realizado o estudo histopatológico dos rins não perfundidos apenas retirados do animal antes da perfusão, no caso o rim oposto ao perfundido. O rim direito o perfundido e o esquerdo, o controle.

3.4.2.7. Escore de lesão renal.

A severidade das alterações histopatológicas na lesão do tecido renal foi avaliada em túbulos renais, interstício, vasos sanguíneos renais e glomérulos em 20 campos por lâmina (n = 4 por grupo). Os escores foram adaptados de (JIA *et. al.*, 2013) e (ZHOU *et. al.*, 2011) e (REIHARD *et. al.*, 1991) foram registrados da seguinte forma: 0 = sem lesões; 1 = 10 a 25% considerada discreta; 2 = 25 a 50% considerada moderada; 3 = maior que 50% da área visualizada considerada severa.

TABELA 2 Cálculo dos parâmetros renais.

As fórmulas abaixo foram utilizadas na determinação de parâmetros funcionais renais (MARTINEZ-MALDONADO *et. al.*, 1978; FONTELES, 1980).

<ul style="list-style-type: none"> • FU (ml. g⁻¹. min⁻¹) = Fluxo Urinário.
FU = Peso do volume urinário/ Peso do rim esquerdo x 10.
<ul style="list-style-type: none"> • PP (mm Hg) = Pressão de perfusão.
* Obtida diretamente através da análise em manômetro de mercúrio.
<ul style="list-style-type: none"> • FPR (ml. g⁻¹. min⁻¹) = Fluxo de perfusão renal.
* Fluxo registrado a cada 10min/ intervalo de tempo x Peso do rim.
<ul style="list-style-type: none"> • RVR (mm Hg/ml.g⁻¹. min⁻¹) = Resistência vascular renal.
RVR = PP (mm Hg) / FPR.
<ul style="list-style-type: none"> • RFG (ml. g⁻¹. min⁻¹) = Ritmo de filtração glomerular.
RFG =DOU in/ DOP in x FU.
* onde DOU in = densidade óptica da inulina na urina e DOP in = densidade óptica da inulina no perfusato.

Fonte: LFAVET.

Tabela 3 - Parâmetros de transporte tubular renal:

<ul style="list-style-type: none"> $FNa^+ = (\mu Eq.g^{-1} \cdot min^{-1}) = \text{Sódio filtrado.}$
$FNa^+ = RFG \times PNa^+$ * onde PNa^+ = Concentração de sódio no perfusato.
<ul style="list-style-type: none"> $ENa^+ = (\mu Eq.g^{-1} \cdot min^{-1}) = \text{Sódio excretado.}$
$ENa^+ = FU \times UNa^+$ * onde UNa^+ = Concentração de sódio na urina.
<ul style="list-style-type: none"> $TNa^+ = (\mu Eq.g^{-1} \cdot min^{-1}) = \text{Sódio transportado.}$
$TNa^+ = FNa^+ - ENa^+.$
<ul style="list-style-type: none"> $\%TNa^+ = \text{Percentual de sódio transportado.}$
$\%TNa^+ = TNa^+ \times 100 / FNa^+.$
<ul style="list-style-type: none"> $\%pTNa^+ = \text{Percentual de transporte proximal de sódio.}$
$\%pTNa^+ = pTNa^+ \times 100 / FNa^+.$
<ul style="list-style-type: none"> $FK^+ = (\mu Eq.g^{-1} \cdot min^{-1}) = \text{Potássio filtrado.}$
$FK^+ = RFG \times PK^+$ * onde PK^+ = Concentração de potássio no perfusato.
<ul style="list-style-type: none"> $EK^+ = (\mu Eq.g^{-1} \cdot min^{-1}) = \text{Potássio excretado.}$
$EK^+ = FU \times UK^+$ * onde UK^+ = Concentração de potássio na urina.
<ul style="list-style-type: none"> $TK^+ = (\mu Eq.g^{-1} \cdot min^{-1}) = \text{Potássio transportado.}$
$TK^+ = FK^+ - EK^+.$
<ul style="list-style-type: none"> $\%TK^+ = \text{Percentual de potássio transportado.}$
$\%TK^+ = TK^+ \times 100 / FK^+.$
<ul style="list-style-type: none"> $\%pTK^+ = \text{Percentual de transporte proximal de potássio.}$
$\%pTK^+ = pTK^+ \times 100 / FK^+.$
<ul style="list-style-type: none"> $FCl^- = (\mu Eq.g^{-1} \cdot min^{-1}) = \text{Cloreto filtrado.}$
$FCl^- = RFG \times PCl^-$ * onde PCl^- = Concentração de cloreto no perfusato.
<ul style="list-style-type: none"> $ECl^- = (\mu Eq.g^{-1} \cdot min^{-1}) = \text{Cloreto excretado.}$
$ECl^- = FU \times UCl^-$ * onde UCl^- = Concentração de cloreto na urina.
<ul style="list-style-type: none"> $TCl^- = (\mu Eq.g^{-1} \cdot min^{-1}) = \text{Cloreto transportado.}$
$TCl^- = FCl^- - ECl^-.$
<ul style="list-style-type: none"> $\%TCl^- = \text{Percentual de cloreto transportado.}$
$\%TCl^- = TCl^- \times 100 / FCl^-.$
<ul style="list-style-type: none"> $\%pTCl^- = \text{Percentual de transporte proximal de cloreto.}$
$\%pTCl^- = pTCl^- \times 100 / FCl^-.$
<ul style="list-style-type: none"> $Cosm (ml.g^{-1} \cdot min^{-1}) = \text{Clearance osmótico.}$
$Cosm = (Uosm / Posm) \times FU$
* onde $Uosm$ = Osmolaridade Urinária e $Posm$ = Osmolaridade do perfusato.

Fonte: LAFAVET.

3.4.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE RENAL *in vitro*.

3.4.3.1. Cultivo e tratamento das células MDCK.

As células foram cultivadas em garrafas de plástico (75m², volume de 250 ml), em meio RPMI 1640 (contém insulina, hormônio de crescimento, hormônio tireoidiano, transferrina, prostaglandinas e L-glutamina) acrescido de penicilina (100 U/ml) estreptomicina (100 µg/ml) e 10% v/v de Soro Bovino Fetal (SBF). As células foram incubadas a 37°C, em atmosfera com 95% de umidade e 5% de CO₂, sendo observado o crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão. Antes de cada experimento, as células foram armazenadas em meio sem SBF por 24 horas para a obtenção de células na fase G₀ do ciclo celular (FRESHNEY, 2010) e (BUTLER & DAWSON, 1992).

Para cada experimento, foi removido o meio da cultura e as células foram incubadas com tripsina-EDTA (Ácido etileno diamino treta acético) (0,25/0,02% v/v) a 37°C por aproximadamente 5 minutos. A tripsina foi inativada adicionando o mesmo volume de meio com SBF a 10%. A suspensão foi então centrifugada a 200g por 5 minutos (MARTINS *et. al.*, 2005; CHAIM, 2005). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio de cultura. As células foram então quantificadas em câmara de “Neubauer” e plaqueadas (1x10⁵ céls/ml/poço) permitindo o crescimento confluyente por 24 horas.

As células foram então avaliadas na presença de diferentes concentrações de LP, solubilizados em tampão fosfato (PBS) estéril, pH 7,4. Durante o experimento, as placas foram avaliadas qualitativamente com 24 horas de cultivo, usando o microscópio invertido. Após esse período, também foram realizados ensaios de viabilidade.

O controle negativo correspondeu a 100% de sobrevivência das células MDCK tratadas apenas com o veículo de diluição da substância teste (PBS), e a viabilidade celular foi determinada por comparação entre os percentuais médios das células vivas neste grupo e nos demais tratados com a LP de *Calotropis procera*.

3.4.3.2. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.

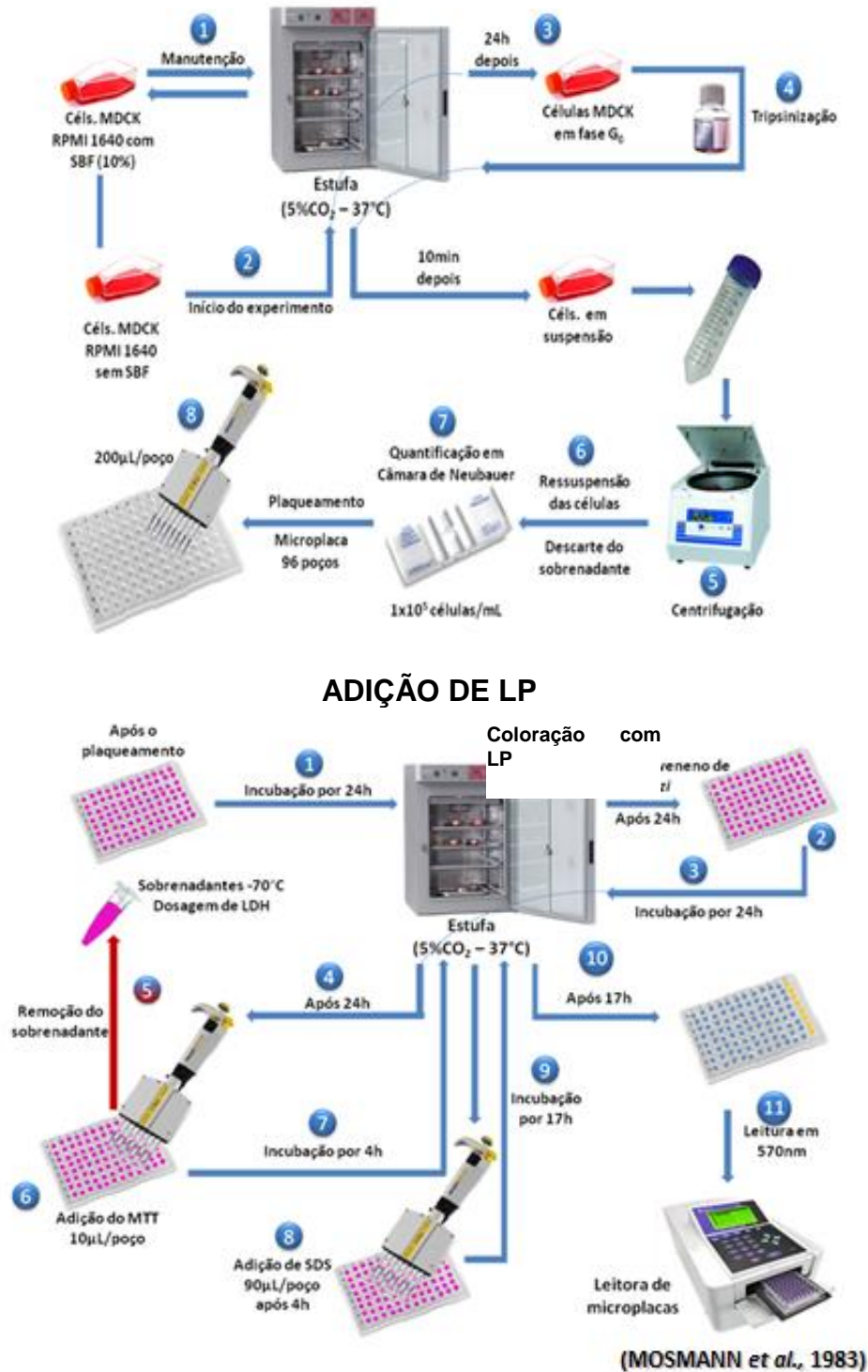
3.4.3.2.1. Ensaio com MTT.

As células MDCK foram plaqueadas em placas de 96 poços em uma densidade de $1,0 \times 10^5$ células/ml e, após 24h de cultivo, tratadas com diferentes concentrações de LP por 24 horas. Após o período de incubação, foram retirados 100 µl do sobrenadante e então adicionados 10 µL de 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico (MTT) (Sigma) 2,5 mg/ml dissolvidos em PBS estéril.

Este método baseia-se na atividade metabólica de células viáveis que são capazes de reduzir o MTT e formar um produto colorido insolúvel em água, o sal formazan. Após incubação por 4 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂, o sobrenadante foi removido e então adicionado 90µL de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS) em HCL 0,01 N para solubilizar os cristais de formazan formados. As placas então foram incubadas por 17 horas e em seguida, realizada a leitura em espectrofotômetro a 570 nm (MOSMANN, 1983) adaptado por (HANSEN *et. al.*, 1989). Os ensaios foram realizados em triplicata. A viabilidade celular foi determinada por comparação entre os percentuais de viabilidade celular dos grupos teste e do grupo controle.

Além disso, a partir dos resultados obtidos, foram calculados os valores de CI₅₀, que é definida como a concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células em estudo. Esse valor foi determinado utilizando o teste de regressão não linear.

Figura 07: Esquema simplificado das etapas do cultivo e tratamento das células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*).



3.4.3.4. Citometria de fluxo.

A técnica de citometria de fluxo nos permitiu avaliar o comportamento celular em diferentes aspectos, incluindo morte celular. A avaliação da integridade da membrana é um dos ensaios mais comuns, a qual utiliza marcadores de fluorescência que permeiam a membrana de células que estão em processo de morte, como o 7-AAD (aminoactinomicina D) que se liga a ácidos nucleicos.

Uma característica já bem estabelecida, do processo de morte celular por apoptose, é a externalização de fosfatidilserina na membrana plasmática. Sendo a anexina V um ligante específico desta molécula, tornando-se útil para ensaios de avaliação da morte celular por apoptose.

Quando utilizada conjuntamente a compostos que avaliam a integridade da membrana, nos permite discriminar a proporção entre células vivas e mortas, avaliando a integridade da membrana (células marcadas somente com 7-AAD, 7-AAD+AX-, células nos estágios iniciais da apoptose marcadas somente com anexina V, 7-AAD-AX+ e células nas etapas finais da apoptose ou em necrose, células duplamente marcadas, 7-AAD+AX+).

No início da apoptose, a membrana ainda está intacta, mas sofre desorganização. A anexina V tem alta afinidade pelo OS na presença de íon Ca^{++} conjuga com FITC (isotiocianato de fluoresceína), (de LIMA, 2005) (FRESHNEY, 2010).

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa “Graph Pad Prism®” 5.1; e os resultados foram representados como a média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas utilizando-se a análise de variância de uma via (ANOVA), ou teste t, de acordo com os grupos testados. O critério de significância utilizado foi de $p < 0,05$.

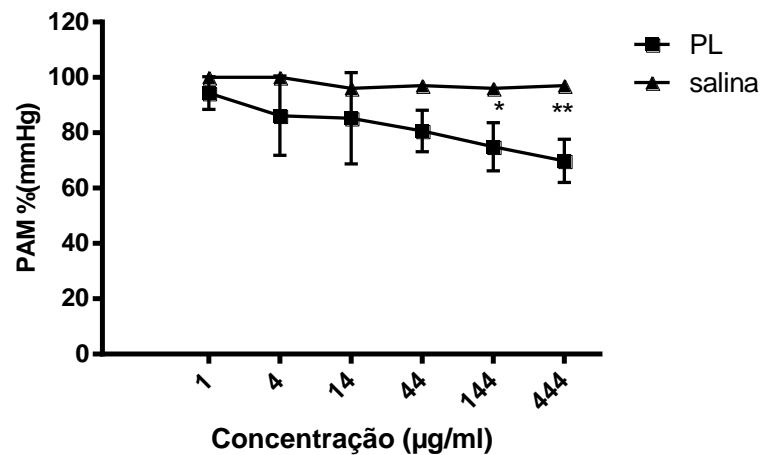
4 - RESULTADOS.

4.1- Efeitos de LP na PAM de ratos: Efeitos da fração proteica LP no sistema cardiovascular, na medida da pressão arterial de ratos (n = 6), usadas concentrações acumulativas/animal).

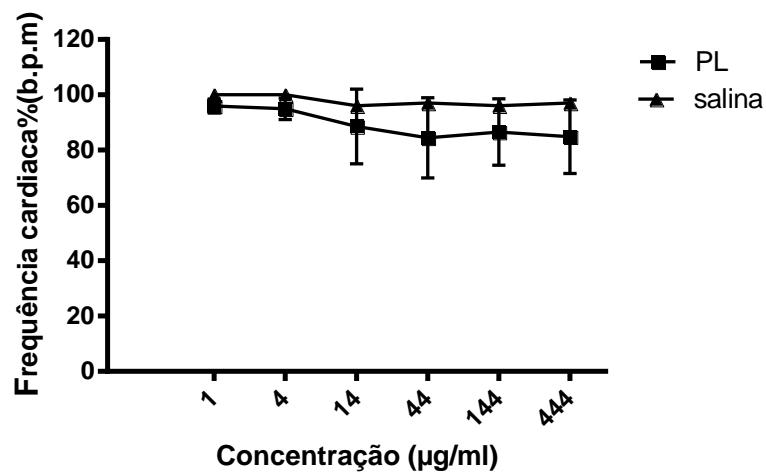
Foram usadas 6 concentrações cumulativas durante 1 hora de experimento. A visualização do efeito a partir de concentrações cumulativas foi realizada através de registro no programa *Windaq/ Datalife*. A Pressão Arterial Média (PAM) foi medida em mm Hg em ratos (n=6); e os valores do controle externo, esse o qual foi medido em ratos diferentes na medida da PAM não diferiram do controle interno, foi medido no início do experimento (primeiros 5 minutos), logo após calibração do sistema no mesmo rato que depois foi desafiado com as frações cumulativas de LP.

Figura 8: A administração do látex de *C. procerca* (LP) nos animais ($n = 6$), nas concentrações cumulativas (1 + 3 + 10 + 30 + 100 + 300 $\mu\text{g/ml}$ ou 1, 4, 14, 44, 144, 444 $\mu\text{g/ml}$); sugere uma ação sobre a (8A) pressão arterial média (PAM) no modelo estudado, sem alteração na frequência cardíaca (8B). Mediana \pm EPM ($*p < 0,05$).

