



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

**ALANA FONTELES LIMA RABELO**

**CARACTERIZAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA  
AGUDA INDUZIDA POR UMA FRAÇÃO PROTEICA ISOLADA DO LÁTEX DE  
*Calotropis procera* (Ait.) R. Br**

**FORTALEZA**  
**2014**

ALANA FONTELES LIMA RABELO

CARACTERIZAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA  
INDUZIDA POR UMA FRAÇÃO PROTEICA ISOLADA DO LÁTEX DE *Calotropis*  
*procera* (Ait.) R. Br

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar

FORTALEZA

2014

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

- 
- R114c Rabelo, Alana Fonteles Lima.  
Caracterização *in vivo* e *in vitro* da resposta inflamatória aguda induzida por uma fração proteica isolada do látex de *calotropis procera* (Ait.) R. BR / Alana Fonteles Lima Rabelo. – 2014.  
115 f. : il., enc. ; 30 cm.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Doutorado em Farmacologia, Fortaleza, 2014.  
Área de Concentração: Farmacologia Bioquímica e Molecular  
Orientação: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.
1. Apocynaceae. 2. Látex. 3. Proteínas. 4. Inflamação. 5. Peritonite. I. Título.

---

CDD 615.32372

ALANA FONTELES LIMA RABELO

CARACTERIZAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA  
INDUZIDA POR UMA FRAÇÃO PROTEICA ISOLADA DO LÁTEX DE *Calotropis*  
*procera* (Ait.) R. Br

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Marcio Viana Ramos  
Universidade Federal do Ceará/DBBM

---

Prof. Dr. Hermogenes David de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará/DBBM

---

Profa. Dra. Adriana Rolim Campos Barros  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho  
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

***Dedico aos meus pais, Eronildes e Cláudio, pela educação que me proporcionaram, o que me possibilitou concluir mais essa fase da minha vida acadêmica.***

***Ao meu esposo, Leirton Rabelo, sempre companheiro e paciente, apoiando-me em todos os obstáculos.***

***Aos meus filhos, Lorena e Henrique, que nasceram durante essa trajetória do doutorado, tornando-me mais forte e confiante na luta dos meus ideais.***

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. **Nylane Maria Nunes de Alencar**, pelos ensinamentos, amizade, incentivo e paciência durante a realização deste trabalho. Obrigada por acreditar em mim!

Ao professor Dr. **Márcio Viana Ramos**, e aos demais integrantes do Laboratório de Plantas Laticíferas, do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo fornecimento da fração proteica do látex de *Calotropis procera*, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos **professores do Programa de Pós-graduação** do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, pelos ensinamentos.

À Dra. **Ingrid Samantha Tavares de Figueiredo**, pelo imenso incentivo na realização de cada etapa desta tese, pela amizade e motivação, que me ajudaram a seguir adiante. Você é um exemplo de mulher guerreira e determinada!

Aos bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Bioquímica **Luana do Carmo, Tamiris Goebel, Gisele Pinheiro e Yuri Tayro**, pela ajuda na execução dos experimentos e pelas conversas animadas que tornavam estes momentos mais descontraídos.

Aos pós-graduandos **Lyara Freitas, Patrícia Bastos, Rachel Sindeaux e Tiago Olinda**, pela amizade e parceria durante a realização desse trabalho.

À **Patrícia Sâmara**, técnica do nosso laboratório, pela organização dos nossos equipamentos, reagentes, protocolos e vidrarias, facilitando a execução dos experimentos. E pelo cafezinho oferecido no final da tarde, para espantar o cansaço depois de um dia todo de trabalho.

Às minhas funcionárias, **Brena e Cícera**, que cuidaram dos meus filhos e da minha casa durante grande parte deste período, possibilitando a minha dedicação ao desenvolvimento e escrita dessa tese.

À mãe, **Maria Eronildes**, pelo incentivo, apoio e amor incondicional durante toda a minha existência e, principalmente, nesta fase da minha vida. Nunca deixando de acreditar que eu conseguiria obter essa grande conquista: o título de doutora.

Ao meu grande amor, **Leirton Rabelo**, pelo esposo maravilhoso, companheiro, amigo e confidente que és para mim. Você me ajudou a construir uma família linda e feliz!

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

## RESUMO

*Calotropis procera* é uma planta laticífera pertencente à família Apocynaceae, encontrada na Ásia, África e América do Sul. Seu látex é constituído por um grande número de moléculas bioativas que apresentam relevantes propriedades farmacológicas que inclui anti- e pró-inflamatória, antitumoral, cicatrizante, antimicrobiana, entre outras. As proteínas extraídas deste látex possuem múltiplos efeitos imunomodulatórios, dependendo da via de administração utilizada. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a resposta pró-inflamatória da fração proteica (PL) do látex de *Calotropis procera* nos modelos de peritonite e bolsa de ar subcutânea; investigando a quimiotaxia de neutrófilos (*in vivo* e *in vitro*); o papel das células residentes e os mediadores envolvidos. Foram utilizados camundongos Swiss (25-30 g). Verificou-se que PL induziu migração de neutrófilos (MN) de forma dose-e-tempo dependente nos modelos de peritonite e bolsa de ar subcutânea. Foi demonstrado um aumento na permeabilidade vascular induzido pela administração da PL (1 mg/cav) na cavidade peritoneal no modelo de Azul de Evans. O aumento na população de macrófagos residentes pelo pré-tratamento com tioglicolato, intensificou a MN induzida por PL, sendo observado um resultado semelhante com o grupo depletado de mastócitos pelo composto 48/80. Os mastócitos parecem exercer um papel modulador inibitório sobre a quimiotaxia de neutrófilos, enquanto os macrófagos potencializam a MN, possivelmente por meio da liberação de mediadores. Para investigação dos mediadores envolvidos foram utilizados fármacos bloqueadores específicos antes da administração da PL. A modulação farmacológica com Dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.), Pentoxifilina (100 mg/kg, s.c.), Talidomida (50 mg/kg, s.c.), Indometacina (3 mg/kg, s.c.) e Celecoxib (30 mg/kg, s.c.), mas não com Meclizina (40 mg/kg, s.c.) e PCA (10 mg/kg; s.c.), inibiram a MN induzida por PL. Foi verificado por ELISA que os níveis dos mediadores IL-1 e IL-6 estavam aumentados no fluido peritoneal 4 h após a administração de PL (1 mg/cav, i.p.). Os níveis de nitrito também estavam aumentados no fluido da bolsa de ar subcutânea, demonstrando um envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito pró-inflamatório da PL. A PL induziu rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular do mesentério de camundongos, bem como quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. Além disso, foi capaz de interagir diretamente com neutrófilos, induzindo a síntese dos mediadores pró-inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> e NO em cultura de neutrófilos. Em

conclusão, PL induz uma resposta inflamatória aguda, caracterizada pela intensa migração de neutrófilos e aumento da permeabilidade vascular. Promove quimiotaxia para neutrófilos de forma indireta, *via* macrófagos residentes, e de forma direta, interagindo com neutrófilos, induzindo rolamento e adesão no endotélio e liberação de mediadores pró-inflamatórios.

**Palavras-chave:** *Calotropis procera*. Látex. Proteínas. Inflamação. Migração de Neutrófilos. Peritonite.

## ABSTRACT

*Calotropis procera* is a laticiferous plant belonging to the family Apocynaceae, found in Asia, Africa and South America. Its latex is comprised of a large number of bioactive molecules that show significant pharmacological properties including anti- and pro- inflammatory, antitumor, healing, antimicrobial, among others. The proteins extracted from this latex have multiple immunomodulatory effects, depending on the route of administration utilized. The objective of this study was to characterize the pro- inflammatory response of protein fraction PL latex *Calotropis procera* in models of peritonitis and subcutaneous air pouch; neutrophil chemotaxis (in vivo and in vitro); the role of resident cells and mediators involved. Swiss mice were used (25-30 g). It was found that PL induced neutrophil migration (MN) in a dose- and time - dependent in models of peritonitis and subcutaneous air pouch. An increase in vascular permeability induced by the administration of PL (1 mg / cav) in the peritoneal cavity in the Evans blue model was demonstrated. The increase in the population of resident macrophages after pre-treatment with thioglycolate intensified the MN induced by PL, with the similar result observed with the mast cell -depleted group by compound 48/80. Mast cells appear to exert an inhibitory modulatory role on neutrophil chemotaxis, whereas macrophages potentiate the MN, possibly through the release of mediators. For investigation of involved mediators, blocking drugs were used before administration of the PL. Pharmacological modulation Dexamethasone (0.5 mg/kg , s.c.), Pentoxifylline (100 mg/kg , s.c.), Thalidomide (50 mg/kg , s.c.), Indomethacin (3 mg/kg , s.c.) and Celecoxib (30 mg/kg , s.c.), but not with Meclizine (40 mg/kg , s.c.) and PCA (10 mg/kg, s.c.) inhibited the MN induced by PL. It was verified by ELISA, that levels of mediators IL-1 and IL-6 were elevated in the peritoneal fluid 4 hours after administration of PL (1 mg/cav, i.p.). The nitrite levels were also higher in the subcutaneous air pouch fluid, demonstrating the involvement of nitric oxide (NO) in the pro-inflammatory effects of LP. PL induced rolling and adhesion of leukocytes to the vascular endothelium of mesenteric mice and neutrophil chemotaxis in vitro. Furthermore, it can directly interact with neutrophils by inducing the synthesis of pro-inflammatory mediators TNF- $\alpha$ , IL- 1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> and NO in neutrophil's culture. In conclusion, PL induces an acute inflammatory response characterized by intense neutrophil migration and increase of vascular permeability. Promotes neutrophil chemotaxis indirectly, via resident macrophages and directly

interacting with neutrophils, inducing rolling and adhesion to the endothelium and release of pro-inflammatory mediators.

**Keywords:** *Calotropis procera*. Latex. Protein. Inflammation. Neutrophil migration. Peritonitis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1 -</b>	Aspectos gerais da planta <i>Calotropis procera</i> .....	43
<b>FIGURA 2 -</b>	Efeito da fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) sobre a migração de neutrófilos.....	62
<b>FIGURA 3 -</b>	Efeito da fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) associada à polimixina B (PmB) sobre a migração de neutrófilos.....	62
<b>FIGURA 4-</b>	Curso temporal da migração de neutrófilos induzida por PL....	63
<b>FIGURA 5 -</b>	O aumento da população de macrófagos na cavidade peritoneal aumentou a migração de neutrófilos induzida pela fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL).....	64
<b>FIGURA 6 -</b>	A depleção de mastócitos da cavidade peritoneal aumentou a migração de neutrófilos induzida pela fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL).....	65
<b>FIGURA 7 -</b>	A fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) aumentou a permeabilidade vascular na cavidade peritoneal.....	67
<b>FIGURA 8 -</b>	A fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) aumenta os níveis de citocinas (IL-1 e IL-6) no fluido peritoneal.....	68
<b>FIGURA 9 -</b>	Curso-temporal da migração de leucócitos induzido pela fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) no modelo da bolsa de ar.....	70
<b>FIGURA 10 -</b>	Fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) induz aumento dos níveis de nitrito no fluido da bolsa de ar subcutânea.....	70
<b>FIGURA 11 -</b>	A fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) induz rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular do mesentério de camundongos.....	72
<b>FIGURA 12 -</b>	A fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) induz quimiotaxia de neutrófilos <i>in vitro</i> .....	74
<b>FIGURA 13 -</b>	A fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) induz a	