8A.



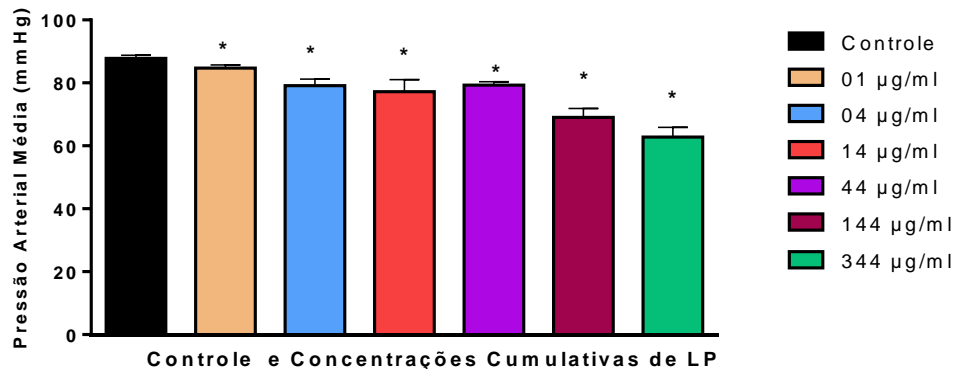
8B.



Na **Figura 8**, visualiza-se que os valores da PAM (mm Hg) do controle (mediana de $87,8 \pm 0,975$) não se mostraram diferentes do controle interno ($p=0,007$).

O efeito hipotensor da LP em concentrações cumulativas, não foi observado sobre a frequência cardíaca nos ratos avaliados ($n = 6$), quando relacionados com a administração de salina. Assim, a partir destes dados selecionamos as concentrações a serem utilizadas nos restantes dos experimentos.

Figura 9: Pressão Arterial Média concentração dependente em concentrações crescentes e cumulativas de LP: Efeito hipotensor, em relação ao tempo de observação para início do efeito (300 segundos ou 5 minutos);



* $p < 0,05$

Durante a fase de calibração do sistema, a PAM manteve-se estável nos animais avaliados ($89,8 \pm 1,47$ mm Hg denominado Controle). Controle utilizado no gráfico acima Após constatação da estabilidade hemodinâmica através da verificação da pressão arterial iniciou-se a adição cumulativa da LP.

A cada 5 minutos era injetado via intravenosa uma concentração de LP A primeira concentração foi de 1 µg/ml, adicionada de mais 3 µg/ml na segunda concentração, mais 10 µg/ml na terceira concentração, mais 100 µg/ml na quarta concentração e mais 300 µg/ml na quinta concentração. De maneira que na primeira concentração se tem 1 µg/ml, na segunda 1 µg/ml, na terceira 14 µg/ml, na quarta 44 µg/ml e na quinta 144 µg/ml. Os primeiros 30 minutos forma de calibração e de medição do controle interno.

Houve redução progressiva da PAM a partir da concentração de 1 µg/ml, sendo a concentração mais significativa para este efeito hipotensor a de 444 µg/ml, mas que levou a óbito, sendo que na concentração cumulativa de 44 µg/ml não houve diferença do controle interno por causa do pequeno erro padrão da média, o que mostra também a tentativa de reversão do efeito pelos ratos ver **Quadro 01**, mas quando comparado com o controle externo houve diferença.

Entretanto o efeito hipotensor na concentração de 144 µg/ml apresentou também significância, e não levou a óbito os animais avaliados.

O efeito ocorreu de forma aguda, nos primeiros 20 segundos após

administração de LP (os níveis pressóricos não eram recuperados).

Mesmo após a administração de fenilefrina 10^{-6} M os animais não reverteram à hipotensão estabelecida, quando esta foi inferior a 50 mm Hg.

O percentual de maior redução da PAM (62,8 mm Hg) foi obtido na concentração cumulativa de 444 $\mu\text{g/ml}$ ($\downarrow 29\%$).

Entretanto este efeito não foi diferente da concentração cumulativa de 144 $\mu\text{g/ml}$ (69,3 mm Hg e $\downarrow 22\%$).

No registro do *software*, foi observada adicionalmente uma tentativa de reversão do efeito, a qual não foi obtida com a administração cumulativa de LP.

A redução da PAM num percentual superior a 29% foi compatível com morte dos animais estudados.

Um bloqueio da resposta hipotensora da LP foi obtido frente à administração cumulativa de aminoguanidina 10^{-4} M, dado último não mostrado.

Quadro 01: Percentual de redução da pressão arterial média em ratos normotensos após injeção intravenosa i.v. contendo fração proteica LP.

Grupo	Mediana PAM (mm Hg)	% da PAM em relação ao controle	% redução da PAM em relação ao controle
Controle	88,6	100	0
1 mg/ml	83,1	94	-6
4 mg/ml	80,6	91	-9
14 mg/ml	78,4	88	-12
44 mg/ml	80,2	91	-9
144 mg/ml	69,3	78	-22
444 mg/ml	62,8	71	-29

Quanto à atividade contrátil em 1^o ramo de artéria mesentérica (n = 4), aonde:

A: Primeiro se induziu contração por K^+ na concentração de 60 μM ; Para testar a presença ou ausência do endotélio, se presente o endotélio há contração com a adição do K^+ no meio, se não o K^+ não provoca contração.

B: Depois Adição de fenilefrina (Phe) 0,1 e 1,0 μM ;

C: Depois Adição de Acetilcolina (Ach) 1,0; e 3,0 μM ;

D: Depois Adição de LP (0,1 a 3,0 $\mu\text{g/ml}$).

E: Depois Adição de LP (10 a 300 $\mu\text{g/ml}$).

F: Depois Adição de LP (600 $\mu\text{g/ml}$).

A adição de LP (figura 9) não alterou a resposta contrátil em ramo de artéria mesentérica, nas amostras com e sem endotélio e responsivas à ação contrátil da fenilefrina e relaxante da acetilcolina. Uma última tentativa foi encaminhada com o dobro da concentração máxima, sem resposta vaso relaxante.

4.2- Efeitos renais da fração proteica LP.

4.2.1. Modelo de perfusão renal de rato.

Os efeitos sobre a pressão arterial decorrem de ações sobre estruturas como coração, vasos e rins, uma vez que o controle da homeostase é efetuado nestes. Para tal avaliação focamos a atenção para a fisiologia renal, em especial para os parâmetros fisiológicos e bioquímicos renais, cujos resultados podem ser visualizados logo mais:

Figuras 10, 11, 12 e 13. E os Gráficos das **Figuras 14, 15 e 16** a seguir.

Figura 10: Valores médios dos parâmetros funcionais renais de ratos frente à adição de LP (10 µg/ml) ao sistema de perfusão *ex-vivo* (n = 4), avaliados aos 30, 60, 90, 120 minutos. Os primeiros 30 minutos de perfusão são considerados como controle interno do experimento. Dados apresentados como média ± EPM. * $p < 0,05$.

LP 10 µg/ml	Controle (30 min)	60 minutos	90 minutos	120 minutos
PP (mm Hg)	103,0±4,458	103,9±3,963	105,5±4,037	105,2±4,789
RVR (mm Hg/ml/g)	5,325±0,8701	5,294±0,8162	5,293±0,7637	5,263±0,7592
FU (ml/min/g)	0,0748±0,01142	0,06807±0,01092	0,0558±0,00938	0,04993±0,00791
RFG (ml/min/g)	0,3401±0,05407	0,1649±0,02734*	0,1265±0,01837*	0,1067±0,01202*
%TNa ⁺	86,80±1,105	72,15±4,526*	73,34±3,420*	74,33±2,380*
%TCI ⁻	84,43±1,676	69,31±4,441*	68,21±3,807*	68,15±2,842*
%TK ⁺	83,39±2,035	68,51±5,660*	68,59±4,190*	75,00±2,070*

Figura 11: Valores médios dos parâmetros funcionais renais de ratos frente à adição de LP (30 µg/ml) ao sistema de perfusão *ex-vivo* (n = 4), avaliados aos 30, 60, 90, 120 minutos. Os primeiros 30 minutos de perfusão são considerados como controle interno do experimento. Dados apresentados como média ± EPM. * p<0,05.

LP 30 µg/ml	Controle (30 min)	60 minutos	90 minutos	120 minutos
PP (mm Hg)	100,6±4,328	100,6±4,326	97,84±4,303	92,97±4,303
RVR (mm Hg/ml/g)	5,246±0,8652	5,211±0,8416	5,055±0,7970	4,825±0,7869
FU (ml/min/g)	0,1390±0,01407	0,1279±0,01468 *	0,09307±0,01047	0,007633±0,00697
RFG (ml/min/g)	0,5309±0,07281	0,2359±0,01608 *	0,1695±0,01834*	0,1199±0,008247*
%TNa ⁺	80,77±1,955	65,14±4,474*	66,24±3,966*	64,79±2,986*
%TCI ⁻	77,49±59,36	53,36±5,399*	60,54±4,965*	54,86±4,699*
%TK ⁺	76,99±3,529	62,17±4,433*	67,49±4,020	70,15±3,322

Figura 12: Valores médios 30, 60, 90, 120 minutos; dos parâmetros funcionais renais de ratos frente à adição de LP (100 µg/ml) ao sistema de perfusão *ex-vivo* (n = 4). Os primeiros 30 minutos de perfusão são considerados como controle interno do experimento. Dados apresentados como média ± EPM. * p<0,05.

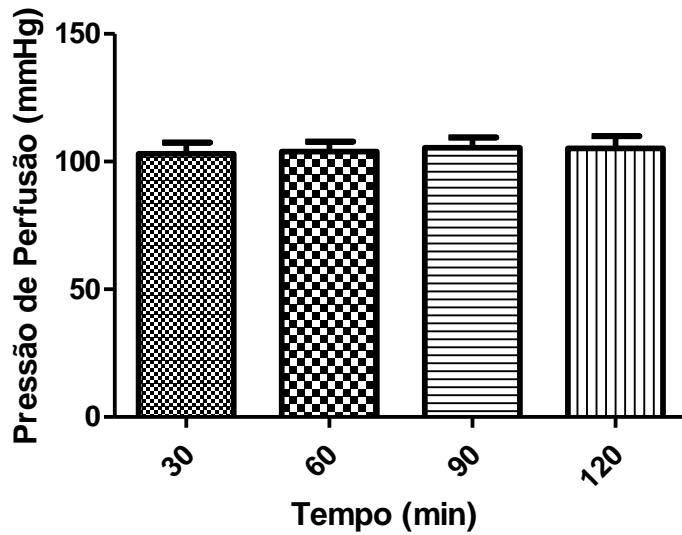
LP 100 µg/ml	Controle (30 min)	60 minutos	90 minutos	120 minutos
PP (mm Hg)	102,8±5,2	101,5±2,4*	97,6±3,2	98,7±1,9
RVR (mm Hg/ml/g)	5,50±0,07	3,86±0,20*	3,81±0,20*	3,95±0,08*
FU (ml/min/g)	0,117±0,0079	0,1297±0,0094	0,102±0,0060	0,1023±0,008
RFG (ml/min/g)	0,5309±0,073	0,2369±0,016*	0,1695±0,018*	0,1199±0,008*
%TNa ⁺	80,77±1,955	65,14±4,474*	66,24±3,9666*	64,74±2,986*
%TCI ⁻	80,58±4,794	64,09±3,334*	56,57±3,893*	60,17±3,444*
%TK ⁺	76,99±3,529	62,17±4,433*	67,49±4,020*	70,15±3,322*

Figura 13: Valores médios totais ao final dos 120 minutos de perfusão; dos parâmetros funcionais renais de ratos frente à adição de LP (10, 30 e 100 µg/ml) ao sistema de perfusão *ex-vivo* (n = 4 por concentração). Os primeiros 30 minutos de perfusão são considerados como controle interno do experimento. Dados apresentados como média ± EPM. * p<0,05.

Parâmetros renais	Controle	LP 10 µg/ml	LP 30 µg/ml	LP 100 µg/ml
PP (mm Hg)	102,8±5,2	101,5±2,4	97,6±3,2	98,7±1,9
RVR (mm Hg/ml/g)	5,50±0,07	3,86±0,20	3,81±0,20*	3,95±0,08*
FU (ml/min/g)	0,20±0,03	0,099±0,009	0,121±0,015	0,113±0,004
RFG (ml/min/g)	0,740±0,02	0,456±0,183*	0,446±0,061*	0,539±0,052*
%TNa ⁺	81,30±0,03	85,46±1,23*	85,33±1,55*	75,10±4,58*
%TCI ⁻	77,10±0,29	85,38±1,21*	81,30±0,03*	72,79±6,26*
%TK ⁺	74,78±0,14	63,88±2,84*	63,15±3,43*	52,18±6,17*

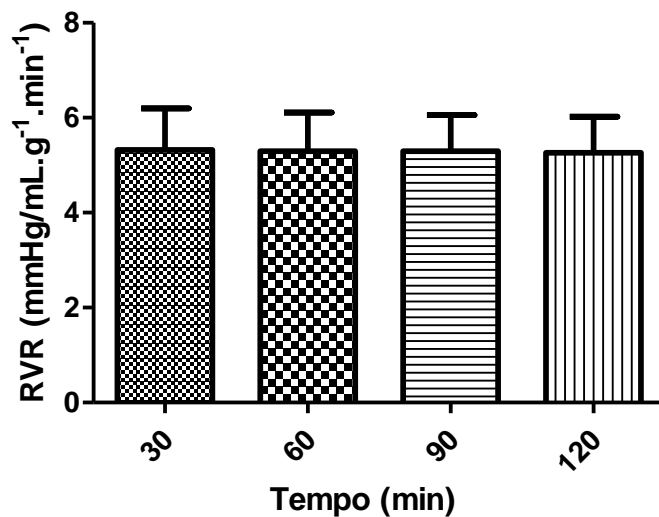
Figura 14: Representação gráfica dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos renais da perfusão renal com LP, na concentração de 10 µg/ml (n = 4/grupo).

PRESSÃO DE PERFUSÃO (PP) 10 µg/ ml.

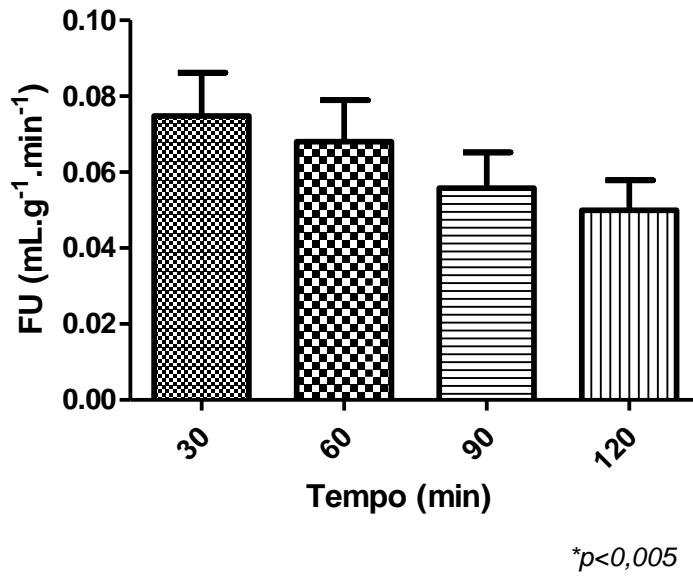
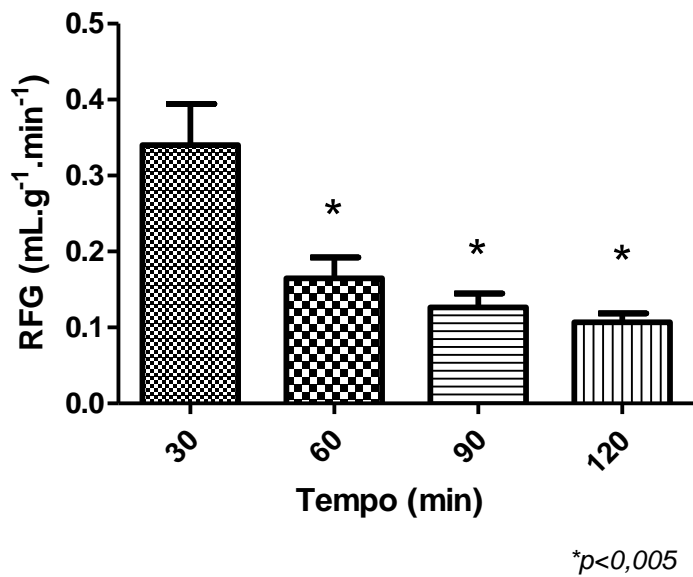


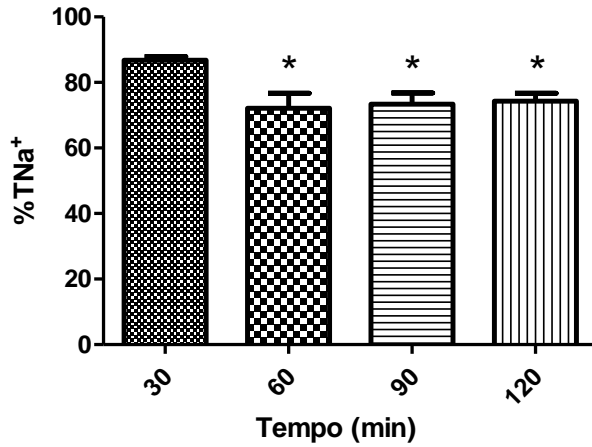
* $p < 0,005$

RESISTÊNCIA VASCULAR RENAL (RVR) 10 µg/ ml.

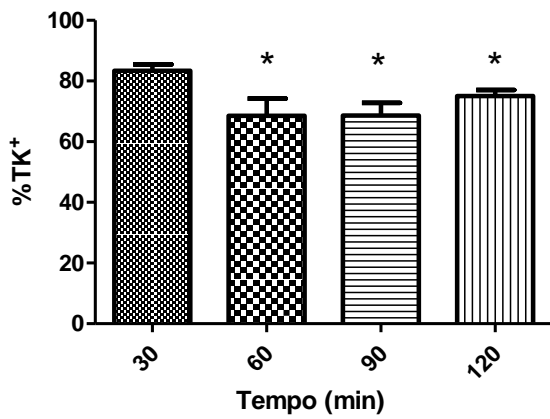


* $p < 0,005$

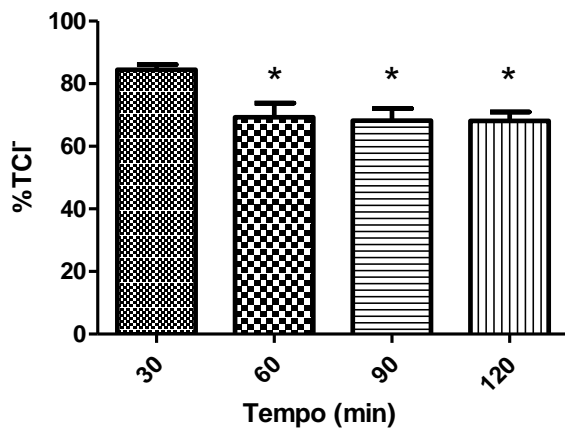
FLUXO URINÁRIO (FU) 10 µg/ ml.**Ritmo de filtração glomerular (RFG) 10 µg/ml.**

Porcentagem de reabsorção renal de Sódio (%Na⁺) 10 µg/ml.

* $p < 0,005$

Porcentagem de reabsorção renal de Potássio (%K⁺) 10 µg/ml.

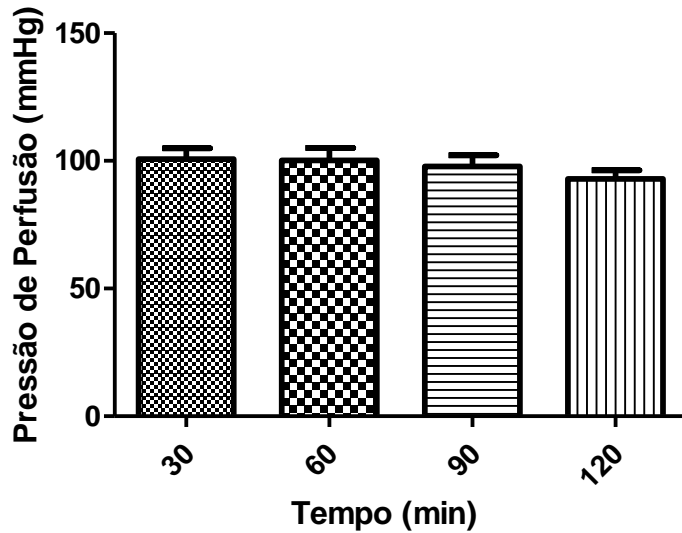
* $p < 0,005$

Porcentagem de reabsorção renal de Cloreto (%Cl⁻) 10 µg/ml.

* $p < 0,005$

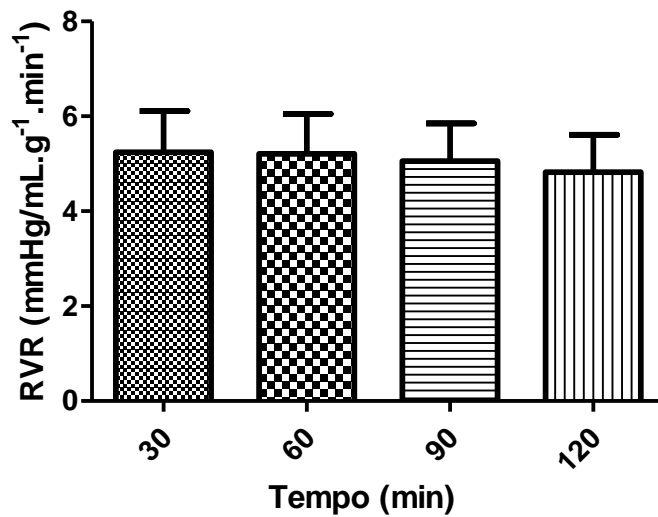
Figura 15: Representação gráfica dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos renais da perfusão renal com LP, na concentração de 30 µg/ml (n=4/grupo).

PRESSÃO DE PERFUSÃO (PP) 30 µg/ml.

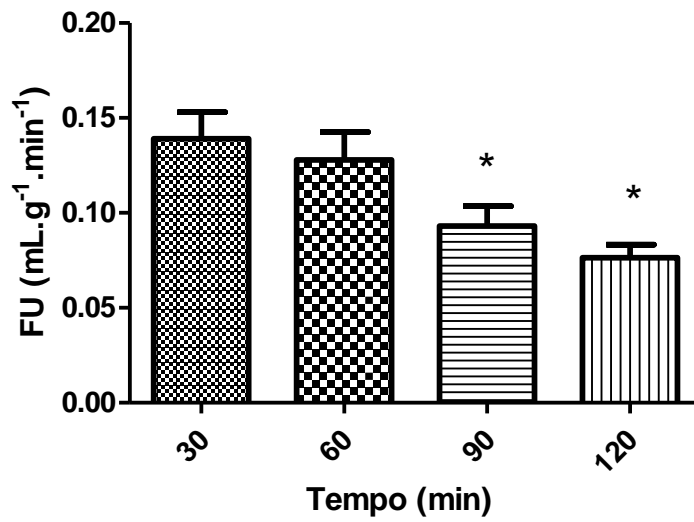


* $p < 0,005$

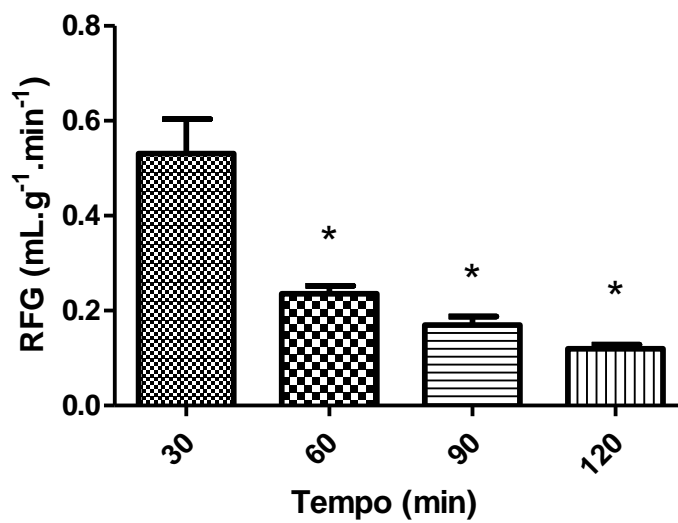
Resistência vascular renal (RVR) 30 µg/ml.



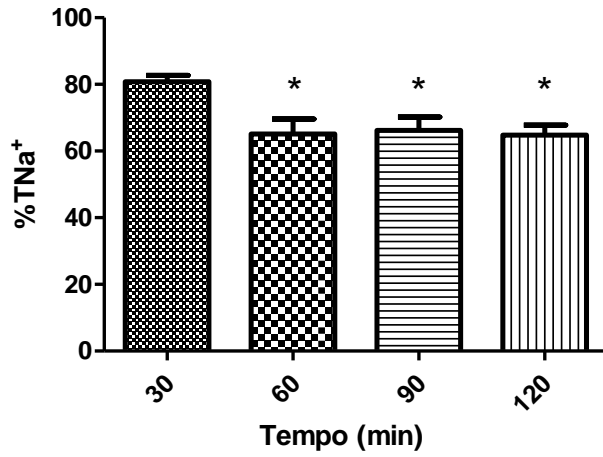
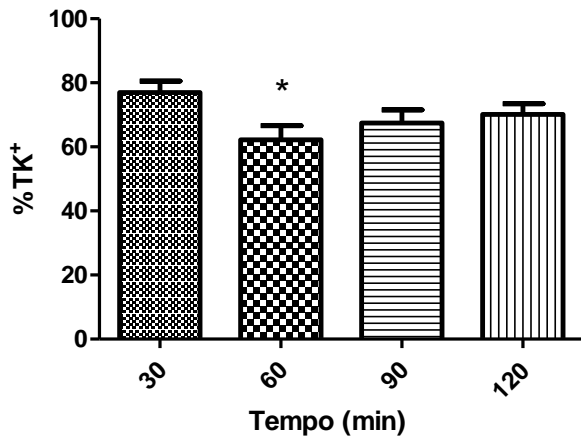
* $p < 0,005$

Fluxo urinário (FU) 30 µg/ml.

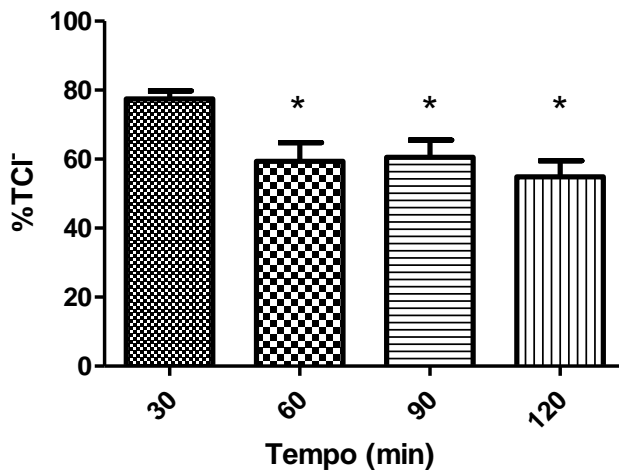
* $p < 0,005$

Ritmo de filtração glomerular (RFG) 30 µg/ml.

* $p < 0,005$

Reabsorção renal de sódio (%Na⁺) 30 µg/ml.**Reabsorção renal de potássio (%K⁺) 30 µg/ml.**

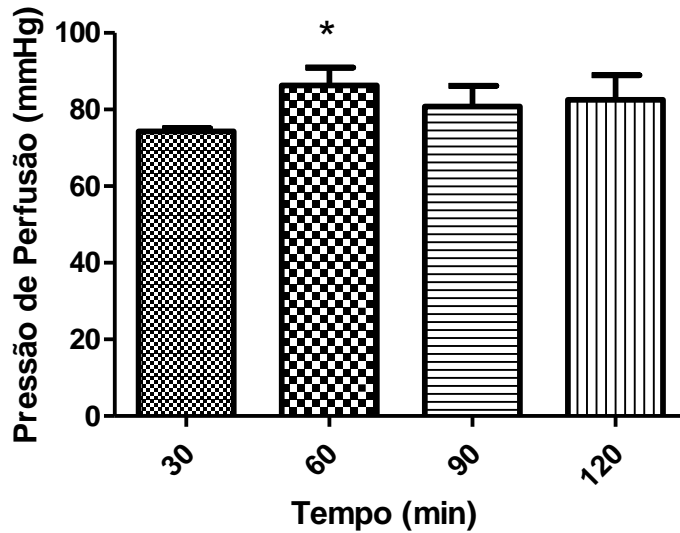
* $p < 0,005$

Reabsorção renal de cloreto (%Cl⁻) 30 µg/ml.

* $p < 0,005$

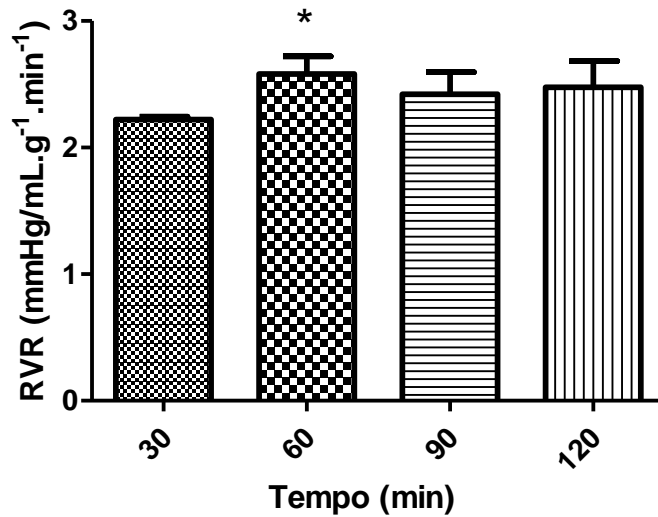
Figura 16: Representação gráfica dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos renais da perfusão renal com LP, na concentração de 100 µg/ml (n=4/grupo).

Pressão de Perfusão (PP) 100 µg/ml.

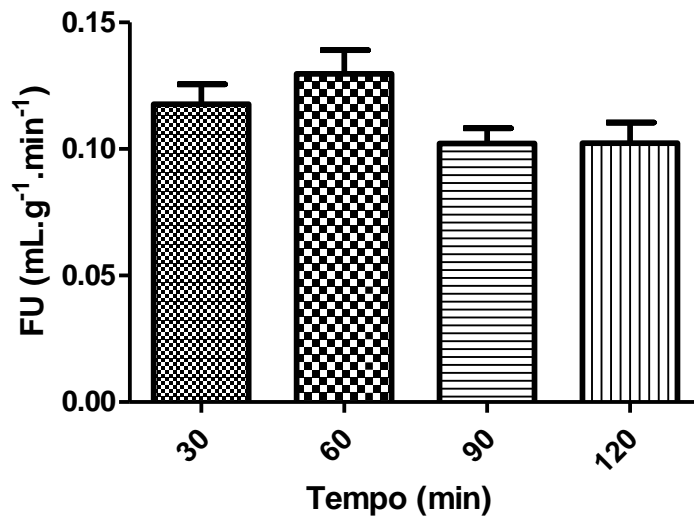


* $p < 0,005$

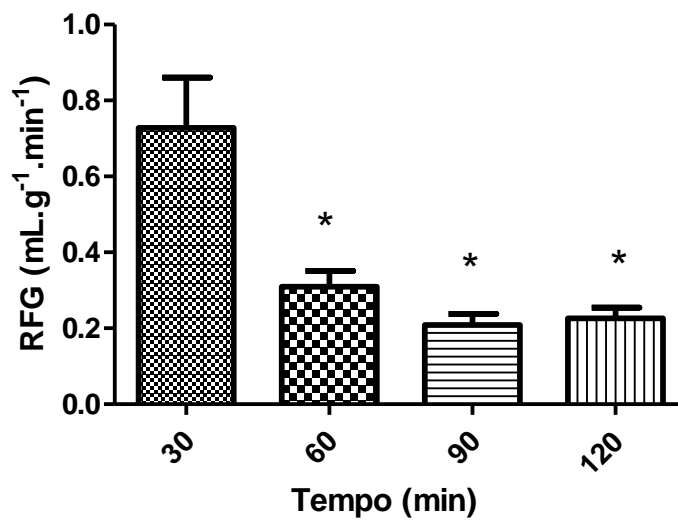
Resistência vascular renal (RVR) 100 µg/ml.



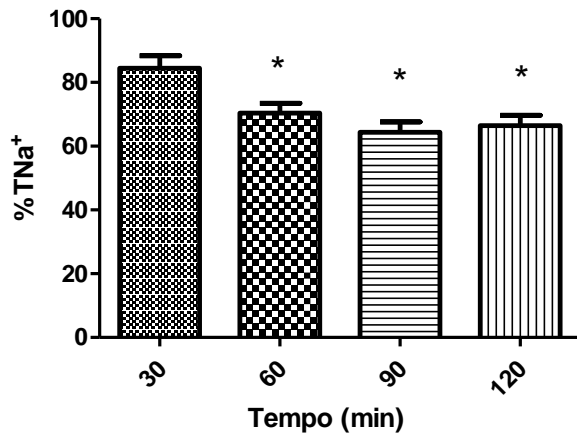
* $p < 0,005$

Fluxo urinário (FU) 100 µg/ml.

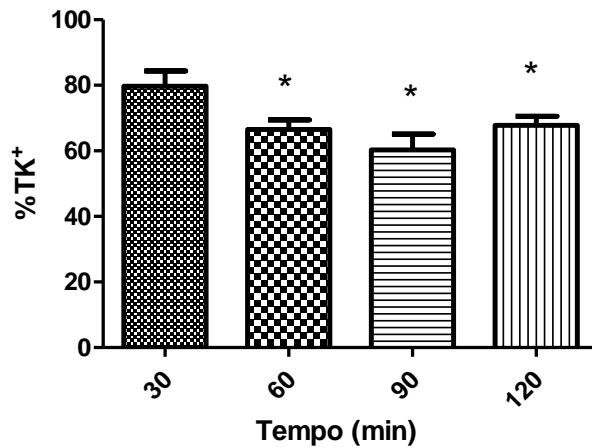
* $p < 0,005$

Ritmo de filtração glomerular (RFG) 100 µg/ml.

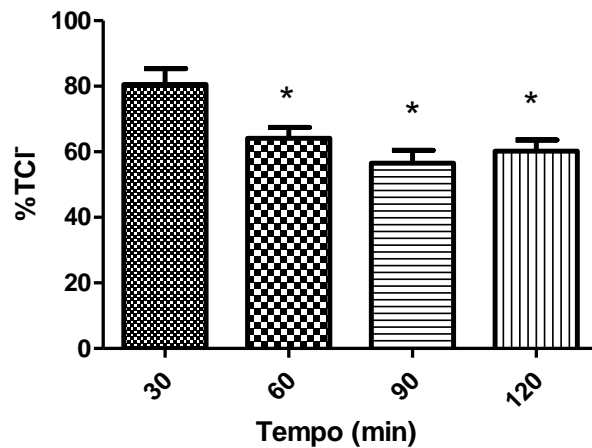
* $p < 0,005$

Porcentual de reabsorção de sódio (%Na⁺) 100 µg/ml.