	liberação de mediadores inflamatórios por neutrófilos <i>in vitro</i> ..	75
<b>FIGURA 14 -</b>	Hipótese de mecanismo para o efeito da fração proteica (PL) isolada do látex de <i>Calotropis procera</i> .....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>APC</b>	Célula apresentadora de antígenos
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>Cav</b>	Cavidade
<b>COX-1 e -2</b>	Ciclooxigenase 1 e 2
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>C3, C5</b>	Componentes do sistema complemento 3 e 5
<b>Da</b>	Daltons
<b>EDRFs</b>	Fatores de relaxamento vascular derivados do endotélio
<b>E.P.M.</b>	Erro padrão da média
<b>e.v.</b>	Endovenosa
<b>fMLP</b>	N-Formil- metil-L -metionil- L -leucil- L -fenilalanina
<b>g</b>	Gravidade
<b>ICAM-1/ICAM-2</b>	Moléculas de adesão intercelular-1 e -2
<b>IgE e IgA</b>	Imunoglobulina E e A
<b>IL- 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 13</b>	Interleucinas- 1, 2, 4, 6, 8, 10, 13
<b>INF-γ</b>	Interferon-gama
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzível
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeos
<b>LT</b>	Linfócitos T
<b>LTB<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub></b>	Leucotrienos B <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> , E <sub>4</sub>
<b>M</b>	Molar
<b>MCP-1</b>	Proteína quimioatraente para monócitos-1
<b>MHC</b>	<i>Major histocompatibility complex</i>
<b>MIP1</b>	Proteína inflamatória de macrófagos
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>NO<sub>2</sub></b>	Nitrito

<b>NO<sub>3</sub></b>	Nitrato
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>PAF</b>	Fator ativador de plaquetas
<b>PAMPs</b>	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
<b>PCA</b>	Antagonista do receptor ativador de plaquetas
<b>PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub></b>	Prostaglandinas D <sub>2</sub> , E <sub>2</sub> , F <sub>2α</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina 2
<b>PL</b>	Fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i>
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>RPMI-1640</b>	Meio de cultura
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>s.c</b>	Subcutânea
<b>SC</b>	Sistema Complemento
<b>Sal</b>	Salina estéril
<b>TLR</b>	<i>Toll-like</i> receptor
<b>TNF-α</b>	Fator de necrose tumoral - α
<b>v.o.</b>	Via oral
<b>v/v</b>	Volume por volume
<b>VCAM</b>	Molécula de adesão vascular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1</b>	<b>Inflamação – Aspectos Gerais.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Eventos vasculares da resposta inflamatória.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Eventos celulares da resposta inflamatória.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1.3</b>	<b>Células inflamatórias.....</b>	<b>22</b>
<b>1.1.3.1</b>	<b>Neutrófilos.....</b>	<b>23</b>
<b>1.1.3.2</b>	<b>Macrófagos.....</b>	<b>24</b>
<b>1.1.3.3</b>	<b>Mastócitos.....</b>	<b>26</b>
<b>1.1.4</b>	<b>Migração celular, moléculas de adesão e quimiotaxia.....</b>	<b>27</b>
<b>1.1.5</b>	<b>Mediadores químicos envolvidos na inflamação.....</b>	<b>29</b>
<b>1.1.5.1</b>	<b>Citocinas.....</b>	<b>33</b>
<b>1.1.5.2</b>	<b>Quimiocinas.....</b>	<b>37</b>
<b>1.2</b>	<b>Biomoléculas vegetais na modulação da resposta inflamatória....</b>	<b>38</b>
<b>1.3</b>	<b>Látex e plantas lactíferas.....</b>	<b>40</b>
<b>1.4</b>	<b>Calotropis procera (Ait.) R. Br.....</b>	<b>41</b>
<b>1.4.1</b>	<b>Potencial farmacológico da planta Calotropis procera.....</b>	<b>42</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Potencial farmacológico do látex de Calotropis procera.....</b>	<b>44</b>
<b>1.5</b>	<b>Relevância e Justificativa.....</b>	<b>47</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>48</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>48</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Drogas e reagentes.....</b>	<b>49</b>
<b>3.2</b>	<b>Aparelhos e instrumentos laboratoriais.....</b>	<b>50</b>
<b>3.3</b>	<b>Obtenção da fração proteica do látex de Calotropis procera (PL)..</b>	<b>50</b>
<b>3.4</b>	<b>Animais experimentais.....</b>	<b>51</b>
<b>3.5</b>	<b>Modelos Experimentais.....</b>	<b>51</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Avaliação do efeito da fração proteica do látex de Calotropis procera (PL) sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal.....</b>	<b>51</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Efeito da fração proteica do látex de Calotropis procera (PL)</b>	

	associada à polimixina B sobre a migração de neutrófilos.....	52
3.5.3	Curso Temporal da Migração de Leucócitos para cavidade peritoneal induzida pela fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) .....	52
3.5.4	Avaliação do efeito da fração PL sobre a migração de neutrófilos, após incremento da população de macrófagos residentes na cavidade peritoneal (pré-tratamento com tioglicolato).....	53
3.5.5	Avaliação do efeito da fração PL sobre a migração de neutrófilos, após depleção de mastócitos peritoneais (pré-tratamento com o composto 48/80).....	53
3.5.6	Efeito de diferentes moduladores farmacológicos sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL).....	54
3.5.7	Determinação do efeito da fração PL sobre a permeabilidade vascular em camundongos.....	54
3.5.8	Efeito da fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias na cavidade peritoneal.....	55
3.5.9	Avaliação da atividade pró-inflamatória da fração proteica PL no modelo de bolsa de ar subcutânea (“Air pouch”).....	56
3.5.10	Dosagem do óxido nítrico (NO) no fluido da bolsa de ar subcutânea.....	56
3.5.11	Efeito da fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) sobre a quimiotaxia (rolamento e adesão) de leucócitos na microcirculação mesentérica.....	57
3.5.12	Efeito da fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) em neutrófilos cultivados in vitro.....	58
3.5.12.1	Isolamento de neutrófilos e preparo da cultura celular.....	58
3.5.12.2	Quimiotaxia de Neutrófilos in vitro.....	58
3.5.12.3	Avaliação do efeito da fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) sobre a liberação de mediadores inflamatórios por neutrófilos in vitro.....	59