* $p < 0,005$

Porcentual de reabsorção de Potássio (%K⁺) 100 µg/ml.

* $p < 0,005$

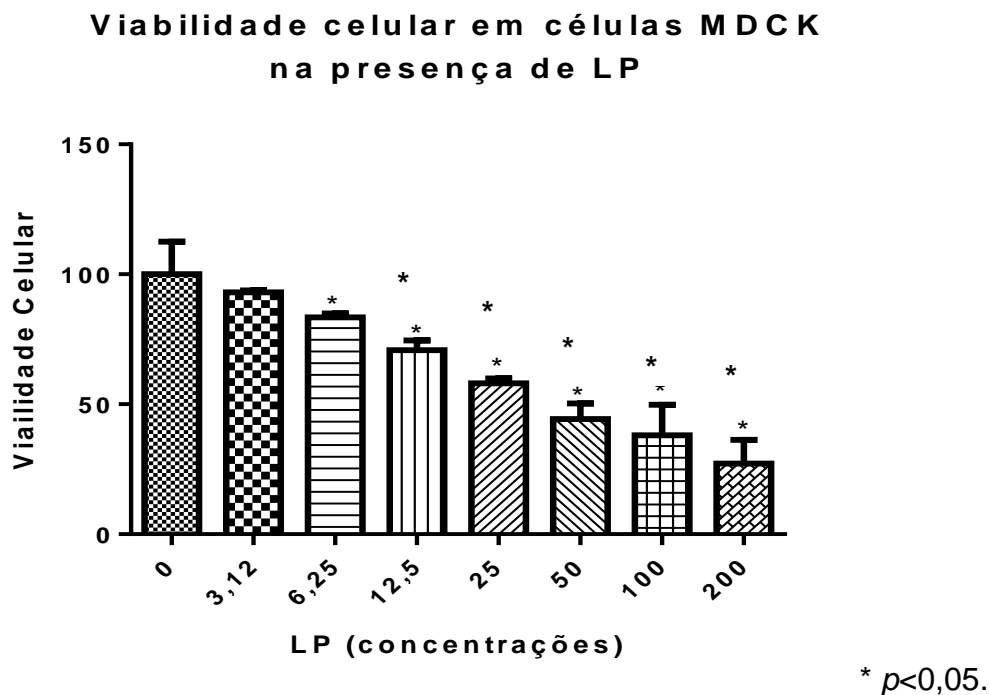
Porcentual de reabsorção de Cloreto (%Cl⁻) 100 µg/ml

* $p < 0,005$

4.2.2- Efeito da LP em células MDCK (linhagens celulares de cultura do epitélio tubular renal).

Através de dados avaliados pelo teste de viabilidade celular: MTT, aonde os dados foram expressos por média \pm Erro padrão da Média (EPM). A fração LP apresentou redução de viabilidade celular em células tubulares renais (MDCK) e a CI_{50} foi de aproximadamente a concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$. Ver **Figura 17** abaixo:

Figura 17: Efeito da fração LP em células tubulares renais (MDCK).



Toxicidade celular em células de cultura MDCK.

CI_{50} = concentração de aproximadamente 50 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.3. Citometria de fluxo em células de cultura MDCK.

Com o intuito de investigar tipo de morte celular causada pela fração LP foi realizado ensaio em citometria de fluxo com marcação por anexina V e 7-AAD.

Durante apoptose as células modificam a estrutura de suas membranas plasmáticas para sinalização. A expressão da fosfatidilserina na superfície celular é uma das mudanças estruturais que é reconhecida pelos fagócitos. A anexina V é uma proteína de ligação para fosfolípidos, que na presença de íons de cálcio exibe alta afinidade para ligação seletiva a fosfatidilserina.

7-AAD (7-amino-actinomicina D) possui capacidade de ligação ao DNA e de alta eficiência por sua exclusão em células intactas. É útil para a análise de DNA e na

discriminação de células mortas durante a análise de citometria de fluxo. Quando excitado por luminosidade a laser, a fluorescência do 7-AAD é detectada no intervalo de medida do vermelho do espectro (650 nm, filtro de passagem longa), (Freshney, 2010).

Os resultados demonstram diferença significativa apenas para dupla marcação em células MDCK quando desafiadas com 100 $\mu\text{g/ml}$, o dobro da IC_{50} de LP por 24 horas, sugerindo que as células nas condições de desafio encontram-se em processo de apoptose tardia, e ou necrose (BOERSMA *et.al.*, 2005). Nos quadrantes da figura abaixo nas letras **B** e **D** os quadrantes superiores são marcados por 7-AAD e os quadrantes direitos são marcados por Anexina V. De maneira que o quadrante inferior esquerdo não é marcado por nenhum dos dois marcadores e o quadrante superior direito é marcado pelos dois marcadores. Ver **Figura 18**

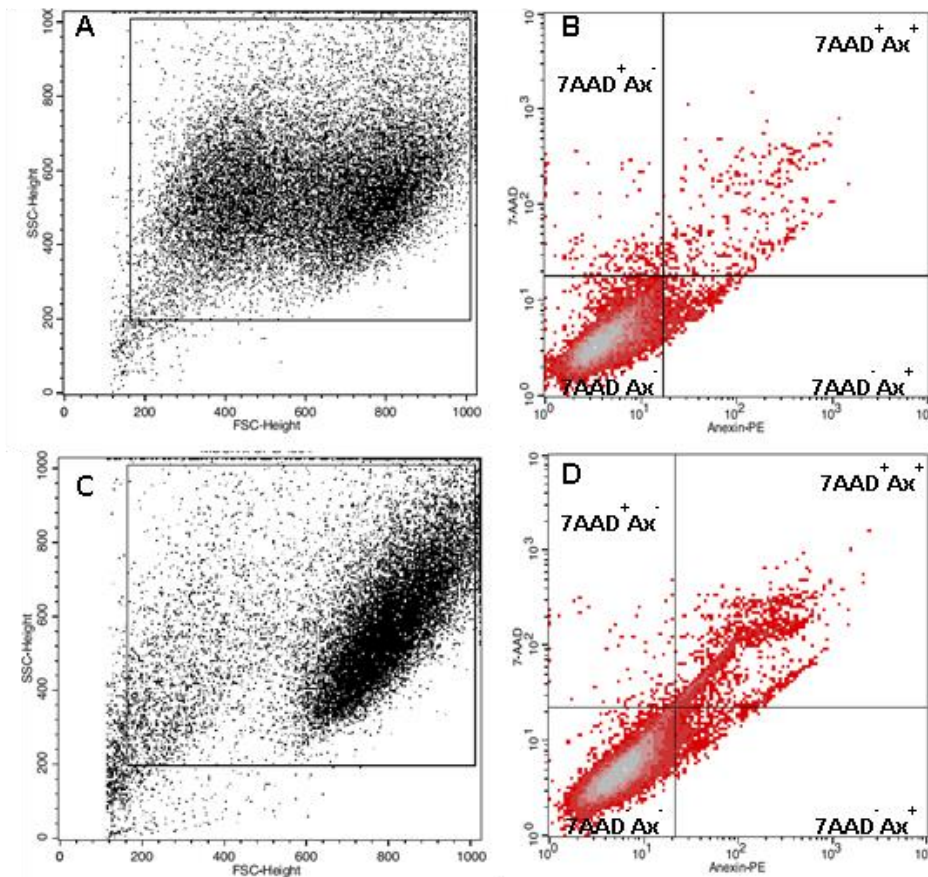


Figura 18:

Citometria de fluxo em células de cultura MDCK na ausência e na presença de LP na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$.

A- Controle negativo: Distribuição por tamanho e granulosidade

B- Controle negativo: Distribuição das marcações por 7-AAD e Anexina V;

C- Grupo desafiado com LP: Distribuição por tamanho e granulosidade;

D- Grupo desafiado com LP: Distribuição das marcações por 7-AAD e Anexina V.

Visualiza-se acima o controle negativo: Os dois primeiros quadros demonstram a morfologia natural da célula MDCK, correlacionando tamanho e granulosidade e também a distribuição das células controle marcadas por anexina V e 7-AAD sem a presença de LP. O segundo demonstra a dupla marcação do controle negativo.

No gráfico abaixo observe células do “gate” usadas no fluxo citométrico Aonde nas ordenadas veem-se a porcentagem de eventos positivos, “% of positive events” e nas abcissas veem-se as marcações com anexina V e 7-AAD. Aonde 7-AAD⁺ Ax⁻ significa marcação apenas por 7-AAD. 7-AAD⁻ Ax⁺ significa marcação apenas por Anexina V e 7-AAD⁺ Ax⁺ significa marcação pelos dois marcadores, 7-AAD e anexina V.

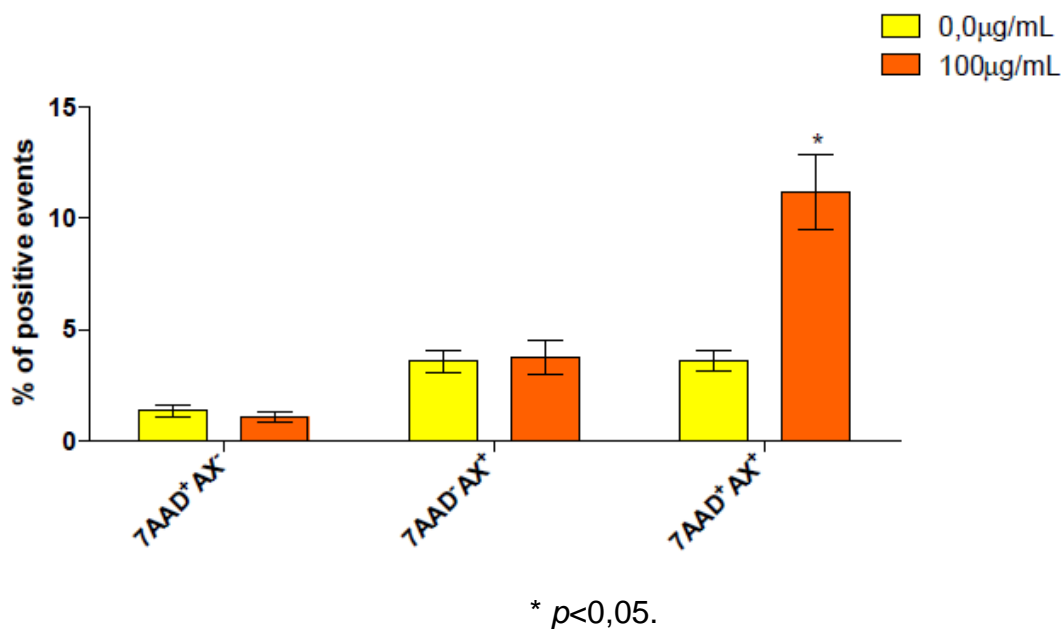


Figura 19: Distribuição das células selecionada através do Cellquest®, de acordo com a intensidade de marcação com Anexina V e 7AAD.

Observa-se que o grupo significativo foi o com dupla marcação, o que sugere que a população de células encontra-se em processo de apoptose tardia, e ou necrose.

De modo a comparar os resultados *in vitro* com os *do ex vivo*, procedeu-se a avaliação histopatológica renal, essa histologia feita com rins perfundidos apenas com a solução de perfusão, ou adicionada da fração proteica LP de *Calotropis procera*.

4.3. - Alterações histopatológicas e morfológicas renais. (induzidas pela fração LP).

A adição de LP induziu danos às estruturas do néfron. Nos Glomérulos, interstícios e vasos sanguíneos não houve alterações consideráveis. Enquanto que nos túbulos renais ocorreram várias alterações: dilatação dos túbulos que variou de discreta a moderada, discreta degeneração hidrópico vacuolar, Deposição de material na luz dos túbulos de discreta a moderada, descamação celular para a luz dos túbulos de discreta a moderada, deposição de material proteináceo no espaço urinário, e apenas na concentração de 100 µg/ml morte celular por apoptose e necrose em todos os tipos de túbulos renais, proximais, distais e alça de “Henle”. Isto em lâminas histológicas de rim perfundido (H/E; 400X) “Krebs-Henseleit” modificada adicionadas de LP: 10 30, e 100 µg/ml. Também foram realizadas as leituras em lâminas de rim perfundido apenas com a solução perfusora sem o desafio com a LP, essas eram as nossas lâminas controle, aonde não foram evidenciadas nenhuma alteração tóxica ou patológica. Ver Esquema das estruturas do néfron abaixo, na **Figura 20**. E na página 81 a **Figura 21**.

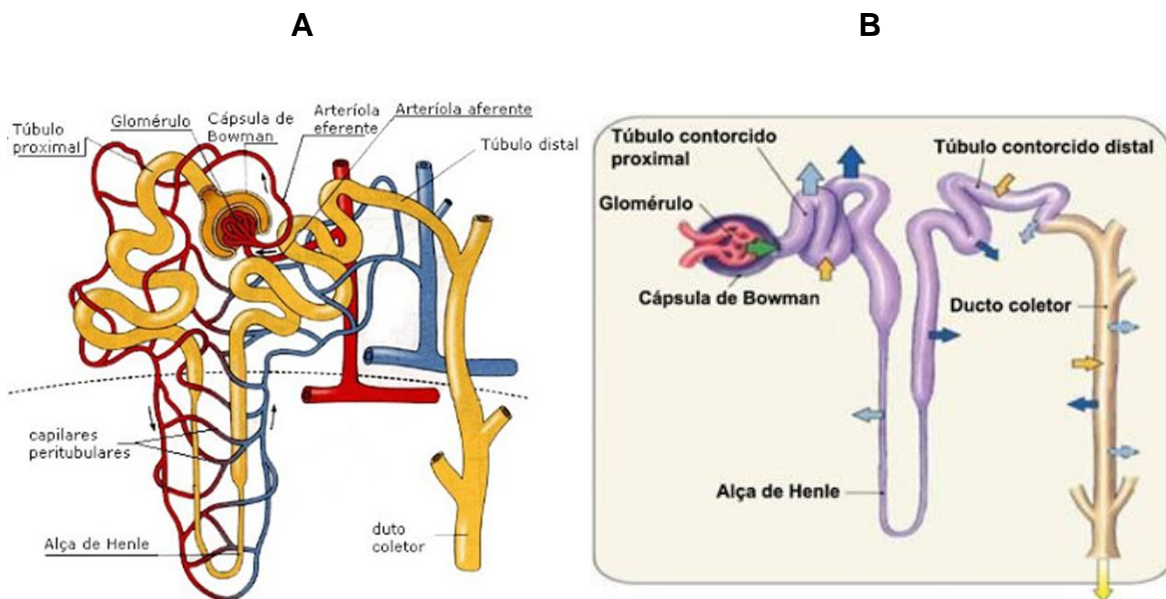


Figura 20: Estruturas esquemáticas do néfron.

A: (http://3.bp.blogspot.com/_Pculk3t1u4/Sj6fkF0eWTI/AAAAAAAAAFQ/fu4ARcvLMM8/s400/N%C3%89FRONN.bmp).

B: (http://3.bp.blogspot.com/_Pculk3t1u4/Sj57DXsZ31I/AAAAAAAAAEw/A3q8RIBvNaQ/s400/n%C3%A9fronzinho+copy.jpg).

Como avaliação semi-qualitativa da lesão renal foi efetuado escore de lesão de glomérulos, túbulos e vasos renais que sofreram toxicidade com a LP. Nas concentrações de 10, 30 e 100 µg/ml não foi encontrado lesões teciduais nos interstícios e glomérulos.

Entretanto a porção tubular renal apresentou discreta deterioração na concentração de 10 µg/ml, moderada na de 30 µg/ml e de moderada a severa na concentração de 100 µg/ml, além de discreta deposição de material proteico nos glomérulos nesta última concentração, artefato da albumina contida na solução perfusora. Tais dados explicam em parte as alterações visualizadas na perfusão renal, quanto ao ritmo de filtração glomerular e quanto à reabsorção reduzida de sódio, cloreto e potássio. (MANJERI *et. al.*; 1978); (Jia, P *et. al.*, 2013); e (Zhou, *et. al.*, 2011). Ver **Figura 21** na próxima página.