3.6	Análise estatística dos dados.....	60
4	RESULTADOS.....	61
4.1	A fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de forma concentração-dependente.....	61
4.2	Efeito da fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) associada à polimixina B sobre a migração de neutrófilos.....	61
4.3	Fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) induz migração de neutrófilos de forma tempo dependente.....	61
4.4	O aumento da população de macrófagos na cavidade peritoneal aumentou a migração de neutrófilos induzida pela fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL).....	63
4.5	A depleção de mastócitos da cavidade peritoneal aumenta a migração de neutrófilos induzida pela fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) .....	64
4.6	Efeito de diferentes bloqueadores farmacológicos na migração de neutrófilos induzida por PL na cavidade peritoneal.....	65
4.7	Efeito da fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) sobre a permeabilidade vascular.....	66
4.8	A fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) aumenta os níveis de citocinas (IL-1 e IL-6) no fluido peritoneal de camundongos.....	67
4.9	A fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) induz migração de leucócitos no modelo da bolsa de ar (“Air pouch”)...	69
4.10	Fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) induz aumento dos níveis de nitrito no fluido da bolsa de ar subcutânea.....	69
4.11	A fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) induz rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular do mesentério de camundongos.....	71
4.12	A fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) induz quimiotaxia de neutrófilos in vitro.....	73
4.13	Efeito da fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL)	

	<b>sobre a liberação de mediadores inflamatório por neutrófilos in vitro.....</b>	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>93</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>94</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Inflamação – Aspectos Gerais

A inflamação é um mecanismo fisiopatológico em resposta à invasão por um agente infeccioso, ou por uma lesão de origem variada (térmica, química, física ou mecânica), ou ainda mesmo por uma reação autoimune, que resulta em um conjunto de reações locais e gerais do organismo. Este processo é composto por vários fenômenos (vasculares, celulares e bioquímicos) que se associam, formando uma reação em cascata que envolve uma complexa interação das células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, monócitos/macrófagos, plaquetas) e vasculares (endoteliais e células da musculatura lisa). A finalidade desse processo é remover o estímulo indutor da resposta e iniciar a recuperação tecidual local (TEDGUI; MALLAT, 2001).

O sistema imunológico é constituído por uma intrincada rede de órgãos, células e moléculas, e tem por finalidade manter a homeostase do organismo, combatendo as agressões em geral. A função imunológica tem sido conceitualmente dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa (CRUVINEL *et al.*, 2010).

A imunidade inata representa uma resposta rápida e estereotipada a um número grande, mas limitado, de estímulos. É representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores, e não se altera qualitativa ou quantitativamente após o contato (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000).

As principais células efetoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* - NK. Fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, bem como síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas são os principais mecanismos na imunidade inata (CRUVINEL *et al.*, 2010).

Em contraposição à resposta inata, a resposta imune adaptativa depende da ativação de células especializadas, os linfócitos, e das moléculas solúveis por eles produzidas – os anticorpos. As principais características da resposta adquirida são: especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo. Embora

as principais células envolvidas na resposta imune adquirida sejam os linfócitos, as células apresentadoras de antígenos (APCs) desempenham papel fundamental em sua ativação, apresentando antígenos associados à moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC, *major histocompatibility complex*) para os linfócitos T (LT) (DELVES; ROITT, 2000).

A resposta imediata e inicial a um agente agressor é denominada de fase aguda da inflamação. As principais características desta fase são: vasodilatação com aumento da permeabilidade vascular e exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas (eventos vasculares), migração de leucócitos, predominantemente de neutrófilos para o foco inflamatório (eventos celulares) e alterações sistêmicas tais como dor, febre e elevação nos níveis de uma série de proteínas, caracterizadas como proteínas de fase aguda (fibrinogênio, componentes C3 e C5 do complemento, proteína C reativa, entre outras) (BAUHMANN; GAULDIE, 1994).

Um conjunto de sinais foi descrito por Cornelius Celsus no início da era cristã, como os quatro sinais cardinais da inflamação: rubor (eritema), tumor (edema local), calor (febre) e dor; mais tarde, no século XIX, Virchow acrescentou a perda da função do tecido ou órgão lesado como o quinto sinal clínico (HENSON, 2005).

A persistência do estímulo agressor por um período indeterminado poderá cronificar o processo inflamatório. A fase crônica caracteriza-se por ser de longa duração, não apresentar um padrão tão estereotipado, variando de acordo com os tipos de mediadores celulares e humorais envolvidos (TASAKA, 2006); estar associada à presença de linfócitos e macrófagos, e à proliferação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e de tecido conjuntivo (GALLIN *et al.*, 1999).

Qualquer estímulo, seja ele de natureza química, física ou mecânica, capaz de iniciar um processo inflamatório desencadeará de forma mais ou menos extensa a ativação de uma série de mediadores químicos, que terão sua ação centrada principalmente sobre eventos vasculares e celulares (TASAKA, 2006).

Esses mediadores que regulam o processo inflamatório são moléculas solúveis oriundas de células, do plasma ou de proteínas da matriz que agem em células inflamatórias alvo através de receptores específicos (LUSTER *et al.*, 2005) e são responsáveis pelas respostas vasculares e celulares, tanto da fase aguda quanto da fase crônica (BAUHAMAN; GAULDIE, 1994). Estas substâncias podem modular a resposta inflamatória de forma positiva ou negativa, pois caso ocorra persistência do processo inflamatório, poderá ocorrer um estado patológico com

lesão de células normais do hospedeiro e conseqüentemente ser deletério ao organismo (BROIDE, 1991). Estes mediadores são geralmente as quimiocinas, citocinas e mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico (SERHAN; SAVILL, 2005).

### **1.1.1 Eventos vasculares da resposta inflamatória**

A resposta inflamatória aguda evolui a partir de uma fase vascular iniciada pelas células residentes no tecido imediatamente após o dano. Em condições basais, apenas uma fração dos capilares que compõem a rede tecidual está pérvia, mas, após uma agressão, ocorrem vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar mediados por aminas vasoativas, histamina e serotonina, liberadas por mastócitos e monócitos minutos após a agressão (CRUVINEL *et al.*, 2010).

O aumento da permeabilidade vascular pode ocorrer por diferentes mecanismos, dependendo dos receptores ativados na célula endotelial ou da lesão provocada no vaso sanguíneo. Propõe-se que a histamina e leucotrienos causam contração endotelial; interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) participam da reorganização citoesquelética endotelial; leucócitos ou agentes agressores provocam lesão vascular direta e extravasamento de fluidos; fator de crescimento endotelial vascular gera aumento da transcitose e neovascularização, que também provoca extravasamento de fluidos. O exsudato contém vários mediadores, que influenciam as células adjacentes e os próprios vasos sanguíneos, e incluem os componentes de quatro cascatas enzimáticas do plasma: sistema do complemento, sistema da coagulação, sistema fibrinolítico e sistema das cininas (ROBBINS *et al.*, 2005).

Inicialmente, saem do leito capilar eletrólitos e pequenas moléculas, constituindo o transudato; posteriormente saem também moléculas maiores como albumina e fibrinogênio, constituindo o exsudato. A saída de proteínas para o espaço extravascular é acompanhada de saída de água, e marginalização dos leucócitos, que passam a circular junto ao endotélio. O endotélio local toma-se ativado, expressando moléculas de superfície que favorecem a aderência dos leucócitos e a eventual migração destes para os tecidos. Saem também para o espaço extravascular e são ativados alguns componentes do Sistema Complemento, do sistema gerador de cininas e do sistema da coagulação. Macrófagos residentes

no tecido lesado liberam citocinas inflamatórias, como IL-1, TNF- $\alpha$  e quimiocinas (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

Assim, a vasodilatação, o aumento na permeabilidade vascular e o extravasamento do exsudato para o interstício são eventos característicos da inflamação aguda. Juntos são responsáveis pelo o aparecimento dos sinais cardinais da inflamação, calor, eritema e edema. O exsudato é também absorvido para dentro dos vasos linfáticos, aonde deslocam-se para os nódulos ou tecido linfáticos onde uma reação imune pode então ser iniciada (CIRINO *et al.*, 2003). A duração e evolução desses eventos dependerão da persistência do estímulo agressor (ABBAS, 2008).

### **1.1.2 Eventos celulares da resposta inflamatória**

A resposta inflamatória inclui a participação de diferentes tipos celulares, tais como neutrófilos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, plaquetas, células dendríticas, células endoteliais e fibroblastos, entre outras. Durante a infecção, a quimiotaxia é um importante evento para o recrutamento de células para o sítio de inflamação. O tipo de célula que predomina no foco inflamatório varia de acordo com o estágio da lesão e do tipo de estímulo. As primeiras células a chegarem ao parênquima lesado são os polimorfonucleares (PMN- neutrófilos, basófilos e eosinófilos), onde temos os neutrófilos, predominando no infiltrado durante as primeiras 6-24 horas, e, subseqüentemente, os macrófagos teciduais (ABBAS; JANEWAY, 2000).

As células envolvidas no processo inflamatório são diferentes quanto à morfologia, ao estímulo para ativação celular, ao curso de tempo pela liberação do mediador e ao conteúdo liberado, mas ao mesmo tempo apresentam muitas características em comum, como a presença de receptores, estocagem de enzimas hidrolíticas, capacidade de fagocitar e secretar, e a geração de metabólitos lipídicos do ácido araquidônico (ALENCAR, 2001).

Moléculas tais como lipopolissacarídeos, resíduos de manose e ácidos teicoicos, comumente encontradas na superfície de microorganismos, constituem Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e ativam a resposta imune inata, por interação com diferentes receptores conhecidos como Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRP), dentre os quais temos a família dos receptores

*Toll-like* (TLRs) (MEDZHITOV *et al.*, 1997). Os TLRs se destacam por seu papel central na ligação à patógenos e iniciação da resposta inflamatória. Esses receptores estão presentes principalmente em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (DCs) (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

A fagocitose tem início pela ligação dos receptores de superfície do fagócito ao patógeno, o qual, então, é internalizado em vesículas denominadas fagossomos. No interior do fagócito, o fagossomo funde-se a lisossomos, cujo conteúdo é liberado com a digestão e a eliminação do patógeno (ABBAS; LICHTMAN, 2003). Para garantir que todos os micro-organismos estranhos sejam reconhecidos e fagocitados estes devem primeiro passar pelo processo de opsonização. As principais opsoninas são o fragmento Fc da IgG, C3b e lectinas. A ligação da partícula opsonizada ao receptor leucocitário FcγR é suficiente para desencadear o engolfamento, que ocorre por pseudópodes; dando início à etapa de destruição bacteriana que ocorre principalmente por mecanismos dependentes de oxigênio. Dessa forma, as opsoninas são responsáveis pela maior eficiência do processo fagocítico (ROBBINS, 2000).