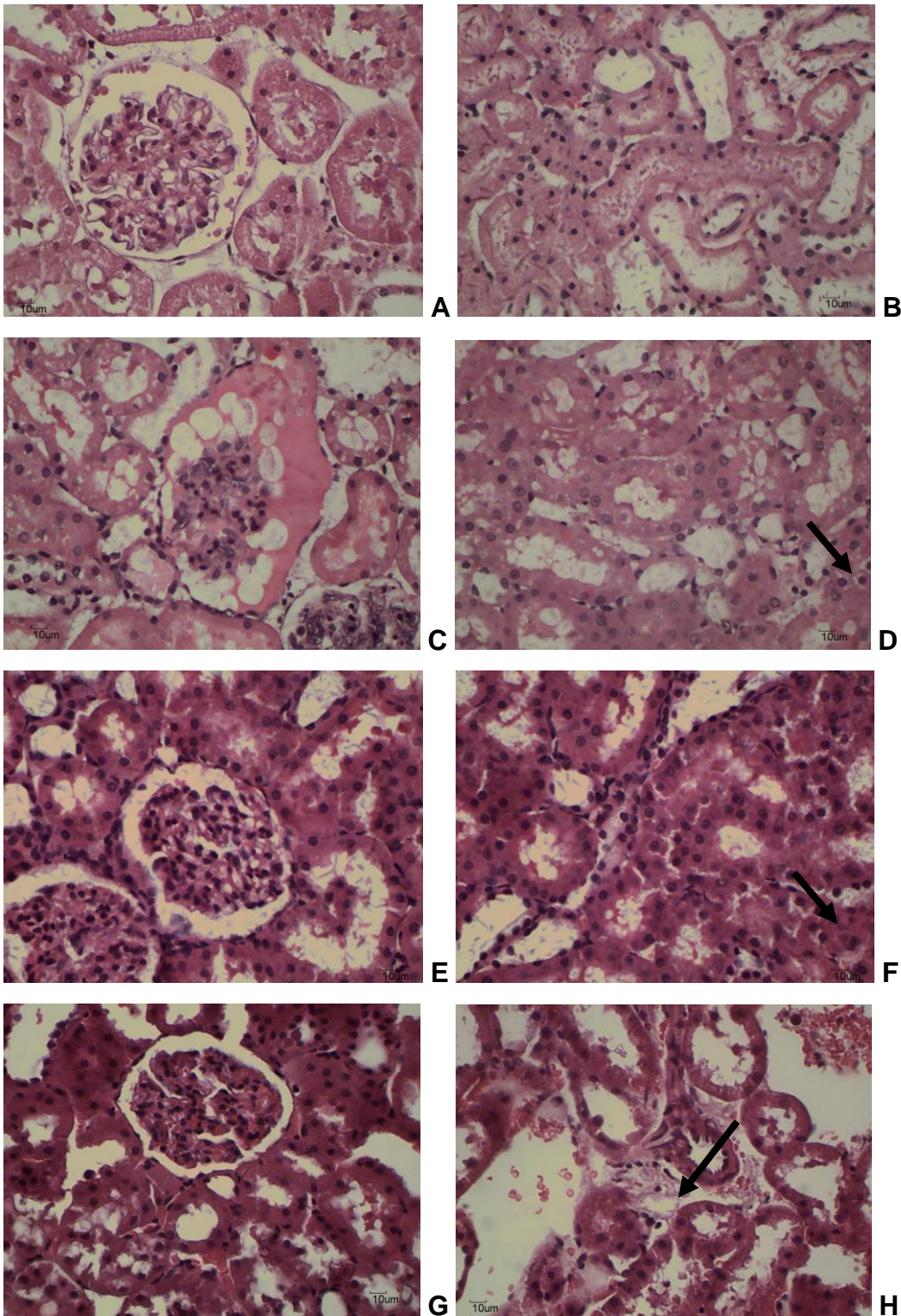


Figura 21: Fotomicrografias de lâminas histopatológicas (H/E; 400X) de rins perfundidos com Krebs-Henseleit modificada (Controle, A- Glomérulo e B- Túbulo renal) e com adição de LP: Glomérulos (C- 10 µg/mL, E- 30 µg/mL, e F- 100 µg/mL); e túbulos (D- 10 µg/mL, F- 30 µg/mL, H- 100µg/mL).

5. Discussão.

O trabalho aqui descrito no sentido de dar continuidade aos estudos sobre a caracterização bioquímica e farmacológica e toxicológica de proteínas do látex de *C. procera*, agora investigando principalmente os efeitos renais, primeiramente foram avaliados alguns efeitos sobre a Pressão Arterial Sistêmica destas proteínas.

Assim, os achados de toxicidade renal aguda do látex de *C. Procera*, principalmente nos túbulos direcionou o olhar, para que a fração proteica do mesmo, posteriormente seja uma matéria prima para a produção de um fármaco, fitoterápico ou outra ferramenta farmacológica na área das doenças ligadas a hipertensão arterial, para tratamento de doença relacionada aos rins ou câncer, entre outras possíveis aplicações diminuindo a sua toxicidade, pela redução da concentração ou por separação maior da fração LP até ao nível molecular ou mesmo por remodelagem molecular “docking”.

Assim o látex de *C. procera* com toxicidade renal aguda principalmente nos túbulos e quem sabe posteriormente seja uma ferramenta para a produção de um fármaco, fitoterápico ou outra ferramenta farmacológica na área das doenças ligadas a hipertensão arterial, diminuindo a sua toxicidade, pela redução da concentração ou por separação maior da fração LP até ao nível molecular ou mesmo por remodelagem molecular “docking”.

A Hipertensão arterial sistêmica é uma doença crônico-degenerativa que afeta o sistema cardiovascular, e seu controle tem se constituído um desafio para todos os profissionais da saúde. Caracterizada como uma das mais importantes causas de morte em todo o mundo que pode ser prevenida através de mudanças no estilo de vida ou com medidas farmacológicas.

Tanto a morbidade quanto a mortalidade por doenças renais e, ou, cardiovasculares são comumente elevadas em pessoas com hipertensão. É reconhecida como uma doença de alta prevalência na população, ocasionando quando não tratada adequadamente complicações clínicas graves como o acidente vascular cerebral, doença coronariana, insuficiência cardíaca e insuficiência renal. Além disso, também é considerado um grave problema de saúde pública por sua magnitude, risco e dificuldades no seu controle, sendo responsável por cerca de 1/3 de todas as mortes no mundo (SBC/SBH/SBN, 2013).

Um dos maiores problemas da farmacoterapia anti-hipertensiva é a não adesão ao tratamento, assim contribuindo para o inadequado controle dos níveis pressóricos do

paciente.

Dentre os vários fatores que contribuem para a não adesão do paciente ao tratamento farmacológico, destacam-se custo elevado dos medicamentos; ocorrências de efeitos adversos desagradáveis; e a interferência na qualidade de vida após o início do tratamento. Da mesma forma, uma das maiores dificuldades encontradas nas terapias farmacológicas refere-se ao fato de que alguns pacientes mostram-se refratários aos tratamentos convencionais, enquanto outros têm seus níveis pressóricos reduzidos substancialmente, podendo elevar o risco aos portadores de doença coronariana associada.

Neste contexto, o investimento em novos estudos que visem investigar alternativas de prevenção e tratamento e que possam ser utilizadas isoladamente ou aliadas às terapias convencionais, seriam extremamente úteis. Assim, uma opção tradicionalmente bem aceita provém dos produtos naturais, especialmente aqueles habitualmente utilizados devido o grande apelo popular. Estes produtos podem representar, potencialmente, uma fonte alternativa no fornecimento de novas estruturas químicas, assim como um recurso ativo na forma de fitoterápico padronizado e eficaz. (SBC/SBH/SBN, 2013).

Nos últimos anos, graças aos progressos alcançados nos métodos analíticos e farmacológicos, os conhecimentos sobre as plantas medicinais foram consideravelmente aumentados. Entretanto, apesar do grande número de trabalhos publicados acerca de novos constituintes químicos e prováveis benefícios farmacológicos dos produtos naturais, isto pode representar apenas uma pequena parcela do que temos ainda por descobrir; já que é muito expressivo o número de plantas ainda não estudadas, tanto no sentido de uma utilização direta, como na obtenção de novos princípios ativos que possam ser convertidos em compostos farmacologicamente ativos.

O efeito primário da fração proteica LP de *C. procera*, sobre a Hipertensão Arterial Sistêmica, quando usado o primeiro sistema de medição da Pressão arterial em ratos *in vivo* fica como início do nosso ensaio, mas não foi confirmado em anel do primeiro ramo da artéria mesentérica isolado.

Podendo ser um efeito consequente da lesão renal, principalmente nos túbulos renais. Embora tenha se encontrado na literatura, efeito de uma fração do látex relacionada ao aumento do óxido nítrico. (RAMOS et. al., 2009) Há que ser consideradas diferenças individuais dos ratos utilizados, sazonalidade, enfim alterações ambientais, de coleta, além da adequação de outras metodologias para este fim. Pois essa planta possui

uma gama de constituintes que em outros modelos elevaram a força de contração cardíaca, culminando com toxicidade de cardiomiócitos, embora não verificada neste estudo (MIRAGOLI, *et. al.*, 2013).

Os cardenólídeos são compostos presentes no látex de CP que possuem a capacidade de inibir a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, resultando em distúrbio eletrolítico que por sua vez, afeta a condutividade do coração (Khalisov *et. al.*, 2015).

Em se tratando de células especializadas, nos laticíferos se encontram todas as enzimas relacionadas ao metabolismo primário dos vegetais. Nestes fluidos ocorre também síntese de metabólitos secundários frequentemente tóxicos, principalmente para mamíferos, como é o caso dos cardenólídeos (MOUSTAFA *et. al.*, 2010).

Os autores seguintes (AHMED, *et. al.*, 2004) observaram que o pré-tratamento com extrato etanólico de látex de *C. procera* reduziu significativamente os níveis elevados de marcadores enzimáticos em homogeneizados de soro e cardíacos em ratos com infarto do miocárdio induzidos por isoproterenol.

A observação histopatológica revelou uma proteção marcada pelo extrato de dano necrótico do miocárdio. Entretanto, os mesmos autores demonstraram a cardioproteção promovida por fitoconstituintes da *Calotropis procera*. Tais constituintes interferem benéficamente no metabolismo secundário de lipídeos e de marcadores enzimáticos hepáticos no modelo de infarto de miocárdio em ratos.

Considerando os resultados da perfusão renal com LP, e os aspectos toxicológicos desta planta, observamos que o rim pode ser considerado órgão-alvo para toxicidade dos compostos contidos na fração LP.

O látex possui uma grande gama de proteínas, sendo especialmente rico em enzimas com atividades proteolíticas. Relata-se a ocorrência de inúmeras proteinases no látex de diversas espécies do gênero *Euphorbia*.

Em nosso estudo com a avaliação da citotoxicidade em células MDCK, visualizou-se toxicidade de LP como sendo concentração dependente quando foi adicionada em escala logarítmica. (OLIVEIRA *et. al.*, 2007) verificou que atividade em células MDCK induzia apoptose e que a atividade da enzima topoisomerase I sobre o DNA é drasticamente reduzida na presença das proteínas laticíferas (OLIVEIRA *et. al.*, 2007).

Dados similares nesta tese foram constatados, na avaliação do efeito de LP na perfusão renal, induzindo já na concentração de 30 $\mu\text{g/ml}$, lesão no tecido renal expostos a LP, afetando túbulos renais, aumentando progressivamente com a concentração. Dados agudos de até duas horas aproximadamente de exposição do rim isolado e perfundido.

Também responsáveis pela diminuição da formação de urina. Portanto de excreção de eletrólitos na urina, e morte celular na concentração de 100 µg/µl.

Como efeitos biológicos renais, ressaltam-se os achados de redução no transporte tubular renal de cloreto, sódio e de potássio, concomitante com a redução da pressão de perfusão e do ritmo de filtração glomerular.

No mesmo modelo utilizando de perfusão renal ex-vivo, alginatos isolados da alga *Sargassum vulgare* *Caulerpa Agardh* elevaram a pressão de perfusão e a resistência vascular renal, além de aumentar os transportes tubulares renais de sódio e de cloreto, atuando assim de modo diferente da fração LP de *C. procera*. Tal alga também possui uma toxicidade considerável aos túbulos renais. Por isso comparo esses alginatos com a fração LP. Para tais efeitos foi sugerido que a ação dos alginatos desta alga estava relacionada com efeitos vasculares diretos, dada a sua resposta pressórica em vasos de artéria mesentérica (SOUSA *et. al.*, 2008). Esta explicação é plausível devido a mecanismos similares nestes tecidos. Nos experimentos com LP não houve resposta quando exposta ao sistema de perfusão com ramo de artéria mesentérica, mesmo em concentrações superiores à que causa toxicidade tubular renal exacerbada (300 µg/ml).

Um Polissacarídeo sulfatado denominado Cc-SP2 isolado da alga verde *Caulerpa cupressoides* indicou efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios (assim como na literatura encontram-se esses mesmos efeitos no látex de *C. procera*) pode ter aplicação biomédica como um novo instrumento natural na analgesia e em condições inflamatórias agudas (RODRIGUES *et. al.*, 2012).

Algas marinhas são abundantes fontes de polissacarídeos sulfatados com várias atividades biológicas. Consequentemente, suas biomoléculas são de grande interesse comercial. Nesse estudo que cito foi investigada a atividade potencial antinociceptiva do polissacarídeo sulfatado obtido da alga verde *Caulerpa racemosa* e o envolvimento da via hemoxigenase-1 neste efeito anti-inflamatório (Ribeiro *et. al.*, 2014).

O alginato de baixa densidade oriundo de *Sargassum vulgare*, uma alga marinha parda, apresenta uma mudança típica na função renal aumentando também a pressão vascular nos capilares glomerulares, também aumentam pressão de perfusão, ritmo de filtração glomerular, fluxo urinário e diminuem o transporte tubular de sódio potássio e cloreto. De outra forma, os efeitos dos alginatos de *Sargassum vulgare* (o sargaço) de alta e o de baixa viscosidade são diferentes provavelmente pela modificação de função (SOUSA *et.al.*, 2008). Sendo alguns desses parâmetros renais semelhantes nessa alga e na fração LP de *C. procera*.

Uma alga, uma cianobactéria, a *Microcystes aeruginosa*, produz uma substância microcistina-LR que induz perda de eletrólitos pelo intestino murino e também toxicidade renal. (NOBRE, *et. al.*, 2004), O caso acometeu um centro de hemodiálise em Caruaru-PE- Brasil, matando muitos dos usuários na época, início do século.

Por outro lado substâncias oriundas de plantas, algumas ditas medicinais (assim como a fração LP de *C. procera*) demonstram que o Gingerol, fração de *Zinziber officinale* o gengibre, uma planta cujo rizoma é muito usado popularmente como remédio ou até mesmo tempero. Promove um efeito nefropático na mediação pelo estresse oxidativo, processo inflamatório e disfunção renal. (RODRIGUES *et.al.*, 2014).

Outro ensaio com plantas aponta uma possível atividade anti-inflamatória da harpalicina 2 através da inibição de fosfolipases A2. Além disso, harpalicina 2 também inibiu a atividade miotóxica dessas fosfolipase A2. Essas fosfolipases A2 são neurotóxicas, secretórias e enzimáticas. Harpalicina é uma isoflavona isolada de *Harpalyce brasiliiana Benth.* E isoflavona se assemelham aos estrógenos, mas são substâncias presentes em plantas principalmente da família “Fabaceae” (XIMENES, *et. al.*, 2012).

Essa substância descrita acima também pode sofrer remodelamento molecular o denominado “docking”. E assim a harpalicina 2 modifica a estrutura de PrTXIII, a fosfolipase A2 D49. Inibindo a sua atividade enzimática. Além disso, a atividade PrTXIII agregante plaquetária foi inibida pelo tratamento com harpalicina 2, e resultados encontrados nesse ensaio citado corrobora com escores de “docking” molecular (XIMENES *et. al.*, 2012).

Esse “docking” ou remodelamento molecular também pode ser proposto mais além a uma ou outra molécula específica contida no látex de *C. procera* para que um efeito seja escolhido, de outro não desejado, ou ainda aumentando ou diminuindo sua eficácia.

Podendo alguns vegetais ter citotoxicidade e atividade antiofídica assim como foram avaliadas de um alcalóide da planta *Solanum campaniforme* da família “Solanidae”, que não mostrou nenhuma citotoxicidade, mas inibiu a ação do veneno de uma serpente: a *Bothrops pauloensis*, a jararaca ilhoa (TORRES *et. al.*, 2013). Embora a LP de *C. procera* seja proteica ela mostrou uma atividade citotóxica.

Já um peptídeo encontrado por “docking” de um veneno de serpente. O peptídeo natriurético isolado do veneno de *Crotalus durissus cascavela*, uma subespécie de cascavel o (NP2-Casca) produziu efeitos vasculares e renais reduzindo o transporte total

e proximal de sódio, principalmente aumentando a excreção de sódio demonstrando uma atividade diurética.

Um efeito hipotensivo foi exibido com aumento de nitrito e sugerindo uma possível ação vasoativa (EVANGELISTA *et. al.*, 2008). A LP de *C. procera* mostrou alguns efeitos semelhantes.

A administração de extrato alcóolico de *Calotropis procera* a ratos diabéticos na concentração de 300 a 600 mg/kg/24h não influenciou no peso dos rins, porém elevaram-se as taxas sanguíneas de uréia e de creatinina, marcadores de funcionalidade renal (SINGHAL & KUMAR, 2009). Já em coelhos, no estudo do extrato hidro alcóolico de flores de CP (10 mg/ml/animal/5 dias alternados), induziu alterações histopatológicas no coração (congestão e hemorragias subendocárdica moderada) e nos rins (hemorragia, necrose epitelial, inflamação tubular moderada). As taxas sanguíneas de uréia e de creatinina também estiveram elevadas nesta concentração. Quando administrada por via oral, mesmo por 45 dias e com concentrações entre 10 e 400 µg/ml (SINGHAL & KUMAR, 2009) não foram observadas alterações nos níveis de uréia e de creatinina, nem na histologia renal e hepática, quando o látex de CP foi administrado a ratos. Tais achados aliados a de outros autores consideraram que CP administrada parenteralmente na concentração de 10 µg/ml induz prejuízo na função renal. (EL BADWI *et.al.*, 1998)

Constataram enterohepatonefropatia, com congestão hemorragia e elevação na atividade de transaminases, uréia e creatinina após injeção intraperitoneal com látex de CP. Esta afirmação corrobora com nossos achados uma vez que LP foi administrada parenteralmente aos animais, ou disponibilizada ao meio de cultura para estudos *ex-vivo* e *in vitro*. Talvez por outra via de administração a fração LP possa ter ação diferente.