Os neutrófilos merecem destaque neste processo inflamatório agudo por serem os primeiros fagócitos a chegar no foco inflamatório (NAUSEEF, 2007). Os neutrófilos contêm quatro compartimentos intracelulares cujo conteúdo pode ser secretado durante a ativação celular: grânulos primários (azurófilos), grânulos secundários (específicos), grânulos terciários e as vesículas secretoras. Nos grânulos primários encontram-se os principais componentes citotóxicos desse sistema fagocitário, destacando-se a enzima mieloperoxidase (MPO) (PLIYEV, 2008).

A mieloperoxidase é expressa em grande quantidade nos neutrófilos e, em menor quantidade, nos monócitos ou macrófagos, participando da resposta inata pela formação de oxidantes e espécies reativas de oxigênio (MALLE *et al.*, 2007). É visto que a MPO é um importante marcador de neutrofilia na inflamação e sepse (FAITH *et al.*, 2008).

### **1.1.3 Células inflamatórias**

A resposta inflamatória celular representa um dos principais mecanismos pelos quais o organismo se defende contra agentes lesivos e repara o tecido

danificado. Os leucócitos são as principais células sanguíneas envolvidas na resposta inflamatória, embora plaquetas e eritrócitos também participem. Os leucócitos são classificados em neutrófilos (40%-75%), linfócitos (20%-50%), monócitos (2%-10%), eosinófilos (1%-6%) e basófilos (<1%) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Dentre os leucócitos, os neutrófilos, são as primeiras células a alcançarem o local da inflamação seguido pela migração dos monócitos que posteriormente se diferenciam em macrófagos. Os mastócitos residentes também exercem papel importante no desenvolvimento da resposta inflamatória.

### 1.1.3.1 Neutrófilos

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea, pelas células-tronco pluripotentes, as quais dão origem às demais células sanguíneas (células brancas, células vermelhas e plaquetas). A diferenciação, proliferação e maturação dos neutrófilos são regulados principalmente por três fatores de crescimento hematopoiético: GM-CSF (Fator de estimulação de crescimento de granulócitos e monócitos), G-CSF (Fator de estimulação de crescimento de granulócitos) e IL-3 (Interleucina 3) (HAMPTON *et al.*, 1998).

O tempo de trânsito dos neutrófilos, do momento em que são produzidos até sua liberação pela medula óssea, é de 4 a 6 dias. A medula mantém no seu interior um suprimento de neutrófilos maduros, capaz de suprir o sangue periférico por um período de 5 dias. Estas células também podem migrar para os tecidos, onde o tempo máximo de permanência é de 1-2 dias. A contínua produção de neutrófilos visa à manutenção da demanda tecidual e o estoque sanguíneo circulante (REBAR *et al.*, 2003).

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico humano, com importante papel nas fases iniciais das reações inflamatórias, e sensíveis a agentes quimiotáticos, como os produtos de clivagem de frações do complemento (C3a e C5a) e substâncias liberadas por mastócitos e basófilos. Estão entre as primeiras células a migrarem dos vasos para os tecidos atraídos por quimiocinas, como a IL-8, e são ativados por diversos estímulos, como produtos bacterianos, proteínas do complemento (C5a), imunocomplexos (IC), quimiocinas e citocinas. A capacidade fagocitária dos neutrófilos é estimulada pela ligação de seus receptores para opsoninas, Fc de IgG, C3b, e TLRs. O material fagocitado

(microorganismos, células mortas e restos celulares) é destruído por meio da produção de radicais livres de oxigênio e nitrogênio, e pela atividade de enzimas lisossomais presentes nestas células (BRINKMANN *et al.*, 2004).

Os neutrófilos possuem um sistema enzimático oxidativo, acoplado a membrana plasmática, conhecido como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (NADPH), o qual é responsável pelo aumento do metabolismo oxidativo, também conhecido como explosão respiratória. Neste sistema, ocorre uma transferência de elétrons do NADPH intracelular para o oxigênio, reduzindo-o a ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o qual pode ser rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio e este a radicais hidroxilas, denominados genericamente de intermediários reativos do oxigênio. Em geral, as quantidades de peróxido de hidrogênio formado não são capazes de induzir uma destruição eficaz dos microorganismos. No entanto, os grânulos azurófilos (lisossomos verdadeiros ou grânulos primários) dos neutrófilos contêm a enzima mieloperoxidase (MPO), que na presença de íons  $Cl^-$ , converte o peróxido de hidrogênio em hipoclorito, sendo este importante para a destruição do agente lesivo (GRESPLAN, 2006).

O citoesqueleto do neutrófilo é um complexo sistema de microfilamentos e microtúbulos que proporcionam a célula, uma grande habilidade na locomoção além de um movimento ordenado (BOXER *et al.*, 2001). Estão presentes principalmente em tecidos lesionados, inflamados e sua eliminação efetiva é um pré-requisito para a resolução da resposta inflamatória (SAVILL, 1997). Em condições normais, os neutrófilos são eliminados da circulação e dos tecidos inflamados por apoptose. Distúrbios na apoptose dessas células têm sido associados a diversas condições autoimunes, especialmente ao LES (Lúpus Eritematoso Sistêmico), uma vez que restos apoptóticos circulantes contendo materiais nucleares poderiam levar à produção de uma variedade enorme de autoanticorpos (BRINKMANN *et al.*, 2004).

### **1.1.3.2 Macrófagos**

Os macrófagos pertencem ao sistema fagocítico mononuclear, têm sua origem a partir de uma célula-mãe na medula óssea, passando pelo estágio de monoblastos para formar os pró-monócitos que, por sua vez, dividem-se dando origem aos monócitos do sangue periférico. Os monócitos são células não diferenciadas que, quando recrutadas para o tecido conjuntivo ou parênquima de

órgãos, são ativados para se tornarem células com função fagocítica, passando a ser chamados de macrófagos, histiócitos, macrófagos fixos ou macrófagos residentes (ABBAS; JANEWAY, 2000; LASKIN; PENDINO, 1995).