Os dados de citometria de fluxo também indicam um aumento de apoptose tardia, ou mesmo necrose, (dupla marcação) mas como observamos na histologia dos rins perfundidos com LP provavelmente a dupla marcação indica mais necrose de túbulos renais, que apoptose, embora também haja apoptose relevante.

Os ensaios farmacológicos com outras plantas latíferas frequentemente vêm corroborando para o uso tradicional de espécies de *Croton*. Grande parte dos ensaios farmacológicos trata do clerodano trans-desidrocrotonina, envolvendo uma grande diversidade de efeitos, como hipolipidêmico, hipoglicêmico, antiestrogênico e anticancerígeno. Efeitos citotóxicos também vêm sendo observados em ensaios com alcalóides (taspina) e com diterpenóides secocaurenos, labdanos e cembranóides.

Vários outros efeitos de substâncias de *Croton* têm sido relatados, incluindo anti-

hipertensivos, anti-inflamatórios, antimaláricos, antimicrobianos, antiespasmódicos, antiulcerogênicos, antivirais e mio-relaxantes (FREIRES *et. al.*, 2015).

Outras substâncias agem por outras vias e mostram alguns efeitos semelhantes aos achados nesse ensaio que apresento realizado com a LP e podem ser base para estudos posteriores.

A adiponectina é uma substância que tem ação nos adipócitos, agonista na degradação de lípidos sendo tóxica ao coração e aos túbulos renais diminuindo a pressão arterial sistêmica similar à fração LP de *Calotropis procera* (SWARBRICK *et. al.* 2007).

Enquanto a fenfluramina ou dexfenfluramina um agonista parcialmente seletivo do receptor Beta 4 atua na degradação de gordura nos adipócitos e aumenta a pressão arterial pulmonar, além de agirem em receptores histamínicos e de opióides entre outros (KURAIASHI, Y., 2013).

Na literatura a fração proteica do látex tem pelo menos uma proteína capaz de induzir citotoxicidade direcionada a células neoplásicas de carcinomas humanos, não afetando células normais. Foi ainda verificado que esta atividade induzia apoptose e que a atividade da enzima topoisomerase I sobre o DNA é drasticamente reduzida na presença das proteínas laticíferas (OLIVEIRA *et. al.*, 2007).

Desde a década de 1960, que os cardenólídeos são conhecidos como um dos principais responsáveis pela morte em animais, quando por ingestão se atinge alta concentração no organismo de mamíferos. Para a bioprospecção alguns destes sofreram modificação em sua estrutura química com o intuito de reduzir seu efeito tóxico, ao mesmo tempo em que, se preservou o efeito fisiológico tolerável. Mediante a sugestão do efeito hipotensor e de diminuição do volume de urina e, portanto de excreção de eletrólitos pela diminuição do ritmo de filtração glomerular podendo apontar danos tubulares renais.

Efeitos tóxicos são efeitos adversos, por outro lado podem ser um primeiro passo para o desenvolvimento de fármacos como é o caso do captopril e quimioterápicos para o câncer, para controle de pragas e de antibióticos e de antivirais. Para conhecimento alvos/efeitos específicos, moléculas podem ser isoladas a partir das frações proteicas e conhecidas as estruturas químicas dos compostos isolados. O conhecimento da molécula ativa, ou moléculas sinérgicas possibilitam modificação estrutural, a exemplo de ou ainda apenas misturando moléculas dependendo de seus efeitos para determinados tratamentos.

Os autores (YAMAZAKI *et. al.*, 2003) demonstraram que componentes do veneno de *Crotalus* (gênero que define as cascavéis) afetam o sistema vascular com efeito hipotensor. Em 2005 (EVANGELISTA *et. al.*, 2011) identificaram um novo peptídeo inibidor da bradicinina a partir do veneno da jararaca. Os venenos de animais englobam numerosas famílias de polipeptídeos, que divergem entre si quanto à sequência primária, arquitetura estrutural, especificidade, toxicidade e alvo celular. Um dos mecanismos propostos para a redução da pressão arterial sistêmica e que ocasiona lesão renal é através do agonismo com a fosfolipase A2 (EVANGELISTA. *et. al.*, 2010).

Assim, representam uma fonte atraente de moléculas naturais de interesse para o desenvolvimento de novos biofármacos. Plantas como a *Calotropis procera* possuem constituintes farmacologicamente ativos isolados de seu látex tais como, calotropina, calotoxina, glicosídeos cardíacos e uscarina. (CHAVAN BHAGYASHRI, 2015)

A citotoxicidade encontrada a partir do látex da CP corroborou com a investigação dos efeitos desta fração proteica sobre o sistema renal. Ainda não constatados, na literatura em modelos animais.

A protease de fase dois, isolada a partir do látex de *C. procera* em sistema aquoso de duas fases, com 0% PEG-20% (NH₄)₂SO₄, possui perda de 50% de sua atividade quando adicionado mais que 2% (p/p) de NaCl.

Baseada em sua atividade proteolítica (RAWDKUEN *et. al.*, 2011) e de ensaios enzimáticos na degradação de carnes e de peixe, propuseram que o látex de CP poderia ser utilizado como agente na tecnologia de alimentos. Proteases derivadas de plantas, a exemplo da papaína, bromelaína e ficina, têm sido usadas por suas propriedades proteolíticas como amaciantes de carnes.

O látex liofilizado possui ação antioxidante e anti-diabetogênica, comparada a fármacos como a glibenclamida (KUMAR & PADHY, 2011).

Em ratos demonstrou hepatotoxicidade e cardiotoxicidade após administração oral (de LIMA *et. al.*, 2011).

A origem do desenvolvimento das drogas sintéticas teve seu início na revolução industrial. A descoberta de compostos sintéticos potencialmente mais ativos que os naturais e o crescimento da indústria farmacêutica, reforçaram a preferência por estes novos produtos em comparação com os de origem mineral, vegetal ou de fontes animais. Entretanto, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, uma quantidade significativa destas drogas sintéticas, é obtida a partir de precursores naturais, porém apenas uma

pequena parte do total produzido é estritamente de origem vegetal (MOUHSEN LAHLOU, 2013).

Outros produtos naturais podem ser usados na diminuição da diarreia induzida em murinos por metotrexato um fármaco anticancerígeno como é o caso da planta *Camelia sinensis* (ALMEIDA, *et. al.*, 2014) assim como também peptídeos como a alanil-glutamina diminui a diarreia em murinos induzida por 5-Fluorouracil, um fármaco usado no tratamento do câncer (BRAGA – NETO, *et. al.*, 2008).

Uma das maiores limitações para o uso efetivo de moléculas oriundas de fluidos laticíferos como agentes biotecnológicos voltados à saúde está relacionada a possíveis aspectos toxicológicos que embora esperados para ação sobre o sistema cardiovascular podem ser redirecionados com a realização de purificação e isolamento de compostos bioativos da fração estudada. Entretanto a investigação do efeito hipotensor inicial encontrado pode ser explicada parcialmente pelas alterações renais tóxicas teciduais e de parâmetros fisiológicos e bioquímicos.

Entretanto, para consolidação do mecanismo hipotensor observado, serão necessárias investigações posteriores utilizando outros modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

Em outras palavras LP causa nefrotoxicidade e citotoxicidade de células tubulares renais

Perspectivas: Pode ter ocorrido algum efeito cardíaco não percebido no ensaio feito, juntamente com alteração eletrolítica e a consequente hipotensão em ratos, principalmente por alterações no sistema renal, causando dessa maneira, um efeito sistêmico sobre a pressão arterial. Podem ser feitas mais além um trabalho de proliferação celular, além de testar outras vias de administração do látex e principalmente da fração proteica LP de *Calotropis procera*.

6. Conclusões.

A fração proteica do látex de *Calotropis procera* possui efeito hipotensor sem alteração da frequência cardíaca. Não houve evidência deste efeito em modelo de vaso de resistência.

A fração LP de *Calotropis procera* mostrou-se tóxica de maneira concentração dependente com lesão tubular renal, o que possivelmente deve ter causado a diminuição do ritmo de filtração glomerular e alteração da reabsorção tubular levando à perda de eletrólitos na urina.

Referências.

- AGRAWAL, A.A. & FISHBEIN, M. Phylogenetic escalation and decline of plant defense strategies. **Proc Natl Acad Sci.** v.105 (29) pp.10057-10060, 2008.
- Ahmed KK, Rana AC, Dixit VK. Effect of *Calotropis procera* latex on isoproterenol induced myocardial infarction in albino rats. **Phytomedicine.** v. 11(4), pp.327-30, 2004.
- ALENCAR, N.M.N.; FIGUEREDO, I.S.T.; VALE, M.R.; BITTENCOURT, F.S.; OLIVEIRA, J.S.; RIBEIRO, R.A.; RAMOS, M.V. Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in three different experimental models: Peritonitis, Paw edema and Hemorrhagic cystitis. **Planta Medica.** v. 70(12), pp.1144-1149, 2004.
- ALENCAR, N.M.N., OLIVEIRA, J.S., MESQUITA, R.O., LIMA, M.W., VALE, M.R., ETCHHELLS, J.P., FREITAS, C.D.T., RAMOS M.V. Pro- and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflammation Research.** v. 55 (12), pp. 559-564, 2006.
- ALI, N.A.A.; JÜLICH, W.D.; KUSNICK, C.; LINDEQUIST, U. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 74(2), pp.173-179, 2001.
- ALMEIDA, S. B. de; MONTEIRO, M. C. S. A.; LIMA, A. V. P. ; MENEZES, D. B. ; NUNES, S. M. . Protective Effect of *Camellia sinensis* on Methotrexate-Induced Small Intestinal Mucositis in Mice. **Food and Nutrition Sciences.** v. 05, pp. 443-448, 2014.
- AL-MEZAINI, H.S., AL-AMRY, M.A., AL-ASSIRI, A., FADEL, T.S., TABBARA, K.F., AL-RAJHI, A.A. Corneal endothelial cytotoxicity of the *Calotropis procera* (ushaar) plant. **Cornea.**v.27(4), pp. 504-506, 2008.
- ARCHER, B. Alkaline protease inhibitor from *Hevea brasiliensis* latex. **Phytochemistry.** v.23, pp.633-639, 1983.
- BAKER, C. C.; CHUDRY, I. H.; GAINES, H. O.; BAUE, A. E. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. **Surgery.** v.94(2), pp.331-335, 1983.
- BEZERRA, G.A.; VIERTLMAYR R.; MOURA T.R.; DELATORRE, P.; ROCHA B.A.; DO NASCIMENTO, K.S.; FIGUEIREDO, J.G.; BEZERRA, I.G.; TEIXEIRA, C.S.; SIMÕES R.C.; NAGANO, C.S.; DE ALENCAR, N.M.; GRUBER, K.; CAVADA, B.S. Structural studies of an anti-inflammatory lectin from *Canavalia boliviana* seeds in complex with dimannosides. **PLoS One.** v9(5), 2014.
- BOERSMA, H.H.; KIETSELAER, B.L.M.; BENNAGHMOUCH, A.; HOFSTRA, L. NARULA, J.; HEIDENDAL, G.A.; REUTELINGSPERGER, C. P. Past, present, and future of annexin 5: From protein discovery to clinical applications. **J. Nucl. Med.**, v 46(12), pp. 2035-2050, 2005.
- BOWMAN, R.H. & MAACK, T. Effect of albumin concentration and ADH on H₂O and electrolyte transport in perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.** v 226(2), pp.426-430, 1974.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v.72, pp. 248-254, 1976.

BRAGA NETO, MANOEL BONFIM ; MONTEIRO, M. C. S. A. ; BRITO, G.A.C. ; GUERRANT, R.L. ; ORIÁ, R.B. ; LIMA, ALDO ÂNGELO MOREIRA ; MACIEL, A.A.L. ; MACIEL, A.A.S. . Alanyl-Glutamine and Glutamine Supplementation Improves 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Epithelium Damage In Vitro. **Digestive Diseases and Sciences** , v. 53, p. 2687-2696, 2008.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 3º edição comemorativa ao II Congresso Brasileiro de florestas tropicais. Mossoró 18/24 julho 1976. **Coleção Mossoroense.** - Volume XLII - 3º edição, 1982.

BRITO, T. S. Vasodilatação Causada Pelo 1-Nitro-2-Feniletano Em Aorta DE RATOS: PROVÁVEL ESTIMULAÇÃO DA GUANILATO CICLASE. **Tese de Mestrado** Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-CE, 2012.

BUTLER, M. & DAWSON, M. (Ed.). Cell Culture. **Oxford: Blackwell**, 1992.

de CARVALHO N. B. V, MATIAS EF, de LIMA WP, da COSTA P. A, COUTINHO HD, de MENEZES IR. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. **J Ethnopharmacol.** v 172, pp. 265-72, 2015.

CATIC, A.; DIETRICH, G.; GENTSCHEV, I; GOEBEL, W.; KAUFMANN, S.H.; HESS, J. Introduction of protein or DNA delivered via recombinant *Salmonella typhimurium* into the major histocompatibility complex class I presentation pathway of macrophages. **Microbes Infect.** v.1(2), pp.113-21, 1999.

CAVAILLON, J.M. & ANNANE, D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. **J Endotoxin Res.** v.12(3), pp.151-70, 2006.

CHAIM, O.M. Estudo da atividade citotóxica da proteína dermacrótica do veneno da aranha marrom (*Loxocles intermedia*) com ênfase no efeito nefrotóxico. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 109 páginas, 2005.

CHAO, C.C.; HU, S.; SHENG, W.S.; BU, D.F.; BUKRINSKY, M.I.; PETERSON, P.K. Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. **Glia.** v16(3), pp. 276-284, 1996.

CHAVAN BHAGYASHRI A., HUNDIWALE JOGENDRA C.; PATIL AVINASH V. Plant Latex: An Inherent *Spring Of Pharmaceuticals Review article.* **WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES.** v 4(4), pp. 1781-1796, 2015.

CHEYE, M.L., CHEUNG, K.Y. Beta-1,3-Glucanase is highly-expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis*. **Plant Mol. Biol.** v.29(2), pp.397-402, 1995.

CHITME, H.R., CHANDRA, R., KAUSHIK, S. Studies on anti-diarrheal activity of *Calotropis gigantea* R. Br. In experimental animals. **J. Pharm. Pharmaceutics Sci.** v.25(7), pp.70-75, 2004.

CHOEDON, T., MATHAN, G., ARYA, S., KUMAR V.L., KUMAR, L. Anticancer and cytotoxic properties of the latex of *Calotropis procera* in a transgenic mouse of hepatocellular carcinoma. **World J. Gastroenterology**. v.12(16), pp.2517-2522, 2006.

Cotrim CA, de Oliveira SC, Diniz Filho EB, Fonseca FV, Baldissera L Jr, Antunes E, Ximenes RM, Monteiro HS, Rabello MM, Hernandez MZ, de Oliveira Toyama D, Toyama MH. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2. **Chem Biol Interact**. v 189(1-2), pp 9-16, 2011.

DEWAN, S., SANGRAULA, H., KUMAR, V.L. Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacology**, v73, (1-2), pp.307-311, 2000.

Diretrizes Brasileiras De Hipertensão VI **Jornal Brasileiro de Nefrologia** Volume 32, Suplemento 1. Capítulo 6 páginas (S29-S43). 2010.

Dreisbach, Albert. Epidemiology of Hypertension: Overview, National Estimates of Hypertension, **Worldwide Estimates of Hypertension**, 2014.

EL BADWI, SAMIA, M.A.B., ADAM, S.E.I., SHIGIDI, M.T., HAPKE, H.J. Studies on laticiferous plants: toxic effects in goats of *Calotropis procera* latex given by different routes of administration. **Dtsch. Tieraztl. Wochenschr**. v.5(11), pp.425-427, 1998.

EVANGELISTA JS, MARTINS AM, NASCIMENTO NR, SOUSA CM, ALVES RS, TOYAMA DO, TOYAMA MH, EVANGELISTA JJ, MENEZES DB, FONTELES MC, MORAES ME, MONTEIRO HS. Renal and vascular effects of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**. v. 52(7) pp. 737-44, 2008.

EVANGELISTA, I.L., MARTINS A.M.C., NASCIMENTO N.R.F., HAVT, A., EVANGELISTA, J.S. A.M., NORÕES, T.B.S., TOYAMA, H.M., DINIZ –FILHO, E., TOYAMA, D.O., FONTELES M.C., Monteiro, H.S.A. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A2. **Toxicon** v.55, pp.1061–1070. 2010.

Evangelista JS, Evangelista JJ, Evangelista IL, Nojosa DM, Nascimento NR, Souza MH, Alves RS, Martins AM, Moraes ME, Monteiro HS. Hypotensive effects of the *Crotalus durissus cascavella* venom: involvement of NO. **Nat Prod Commun**. v. 6(6), pp.871-4, 2011.

FABRICANTE, J.R, OLIVEIRA, M.N.A.; SIQUEIRA FILHO, J.A. Aspects of the ecology of *Calotropis procera* (*Apocynaceae*) in an area of dry forest altered by works of the Integration Project of the San Francisco River in Mauriti, CE. **Rodriguésia**, v.64(3), pp. 647-654, 2013.

FERREIRA, SH. Aspectos Históricos da Hipertensão do Fator de Potenciação da Bradicininina (BPF) Aos Inibidores da ECA. **HiperAtivo**. v.5(1), pp 6-8, 1998.

FIDAN, I.; YESILYURT, E.; GURELIK, F. C.; ERDAL, B.; IMIR, T. Effects of recombinant interferon-g on cytokine secretion from monocyte-derived macrophages infected with *Salmonella typhi*. **Comparat Immunol Microbiol Infect Dis**. v. 31(6), pp. 467-475, 2008.