Os macrófagos residentes, mesmo sendo originados da mesma linhagem celular, podem apresentar características bioquímicas e estruturais distintas, em função do local onde se encontram; recebendo diferentes denominações, tais como células de Kupffer (fígado), macrófagos alveolares (pulmão), células microgliais (sistema nervoso central), osteoclastos (ossos), células de Langerhans (macrófagos cutâneos) (OGLE *et al.*, 1994).

Ao contrário dos neutrófilos, os macrófagos podem permanecer no tecido por meses a anos, atuando como células de alarme, que frente a agentes lesivos, desencadeiam mecanismos de defesa através da produção e liberação de inúmeras substâncias. Além do seu papel na imunidade inata, processam e apresentam antígenos via moléculas de MHC (Complexo de histocompatibilidade principal), estimulando a resposta mediada por LT. Por sua vez, os linfócitos T secretam citocinas, as quais podem ativar mais macrófagos, ampliando a resposta imune (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

Os macrófagos residentes possuem papéis fisiológicos importantes, tais como a absorção óssea pelos osteoclastos, participação também na fase final do processo inflamatório agudo, fagocitando patógenos, detritos celulares ou contribuindo para reparo tecidual através da liberação de citocinas que induzem a revascularização ou recrutamento de fibroblastos com formação de matriz extracelular (GORDON, 2001).

Recentemente, propôs-se a existência de três subpopulações de macrófagos: macrófagos ativados, de reparo tecidual e reguladores. Os primeiros seriam os macrófagos clássicos, com atividade microbicida e tumoricida, que secretam grandes quantidades de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, apresentam antígenos aos LTs e estão envolvidos com a resposta imune celular. O segundo tipo, ativado por IL-4, estaria basicamente envolvido no reparo tecidual, estimulando fibroblastos e promovendo deposição de matriz extracelular. O terceiro tipo exerceria atividade reguladora mediante liberação de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de demonstrar a importância de macrófagos na inflamação aguda. Foi demonstrado que a migração

de neutrófilos provocada por carragenina, zymosan ou LPS é mínima em cavidades peritoneais depletadas de macrófagos (SOUZA *et al.*, 1988). Vários trabalhos têm também demonstrado a importância de certas citocinas liberadas por macrófagos, tais como IL-1 e TNF- $\alpha$ , na mediação da migração de neutrófilos para o foco inflamatório (ASSREUY *et al.*, 2003; ROCHA *et al.*, 1997).

Os macrófagos exercem, portanto, papel fundamental na modulação de vários eventos da inflamação aguda, como também são importantes na fase crônica do processo inflamatório, quando atuam como APCs, potencializando a ativação de LT e LB pela expressão de moléculas coestimuladoras. Regulam a resposta inflamatória pela liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e quimiocinas. Também produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e intermediários reativos do oxigênio, cujo principal representante é o óxido nítrico (NO). O NO é produzido pela forma induzida da óxido nítrico sintetase, iNOS, ausente em macrófagos em repouso, mas induzida por ativação de TLRs em resposta a PAMPs, especialmente na presença de INF- $\gamma$  (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

### 1.1.3.3 Mastócitos

Os mastócitos são células derivadas de progenitores hematopoiéticos na medula óssea e, em geral, não são encontrados na circulação. Da medula óssea, os progenitores migram para os tecidos periféricos como células imaturas e se diferenciam *in situ* de acordo com as características particulares do microambiente, adquirindo uma morfofisiologia compatível com o tecido onde são encontrados (GALLI, 1990; KITAMURA *et al.*, 1987). Os mastócitos maduros distribuem-se estrategicamente junto a vasos sanguíneos, nervos e sob o epitélio da pele e mucosas, são particularmente abundantes em áreas de contato com o meio ambiente e desempenham papel primordial nas reações inflamatórias agudas (ABBAS *et al.*, 1994).

A membrana dos mastócitos possui receptores para uma classe especial de anticorpos, a imunoglobulina E (IgE), bem como para os fatores C3a e C5a do sistema do complemento. Quando há ligação de antígenos e alérgenos aos IgE na superfície do mastócito, ocorre a sua degranulação, com liberação de histamina, que

apresenta efeito quimiotático sobre os eosinófilos. A sua ativação se dá tanto por esses receptores, bem como por estímulos de certos neuropeptídios (substância P), venenos de animais e diversos agentes físicos (trauma mecânico, calor e frio), que ativam a proteína G independentemente de cálcio ( $Ca^{++}$ ). Após o estímulo, ocorrem degranulação e liberação de mediadores pré-formados, seguida da liberação de mediadores neoformados (METCALF *et al.*, 2008; REBAR, 2003).

De acordo com Costa *et al.* (1998), a ativação de mastócitos resulta em três diferentes tipos de respostas: a) Secreção de substâncias pré-formadas em seus grânulos, por exocitose, como histamina, aminas vasoativas, proteases neutras, heparina e/ou sulfato de condroitina, catepsina G e carboxipeptidase; b) Síntese enzimática de mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico da membrana, tais como: prostaglandinas D2, leucotrienos C4 e fator ativador de plaquetas (PAF); c) Iniciação da transcrição, translação e secreção de citocinas, como IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, TNF- $\alpha$ , MIP1- $\alpha$  e bFGF (fator de crescimento básico de fibroblastos).

A liberação desses mediadores induz a migração de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos), aumento da permeabilidade vascular, secreção de muco, aumento da motilidade gastrointestinal e broncoconstrição, que constituem os sinais e sintomas de alergia e anafilaxia (METCALFE, 2008).