FIGUEIREDO, I.S.T.; RAMOS, M.V.; PONTES, N.M.; GONZAGA, M.L.C.; PINHEIRO, R.S.P.; ALENCAR, N.M.N. Efficacy of a membrane composed of polyvinyl alcohol as a vehicle for releasing of wound healing proteins belonging to latex of *Calotropis procera*. **Process Biochemistry** v. 49(3) pp. 512–519, 2014.

FONTELES, M.C. Efeito do ácido 2-tetradecilglicídico no rim isolado; Papel dos lipídeos endógenos no transporte de sódio e função renal. Tese (Docência) UFC. Centro de Ciências da Saúde. 1980.

FONTELES, M.C. & MOREIRA LIMA, A.A. Funcional comparison of kidney perfused of fatty acid-free and rich albumin. **Braz. Med. Biol. Res.** v. 15(4), pp. 295- 296, 1982.

FONTELES, M.C. & LEIBACH, F.H. Glucose formation from glutathione in the isolated perfused rat kidney. **Arch.Int. Physiol.Biochem.** v. 90, pp.159-161, 1982.

FREITAS, CLEVERSON DINIZ TEIXEIRA de. Proteínas do Látex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. e Seus Efeitos Sobre Pragas Agrícolas. **Dissertação de Mestrado**. páginas 118, 2006.

FREIRES IA, DENNY C., BENSO B. DE ALENCAR SM, ROSALEN PL. Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review. **Molecules**. v. 20(4), pp.7329-58, 2015.

FREITAS C.D., OLIVEIRA J.S., MIRANDA M.R., MACEDO N.M., SALES M.P., VILLAS-BOAS L. A., RAMOS M.V. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.45, (10-11), pp. 781-789, 2007.

FRESHNEY, I. R. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, **6th Edition**. **Wiley-Blackwell**. 796 pages, ©2010.

FURCHGOTT RF, & ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. v. 288(5789), pp.373-6, 1980.

GALLEGOS-OLEA, R.S.; OLIVEIRA, A.V.; SILVEIRA, L.M.; SILVEIRA, E.R. Organic carbonate from *Calotropis procera* leaves. **Fitoterapia**, v.73(3), pp.263-265, 2002.

GENTILE, M. T.; VECCHIONE, C.; MARINO, G.; ARETINI, A.; PARDO, A. DI; ANTENUCCI, G.; MAFFEI, A.; CIFELLI, G.; IORIO, L.; LANDOLFI, A.; FRATI, G. & LEMBO, G.. Resistin Impairs Insulin-Evoked Vasodilation. **DIABETES**. v. 57, pp. 577-583, 2008.

GIORDANI R, SIEPAIO M, MOULIN-TRAFFORT J, RÉGLI P. Antifungal action of *Carica papaya* latex: isolation of fungal cell wall hydrolysing enzymes. **Mycoses**. v. 34(11-12).pp 469-77. 1991.

GIORDANI R, CARDENAS ML, MOULIN-TRAFFORT J, RÉGLI P. Fungicidal activity of látex sap from *Carica papaya* and antifungal effect of D(+)-glucosamine on *Candida albicans* growth. **Mycoses**. v. 39(3-4), pp. 103-110, 1996.

GIORDANI R, GACHON C, MOULIN-TRAFFORT J, RÉGLI P. A synergistic effect of *Carica papaya* látex sap and fluconazole on *Candida albicans* growth. **Mycoses**. v. 40 (11-12), pp. 429-37, 1997.

HAMILTON, R.L. *et. al.* A simple and inexpensive membrane "lung" for small organ perfusion. **J. Lipid. Res.** v 15, pp. 182- 186, 1974.

HANSEN, M. B., NIELSEN, S. E. BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. . **J Immunol Methods**. v.119, pp. 203-210, 1989.

Hellermann J, Salomon F. [Appetite depressants and pulmonary hypertension]. **Ther Umsch**. v.55 (9), pp. 548-50, 1998.

HESS, J.; KAUFMANN, S.H. *Salmonella enterica* infection. **Res Immunol**. v. 147 (8-9), pp.581-586, 1996.

HIDAYATULLAH KHAN, M. SUBHAN, SULTAN MEHMOOD, M. FARAN DURRANI, SAIRA ABBAS AND SANAULLAH KHAN. Purification and Characterization of Serine Protease from Seeds of *Holarrhena antidysenterica*. **Biotechnology**. v. 7(10), pp. 94-99, 2008.

HUQ, M.M. ; JABBAR, A.; RASHID, M.A.; HASAN, C.M.; ITO, C.; FURUKAWA, H. Steroids from the roots of *nerium oleander*. **J. Nat. Prod**. v. 62, pp.1065-1067, 1999.

JACINTO, S.D.; CHUN, E.A.C.; MONTUNO, A.S., SHEN, C.C. DINAH L. ESPINELI; D.L.; RAGASA, C.Y. Cytotoxic Cardenolide and Sterols from *Calotropis gigantean*. **Natural Product Communications**. v. 6(6), pp. 803-806, 2011.

JACQUET, A. , KLEINSCHMIDT, T., SCHNEK, A. G., LOOZE, Y., BRAUNITZER, G. The thiol proteinases from the latex of *Carica papaya* L. III- The primary structure of chymopapain. **Biol. Chem. Hoppe seyler**. v. 370 (5), pp. 425-434, 1989.

JEKEL, P.A., HARTMANN, B.H., BEINTEMA, J.J. The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. **Eur. J. Biochem** v. 200 (1), pp. 123-130, 1991.

Jia ,Ping; Teng Jie; Liang Mingyu; Zou Jianzhou; Ding,Xiaoqiang; Fang, Yi; Jiang, Suhua; Yu, Xiaofang ; Kriegel, Alison J.. Intermittent Exposure to Xenon Protects against Gentamicin-Induced Nephrotoxicity. **Xenon Protects against Drug Nephrotoxicity**. Volume 8 Issue 5 e64329.10pp.2013.

JOHN, B., RAJAGOPAL, D., PASHINE, A., RATH, S., GEORGE, A., BAL, V. Role of IL-12-independent and IL-12-dependent pathways in regulating generation of the IFN-gamma component of T cell responses to *Salmonella typhimurium*. **J. Immunol**, v. 169(5), pp. 2545-2552, 2002.

JONES, BD. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. **Annu. Rev. Immun.** v.14, pp. 533-561. 1996

JUNCKER, T.; SCHUMACHER, M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. UNBS1450 from *Calotropis procera* as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death. **Biochemical Pharmacology**. v. 78(1), pp. 1-10, 2009.

KAMATH, J.V., RANA, A.C. Preliminary study on antifertility activity of *Calotropis procera* roots in female rats. **Fitoterapia**. v. 73, pp. 111-115, 2002.

Khalisov MM, Ankudinov AV, Penniyaynen VA, Dobrota D, Krylov BV. Application of atomic force microscopy for investigation of Na (+), K (+) - ATPase signal - transducing function. **Acta Physiol Hung**. V. 102 (2), pp. 125-130, 2015.

KHAN, A.Q., MALIK, A. A steroid from *Calotropis procera*. **Phytochemistry** v. 28, pp 2859-2861, 1989.

KISSMANN, K.G. and GHOTH, D. **Plantas Infestantes e Nocivas**. Tomo II. Editora BASF - São Paulo, 1992.

KONNO, K., HIRAYAMA, C., NAKAMURA, M., TATEISHI, K., TAMURA, Y., HATTORI, M., KOHNO, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant J**. v. 37, pp. 370–378, 2004.

Körber, W.; Meisterernst, E.B.; Hermann, G. Quantitative measurement of adenosine deaminase from human erythrocytes. **Clin Chim Acta**. v. 6 (.3), pp.323-33, 1975.

Kumar, Jitendra. Review Article, Epidemiology of hypertension Clinical Queries: Nephrology. v. 2(2), pp. 56–61, 2013.

KUMAR, S., DEWAN, S., SANGRAULA, H., KUMAR, V.L. Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. **J Ethnopharmacology**. v. 76, pp. 115-118, 2001.

KUMAR, V.L. & SHIVKAR. In vivo and in vitro effect of the latex of *Calotropis procera* on gastrointestinal smooth muscles. **J. Ethnopharm**. v. 93, pp. 377-379, 2004.

KUMAR, V.L. & ROY, S. Protective effect of latex of *Calotropis procera* in Freund's Complete Adjuvant induced monoarthritis. **Phytother Res**. v.23(1), pp.1-5, 2009.

Kumar VL, Chaudhary P, Ramos MV, Mohan M, Matos MP. Protective effect of proteins derived from the latex of *Calotropis procera* against inflammatory hyperalgesia in monoarthritic rats. **Phytother Res**. v. 25(9), pp. 1336-41, 2011.

Kumar VL, & Padhy BM. Protective effect of aqueous suspension of dried látex of *Calotropis procera* against oxidative stress and renal damage in diabetic rats. **Biocell**. v. 35 (3), pp.63-9, 2011.

Kuraishi, Y. Potential New Therapeutic Targets for Pathological Pruritus. **Biol. Pharm. Bull**. v. 36(8), pp. 1228–1234, 2013.

LARHSINI, M., BOUSAID, M., LAZREK, H.B., JANA, M., AMAROUCH, H. Evaluation of antifungal and molluscicidal properties of extracts of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**. v. 68(4), pp. 371-373, 1997.

LARHSINI, M., MARKOUK, M., JAOUHARI, J.T., BEKKOUCHE, K., LAZREK, H. B., JANA, M. The antipyretic activity of some Moroccan medicinal plants. **Phytotherapy Research**, v. 16, pp. S97-S98, 2002.

LARHSINI, M., OUMOULID, L., LAZREK, H. B., WATALEB, S., BOUSID, M., BEKKOUCHE, K., JANA, M. Antibacterial activity of some Moroccan Medicinal plants. **Phytotherapy Research**. v. 15(3), pp. 250-252, 2001.

LAW MR., MORRIS JK, WALD NJ. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: Meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. **BMJ**. 338b1665. 2009.

de LIMA, D. C.; ABREU, P. A.; de FREITAS, C. C.; SANTOS, T. C.; CABRAL, L. M.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Snake venom: Any clue for antibiotics and CAM. **eCAM**. v. 2(1), pp. 39-47, 2005.

de Lima JM, de Freitas FJ, Amorim RN, Câmara AC, Batista JS, Soto-Blanco B. Clinical and pathological effects of *Calotropis procera* exposure in sheep and rats. **Toxicon**. v. 57(1), pp. 183-5, 2011.

LYNN, K. R., CLEVETTE-RADFORD, N. A. Acid phosphatases from latices of Euphorbiaceae. **Phytochemistry**. v. 26, pp. 655-657, 1987.

LYNN, K. R., CLEVETTE-RADFORD, N. A. Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae. **Phytochemistry**. v. 26, pp. 939-944, 1987.

LYNN, K. R., CLEVETTE-RADFORD, N. A. Hevamins: serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**. v. 25, pp. 2279-2282, 1986.

LYNN, K. R., CLEVETTE-RADFORD, N. A. Two proteases from the latex of *Elaeophorbium drupifera*. **Phytochemistry**. v. 24(12), pp. 2843-2845, 1985.

LUZ, P. B.; PINHEIRO, R. S. P.; FREITAS, L. B. N.; BITENCOURT, F. S.; ARAGÃO, K. S.; CARMO, L. D.; COUTO, T. S.; RAMOS, M. V. & DE ALENCAR, N. M. N. Antihyperalgesic effect of latex proteins from *Calotropis procera*: Involvement of inflammatory mediators. **THE FASEB JOURNAL**. v. 27, pp. 1168, 2013.

MAGALHÃES, M.; OLIVEIRA, P. A., G.; FERREIRA, L. M.; RITTI-DIAS, T. C.; DESTRO, D. G.; MENDES, R. Prevalence of high blood pressure in Brazilian adolescents and quality of the employed methodological procedures: systematic review. **Rev Bras Epidemiol**; v. 16(4), pp. 849-59, 2013.

MARTINEZ-MALDONADO, MANUEL. Renal Pharmacology **Springer**. 1ª edição, 1978.

MARTINS, A. M. C.; SOUSA, F. C. M.; BARBOSA, P. S. F. *et al.* Action of anti-thrombotic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. **Toxicon**. v. 46, pp. 595-599, 2005.

MCKEE, R. A., SMITH, H. Purification of proteases from *Carica papaya*. **Phytochemistry**. v. 25(10), pp. 2283-2287, 1986.

MAJUMDER, P. K. & KUMAR, V. L. Anti-inflammatory activity of fractions of latex of *Calotropis procera* in carrageenan induced rat paw oedema. **Phytotherapy Research**. v. 11, pp. 166-167, 1997.

- MANCIA G, FAGARD R, NARKIEWICZ K, REDON J, ZANCHETTI A, BÖHM M, *et al.* 2013 ESH/ESC guidelines for the Management of Arterial Hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **Eur Heart J.** v. 34(28), pp. 2159-219, 2013.
- MANJERI A. VENKATACHALAM, DAVID B. BERNARD, JOHN F. DONOHOE, and NORMAN G. LEVINSKY. Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: Differences among the S1, S2, and S3. **segments Kidney International.** v. 14, pp. 31-49. 1978.
- MARKOUK, M., BEKKOUCHE, K., LARSHINI, M., BOUSAID, M., LAZREK, H.B., JANA, M. Evaluation of some Moroccan medicinal plant extracts for larvicidal activity. **J. Ethnopharmacology.** v. 73, pp. 293-297, 2000.
- MASTROENI, P., HARRISON, J. A., CHABALGOITY, J. A., HORMAECHE, C. E. Effect of Interleukin 12 Neutralization on Host Resistance and Gamma Interferon Production in Mouse Typhoid. **Infection Immun.** v. 64(1), pp. 189-196, 1996.
- MASTROENI, P. AND MÉNAGER, N. Development of acquired immunity to *Salmonella*. **J Med Microbiol.** v. 52(6), pp. 453-459, 2003.
- MEKKRIENGKRAI, D., UTLE, K., SWIEZEWSKA, E., CHOJNACKI, T., TANAKA, Y. and SAKDAPIPANISH, J.T. Structural characterization of rubber from jackfruit and *Euphorbia* as a model of natural rubber. **Biomacromol.** v. 5, pp. 2013-2019, 2004.
- MIRAGOLI M, NOVAK P, RUENRAROENGSAK P, SHEVCHUK AI, KORCHEV YE, LAB MJ, TETLEY TD, GORELIK J. Functional interaction between charged nanoparticles and cardiac tissue: a new paradigm for cardiac arrhythmia? **Nanomedicine (Lond).** v. 8(5), pp 725-37, 2013.
- MOSSMAN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods.** v. 65(1-2), pp. 55-63, 1983.
- MONTEIRO, H. S.A. EFEITOS NEFROTÓXICOS DO VENENO DE *Bothrops jararaca* E ESTUDO DA AÇÃO DE ANTAGONISTAS DO PAF E DA CICLOXIGENASE NO RIM PERFUNDIDO DE RATO. **Tese de Doutorado.** UNICAMP- Campinas- São Paulo. 1990.
- MONTI, R.; CONTIERO, J and GOULART, A.J. Isolation of natural inhibitors of papain obtained from *Carica papaya* Latex. **Brazilian Archives of biology and technology.** v. 47, pp. 747-754, 2004.
- MORCELLE, S.R., CAFFINI, N.O., PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex. **Fitoterapia.** v. 75(5), pp. 480-493, 2004.
- MOREIRA LIMA, A.A. Estudos das toxinas da cólera e *E. coli* no rim isolado de mamífero. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, 1983.
- MOUHSEN LAHLOU. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy.** v. 4, pp. 17-31, 2013.

- MOURS Y L.E. Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flesh fly, *Sarcophaga hemorrhoidalis fallen*. **J. Egypt Soc. Parasitol.** v. 27(2), pp. 505-514, 1997.
- MOUSSAOUI, A., EL NIJS, M., PAUL, C., WINTJENS, R., VINCENELLI, J., AZARKAN, M., LOOZE, Y. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defense mechanism. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 58(4), pp. 556–570, 2001.
- Moustafa AM, Ahmed SH, Nabil ZI, Hussein AA, Omran MA. Extraction and phytochemical investigation of *Calotropis procera*: effect of plant extracts on the activity of diverse muscles. **Pharm Biol.** v. 48(10), pp.1080-190, 2010.
- Murti, C. R. Krishna. Properties and partial purification of a bacteriolytic enzyme from the latex of *Calotropis procera*. *Jour Sci And Indust Res*: pp.109-112, 1961.
- NAUCIEL, C. Role of CD4+ T cells and T-independent mechanisms in acquired resistance to *Salmonella typhimurium* infection. **J Immunol.** v. 145(4), pp. 1265-9, 1990.
- NENAAH G. Antimicrobial activity of *Calotropis procera Ait.*(Asclepiadaceae) and isolation of four flavonoid glycosides as the active constituents. **World J Microbiol Biotechnol.** v. 7, pp. 1255-62, 2013.
- NETO, M. C.L.; DE VASCONCELOS, C. F.B.; THIJANA, V. N.; CALDASA, G. F.R.; ARAÚJO, A. V. ; COSTA-SILVA , J. H. ; AMORIM, E. L.C.; FERREIRA, F.; de OLIVEIRA, A. F.M.; WANDERLEY. A.G. Evaluation of antihyperglycaemic activity of *Calotropis procera* leaves extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Rev Bras Farmacogn** v. 23, pp. 913-919, 2013.
- NOBRE, A. C. L.; NUNES-MONTEIRO, S. M. ; MONTEIRO, M. C. S. A. ; MARTINS, A. M. C.; HAVT, A. ; BARBOSA, P. S. ; LIMA, A. A. M. ; MONTEIRO, H. S. A . Microcystin-LR promotes intestinal secretion of water and electrolytes in rats. **Toxicon (Oxford).** v. 44(5), pp. 555-559, 2004.
- OLEA, R.S.G, OLIVEIRA, A.V., SILVEIRA, L.M.S., SILVEIRA, E.R. Organic carbonate from *Calotropis procera* leaves. **Fitoterapia**, v. 73(3), pp. 263-265, 2002.
- de OLIVEIRA, J SOARES.; PEREIRA, B.D.; FREITAS C.D.T.; MARINHO FILHO, J. MORAES, M.O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; RAMOS, M.V. In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera (Ait.) R. Br.* **Toxicology in vitro.** v. 21(8), pp. 1563-1573, 2007.
- PEREIRA, L. S.; GOMES, M. V.; FERNANDES, K.V.S.; SALES, M.P. AND XAVIER-FILHO, J. Insecticidal and antifungic proteins of the latex from *Manihot glaziovii* Muell. *Arg. Rev. Bras. Bot.* v 22(1), pp. 27-30, 1999.
- PICKARD, W.F. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. **New Phytol.** v. 177(4), pp. 877-888, 2008.
- PIE, S., TRUFFA-BACHI, P., PLA, M. AND NAUCIEL, C. Th1 response in *Salmonella typhimurium*-infected mice with a high or low rate of bacterial clearance. **Infection Immun.** v. 65(11), pp. 4509-4514, 1997.

PORTILLO R. F.G. *Salmonella* intracellular proliferation: where, when and how? **Microbes Infect.** v. 3(14-15), pp. 1305-1311; 2001.

RAMOS, M.V.; BANDEIRA, G.P.; FREITAS, C.D.T.; NOGUEIRA, N.A.P.; ALENCAR, N.M.N.; SOUSA, P.A.S.; A.S.; CARVALHO, A.F.U. Latex constituents from *Calotropis procera* (R. Br.) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn.). **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 101 (5), pp. 503-510, 2006.

RAMOS M.V., FREITAS C.D.T., STANISÇUASKI F., MACEDO L.L.P, SALES M.P., SOUSA D.P, CARLINI C. R. Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *Calotropis procera*: Role of laticifer proteins in plant defense. **Plant Science.** v. 173(3), pp. 349-357, 2007.

RAMOS, M.V., AGUIAR, V.C., da SILVA XAVIER A.A., LIMA, M.W., BANDEIRA, G.P., ETCHELLES, J.P., NOGUEIRA, N.A., ALENCAR, N.M.N. Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested upon in vitro enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material. **Fitoterapia.** v. 77 (4), pp. 251-256, 2006.

Ramos MV, Pereira DA, Souza DP, Araújo ES, Freitas CD, Cavalheiro MG, Matos MP, Carvalho AF. Potential of laticifer fluids for inhibiting *Aedes aegypti* larval development: evidence for the involvement of proteolytic activity. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 104(6), pp. 805-12, 2009.

RAMOS MV, OLIVEIRA JS, FIGUEIREDO JG, FIGUEIREDO IS, KUMAR VL, BITENCOURT FS, CUNHA FQ, OLIVEIRA RS, BOMFIM LR, VITOR LIMA-FILHO J, ALENCAR NM. Involvement of NO in the inhibitory effect of *Calotropis procera* latex protein fractions on leukocyte rolling, adhesion and infiltration in rat peritonitis model. **J Ethnopharmacol** . v. 125(3), pp. 387-92, 2009.

RAMOS M.V.; SILVA, C.A.; FREITAS, C.D.T...; FIGUEIREDO, I.S.; OLIVEIRA, R.S.; ALENCAR, N.M.; LIMA-FILHO, J.V.; KUMAR, V.L. Proteins derived from latex of *C. procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** v.385 (5), pp. 455-463, 2012.

RASIK, A.M.; RAGHUBIR, R., GUPTA, A., SHUKLA, A., DUBEY, M.P., SRIVASTAVA, S., JAIN, H.K., KULSHRESTHA, D.K. Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. **J. Ethnopharmacol.** v. 68(1-3), pp. 261-266, 1999.

RAWDKUEN, S., PINTATHONG, P., CHAIWUT, P., BENJAKUL, S. The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two-phase systems and its hydrolytic pattern on muscle proteins. **food and bioproducts processing.** v. 89, pp.73-80, 2011.

REINHARD MK, HOTTENDORF GH, POWELL ED. Differences in the sensitivity of Fischer and Sprague-Dawley rats to aminoglycoside nephrotoxicity. **Toxicol Pathol.** v. 19 (1), pp. 66–71, 1991.

REMICK, D. G.; NEWCOMB, D. E.; GERALD, L. B.; CALL D. R. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs cecal ligation and puncture. **Shock** v. 13(2), pp. 110-116, 2000.

Ribeiro-Filho HV, Brito TS, Lima FJ, Pinho JP, Sousa DF, Silva MT, de Siqueira RJ,

- Cosker F, Bastos VP, Santos AA, Magalhães PJ. Talking about bioelectrical potentials using rings of the mesenteric artery without glass micropipettes. **Adv Physiol Educ.** v. 36 (4), pp. 336-44, 2012.
- Ribeiro NA, Abreu TM, Chaves HV, Bezerra MM, Monteiro HS, Jorge RJ, Benevides NM. Sulfated polysaccharides isolated from the inflammatory activities in way dependent on HO-1 pathway activation. **Inflamm Res.** v. 63(7), pp. 569-80, 2014.
- RICHTER, G., SCHWARTZ H.P., DORNER F., Turecek P.L.. Activation and inactivation of human factor X by proteases derived from *Ficus carica*. **British journal of Haematology.** v. 119(4), pp. 1042-1051, 2002.
- ROCHA, T.L., COSTA, P.H.A., MAGALHÃES, J.C.C., EVARISTO, R.G.S., VASCONCELOS, E.A.R., COUTINHO, M.V., PAES, M.S., SILVA, M.C.M., GROSSI-DE-SÁ, M.F., Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. **EMBRAPA.** Brasília – DF, 2005.
- RODRIGUES JA, VANDERLEI ES, SILVA LM, ARAÚJO IW, QUEIROZ IN, PAULA GA, ABREU TM, RIBEIRO NA, BEZERRA MM, CHAVES HV, LIMA V, JORGE RJ, MONTEIRO HS, LEITE EL, BENEVIDES NM. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. **Pharmacol Rep.** v. 64(2), pp. 282-92, 2012.
- RODRIGUES FA, PRATA MM, OLIVEIRA IC, ALVES NT, FREITAS RE, MONTEIRO HS, SILVA JA, VIEIRA PC, VIANA, D.A, LIBORIO, A.B, HAVT, A. Gingerol fraction from *Zingiber officinale* protects against gentamicin-induced nephrotoxicity. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 58 (4), pp. 1872-8, 2014.
- ROSS, B.D. The isolated perfused rat kidney. **Clin. Sci. Mol. Med.** v 55, pp 13-21, 1978.
- SEBASTIANI, G., BLAIS, V., SANCHO, V., VOGEL, S.N., STEVENSON, M.M., GROS, P., LAPOINTE, J.M., RIVEST, S., MALO, D. Host immune response to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice derived from wild strains. 2002. **Infection Immun.** v. 70(4), pp. 1997-2009.
- SEIBER, J.N., NELSON, C.J., MARK LEE, S. Cardenolides in the latex leaves of seven *Asclepias* species and *Calotropis procera*. **Phytochemistry** v. 21(9), pp. 2343-2348, 1982.
- SEN, T., BASU, A., CHAUDHURI, A.K. Studies on the possible mechanism of the gastric mucosal protection by *Calotropis procera* – involvement of 5-lipoxygenase pathway. **Fundam. Clin. Pharmacol.** v. 12 (1), pp. 82-87, 1998.
- SILVA, PENILDON. **Farmacologia.** Oitava Edição. Magalhães, L.B.N.C., pp 691, 2010.
- SINGHAL A. & KUMAR VL. Effect of aqueous suspension of dried latex of *Calotropis procera* on hepatorenal functions in rat. **J Ethnopharmacol.** v. 122(1), pp.172-174, 2009.
- SHAHI, M.; HANAFI-BOJD, A.A.; IRANSHAHI, M., VATANDOOST, H.; HANAFI-BOJD, M.Y. Larvicidal efficacy of latex and extract of *Calotropis procera* (Gentianales: Asclepiadaceae) against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). **J Vector Borne Dis.** v. 47(3), pp.185-188, 2010.

- SHARMA, M.; KISHORE, K.; GUPTA, S.K.; JOSHI, S.; ARYA, D.S. Cardioprotective potential of *Ocimum sanctum* in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Mol Cell Biochem.** v. 225 (1), pp.75-83, 2001.
- SHARMA.P; DEVI, J; SHARMA, J.D. *In vitro* hemolysis of human erythrocytes – by plant extracts with antiplasmodial activity. **J. Ethnopharmacology.** v. 74(3), pp. 239-243, 2001.
- SHARMA, P. & SHARMA, J.D. In-vitro schizonticidal screening of *Calotropis procera*. **Fitoterapia.** v. 71(1) pp. 77-79, 2000.
- SHARMA, P. & SHARMA, J.D. Evaluation of in vitro schizontocidal activity of plant parts of *Calotropis procera* – an ethnobotanical approach. **J. Ethnopharmacol.** v. 68(1-3), pp. 83-95, 1999.
- SHOUP, A. Why latex allergy now? **Semin. Perioper. Nurs.** v. 7(4), pp. 222-225, 1998.
- SINGH, H., KUMAR, S., DEWAN, S., KUMAR, V.L. Inflammation induced by latex of *Calotropis procer a* – a new model to evaluate anti-inflammatory drugs. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods.** v. 43(3), pp. 219-224, 2000.
- SMITH, H.F., WOERDENBAG, H.J., SINGH, R.H., MEULENBELD, G.J., LABADIE, R.P., ZWAVING, J.H. Ayurvedic herbal drugs with possible cytostatic activity. **J. Ethnopharmacol.** v. 47(2), pp. 75-84, 1995.
- SOARES P.M., LIMA S.R., MATOS S.G., ANDRADE M.M., PATROCÍNIO M.C., FREITAS C.D., RAMOS M.V., CRIDDLE D.N., CARDI B.A., CARVALHO K.M., ASSREUY A.M.S., VASCONCELOS S.M.. Anti-nociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **J. Ethnopharmacology,** v. 99(1), pp. 125-129, 2005.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA / SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO / SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO. **Arq Bras Cardiol.** v. 95(1supl.1), pp. 1-51.2010.
- de SOUSA A P A, BARBOSA PS, TORRES MR, MARTINS AM, MARTINS RD, de SOUSA ALVES R, de SOUSA DF, ALVES CD, COSTA-LOTUFO LV, MONTEIRO HS.The renal effects of alginates isolated from brown seaweed *Sargassum vulgare*. **J Appl Toxicol.** v. 28 (3), pp. 364-9, 2008.
- de SOUSA, G. E. and FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions,** v.17 (1), pp. 97-103, 1985.
- SOUSA, M. J., & MALCATA, F. X. Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. **Lait.** v. 82(2), pp. 151–170, 2002.
- SRITANYARAT, W., PEARCE G., SIEMS, W. F., RYAN, C. A., WITITSUWANNAKUL R., WITITSUWANNAKUL, D. Isolation and characterization of iso inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry.** v. 67 (15), pp.1644-1650, 2006.

SWARBRICK M.M & HAVEL P.J. Physiological, pharmacological, and nutritional regulation of circulating adiponectin concentrations in humans. **Metab Syndr Relat Disord.** v. 6(2), pp. 87-102, 2007.

TABASSUM, N. & AHMAD, F. Role of natural herbs in the treatment of hypertension. **Pharmacogn Rev.** v. 5(9), pp. 30–40, 2011.

TORRES MC, JORGE RJ, XIMENES RM, ALVES NT, SANTOS JV, MARINHO AD, MONTEIRO HS, TOYAMA MH, BRAZ-FILHO R, SILVEIRA ER, PESSOA OD. Solanidae and iminosolanidane alkaloids from *Solanum campaniforme*. **Phytochemistry.** v. 96, pp. 457-64, 2013.

UPADHYAY, RK. Plant latex: A natural source of pharmaceuticals and pesticides Review article. **International Journal of Green Pharmacy.** v. 5(3), pp. 169-180, 2011.

VAN LOON, L.C., VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** v. 55(2), pp. 85–97, 1999.

VANDER POLL, T.; MARCHANT, A.; BUURMAN, W. A.; BERMAN, L.; KEOGH, C. V.; LAZARUS, D. D.; NGUYEN, L.; GOLDMAN, M.; MOLDAWER, L. L.; LOWRY, S. F. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. **J Immunol.** v. 155, pp. 5397-5401, 1995.

VASCONCELOS, E. A.R., NOGUEIRA, F.C.S., ABREU, E.F.M., GONÇALVES, E.F., SOUZA P.A.S., CAMPOS, F.A.P. Protein extraction from cowpea tissues for 2-D gel electrophoresis and MS analysis. **Chromatographia.** v. 62(7-8), pp. 447-450, 2005.

VÁSQUEZ-TORRES, A., FANTUZZI, G., EDWARDS, C.K., DINARELLO, C.A. AND FANG, F.C. Defective localization of the NADPH phagocyte oxidase to *Salmonella*-containing phagosomes in tumor necrosis factor p55 receptor-deficient macrophages. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 98(5), pp. 2561-2565, 2001.

WITHANAGE, G.S.K., WIGLEY, P., KAISER, P., MASTROENI, P., BROOKS, H., POWERS, C., BEAL, R., BARROW, P., MASKELL, D. & MacCONNEL. **Infection Immun.** v. 73 (8), pp. 5173-5182, 2005.

WICHTERMANN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock - a review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res.** v. 29, pp. 189-201, 1980.

Xavier-Elsas, P.; de Luca, B.; Queto, T.; Vieira, B.M.; Masid-de-Brito, D.; Dahab, E. C.; Alves-Filho, J. C.; Cunha, F. Q.; & Gaspar-Elsas, M. I. C. Blockage of Eosinopoiesis by IL-17A Is Prevented by Cytokine and Lipid Mediators of Allergic Inflammation. **Mediators of Inflammation.** v. 2015, id 968932, pp.11, 2015.

World Health Organization (WHO) International Society of Hypertension. Guidelines for the Management of Hypertension Guidelines Subcommittee. **J Hypertens.** v. 17 (2), pp. 151-83. 1999.

XIMENES RM, ALVES RS, PEREIRA TP, ARAÚJO RM, SILVEIRA ER, RABELLO MM, HERNANDES MZ, SOARES VC, BRISTOT D, PIRES CL, TOYAMA DO, GAETA HH, MONTEIRO HS, TOYAMA MH. Harpalycin 2 inhibits the enzymatic and platelet aggregation activities of PrTX-III, a D49 phospholipase A2 from *Bothrops pirajai* venom. **BMC Complement Altern Med.** v 27(12), 139; 10pp.2012.

XIMENES RM, RABELLO MM, ARAÚJO RM, SILVEIRA ER, FAGUNDES FH, DINIZ-FILHO EB, BUZZO SC, SOARES VC, TOYAMA D DE O, GAETA HH, HERNANDES MZ, MONTEIRO HS, TOYAMA MH. Inhibition of Neurotoxic Secretory Phospholipases A(2) Enzymatic, Edematogenic, and Myotoxic Activities by Harpalycin 2, an Isoflavone Isolated from *Harpalyce brasiliiana Benth.* **Evid Based Complement Alternat Med.** v 2012 id 987517, 9 pp., 2012.

YAMAZAKI Y., HYODO F., MORITA T. Wide distribution of cysteine-rich secretory proteins in snake venoms: isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Arch Biochem Biophys.** v. 412(1), pp. 133-41, 2003.

YANG, R. C.; WANG, C. I.; CHEN, H. W.; CHOU F. P.; LUE S. I.; HWANG K. P. Heat shock treatment decreases the mortality of sepsis in rats. Kaohsiung **J. Med. Sci.** v. 14, pp. 664-672, 1998.

YEANG, H.Y., ARIF, S.A., YUSOF, F., SUNDERASAN, E. Allergenic proteins of natural rubber latex. **Methods.** v. 27(1), pp. 32-45, 2002.

ZHOU, X, CROOK MF, SHARIF-RODRIGUEZ W, ZHU Y, RUBEN Z, PAN Y, UROSEVIC-PRICE O, WANG L, FLATTERY AM, FORREST G, SZETO D, ZHAO H, ROY S, FORREST MJ. Chronic antagonism of the mineralocorticoid receptor ameliorates hypertension and end organ damage in a rodent model of salt-sensitive hypertension. **Clin Exp Hypertens.** v. 33(8), pp. 538-47, 2011.

(https://www.flickr.com/photos/desert_ways/4518692452/in/photostream/)

(<http://a398.idata.over-blog.com/600x450/2/61/75/91/senegal/Calotropis-procera-latex-O-Gonnet.jpg>)

(www.heartscore.org).

(www.plosone.org).

A: (http://2.bp.blogspot.com/_LOsE8ItM2eE/R-G7XwRLmvl/AAAAAAAAAAmo/ROYIDle3S-0/s320/IMG_3864.jpg)

B: (<http://www.agrolink.com.br/agromidias/problemas/g/Calotropis%20procera4.jpg>)

A₁: (http://3.bp.blogspot.com/_Pc-ulk3t1u4/Sj6fkF0eWTI/AAAAAAAAAFQ/fu4ARcvLMM8/s400/N%C3%89FRONN.bmp).

B₁: (http://3.bp.blogspot.com/_Pc-ulk3t1u4/Sj57DXsZ31I/AAAAAAAAAEw/A3q8RIBvNaQ/s400/n%C3%A9fronzinho+copy.jpg).