Os mastócitos têm sido relacionados a um efeito inibitório sobre a produção de citocinas estimuladoras tais como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , por meio da liberação de IL-4, uma citocina com ações anti-inflamatórias (ASSREUY *et al.*, 2003; LORD; LAMB, 1996; TUNON de LARA *et al.*, 1994). Além de inibir a produção de citocinas inflamatórias, IL-4 também inibe a indução de COX-2, com consequente redução da produção de PGs (SEITZ *et al.*, 1994). Essas ações inibitórias sobre a produção de mediadores quimiotáticos refletem em uma redução no recrutamento dos neutrófilos para o foco inflamatório.

#### **1.1.4 Migração celular, moléculas de adesão e quimiotaxia**

A migração dos leucócitos para o local da inflamação ocorre em função de uma complexa interação destes com as células endoteliais, através da expressão em suas superfícies de proteínas adesivas, denominadas de moléculas de adesão. Este processo é intermediado por diferentes mediadores inflamatórios e

quimiotáticos, os quais promovem um aumento nas interações entre os neutrófilos e as células do endotélio, facilitando a migração dos neutrófilos a favor de um gradiente de substâncias quimiotáticas no sítio inflamatório (MCEVER, 1992; HUTTENLOCHER *et al.*, 1995).

Em condições normais de fluxo sanguíneo, as células circulam no centro do vaso, onde a resistência é menor e a velocidade do fluxo, maior. Quando há vasodilatação, a velocidade do fluxo sanguíneo diminui e as células circulantes colidem mais frequentemente com as células endoteliais ativadas que expressam moléculas de superfície capazes de se ligar aos leucócitos. As células endoteliais ativadas expressam altos níveis de moléculas de adesão da família das selectinas, molécula 1 de adesão intercelular (ICAM- 1) e molécula 1 de adesão da célula vascular (VCAM- 1). A ativação endotelial é ocasionada por subprodutos de micro-organismos, citocinas (IL-1, TNF- $\alpha$ ), componentes ativados do SC, fatores da coagulação, histamina e leucotrieno B4 (PANÉS *et al.*, 1999).

As selectinas são glicoproteínas presentes em leucócitos (L-selectina), endotélio (E-selectina e P-selectina) e plaquetas (P-selectina) que se ligam a moléculas glicosiladas presentes na superfície de outras células e, em geral, medeiam adesão de baixa afinidade entre leucócitos e endotélio. Embora estas interações sejam fracas e reversíveis, são suficientes para determinar a desaceleração e rolamento dos leucócitos no endotélio vascular (RANKIN, 2004).

Além das selectinas, outras famílias de moléculas estão também envolvidas no processo de adesão, como as imunoglobulinas e integrinas (PANÉS *et al.*, 1999). As selectinas são responsáveis pelo processo de rolamento inicial (LEY *et al.*, 2007; LUSTER *et al.*, 2005), enquanto as  $\beta$ -integrinas (CD11a/CD18 e CD11b/CD18 em leucócitos) e os membros da família das imunoglobulinas (moléculas de adesão intercelular 1 ou ICAM-1 e ICAM-2 no endotélio) são responsáveis pelo ancoramento e adesão firme ao endotélio (RANKIN, 2004).

Portanto, o primeiro contato do neutrófilo com o endotélio ativado é mediado pela interação das selectinas P e E no endotélio à mucina presente na sua superfície. Concomitantemente, a selectina L de expressão constitutiva nos neutrófilos liga-se ao conjunto de mucinas na superfície do endotélio. Essas ligações são de dissociação rápida, o que faz com que os neutrófilos rolem na parede do vaso impelidos pelo fluxo sanguíneo e sejam expostos a fatores quimiotáticos. Entre os fatores quimiotáticos, destacam-se fragmentos de fibrina, colágeno, fatores

solúveis plaquetários, mediadores dos mastócitos, C5a, C3a e C4a, resíduos do metabolismo bacteriano como os peptídeos n-formilados, e as quimiocinas secretadas por diferentes tipos celulares (CARLOS; HARLAN, 1994).

As quimiocinas induzem alterações em outro conjunto de adesinas na superfície dos leucócitos, as integrinas, levando ao reconhecimento de maior avidéz aos ligantes expressos no endotélio, imobilizando os neutrófilos e promovendo sua firme aderência à parede do vaso. Imediatamente após a aderência ao endotélio, inicia-se o processo da transmigração através do vaso (SMITH, 2008; WEBER *et al.*, 2007) envolvendo a participação de moléculas juncionais tais como as moléculas de adesão celular endotelial/plaquetária-1 (PECAM-1), as moléculas de adesão juncional (JAMs) e as CD99 (PETRI; BIXEL, 2006). Os leucócitos emitem pseudópodes entre as junções das células endoteliais, atravessam a membrana basal e finalmente migram para o espaço intersticial, em direção ao foco da lesão, processo este, dirigido por um gradiente de quimiocinas e facilitado pela interação das integrinas aos componentes da matriz extracelular como a fibrina e a fibronectina (CRONSTEIN; WEISSMAN, 1993).

O extravasamento e a migração leucocitária são dependentes de quimiocinas como IL-8 e MCP- 1, que são produzidas nos locais de infecção e se ligam aos proteoglicanos na matriz extracelular e em moléculas similares na superfície das células endoteliais. A IL-8, liberada por macrófagos ativados, atrai neutrófilos, que são estimulados a penetrar no tecido inflamado, ao passo que MPC- 1 recruta monócitos, células T, células NK e células dendríticas mais tardiamente (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

Em resumo, podemos dividir as etapas da migração celular da luz vascular para o foco inflamatório em: 1. Marginação; 2. Rolamento; 3. Adesão; 4. Diapedese com penetração através da membrana basal dos pericitos (transmigração através do endotélio); e 5. Quimitaxia e/ou haptotaxia (migração no tecido intersticial em resposta ao estímulo quimiotático).

### **1.1.5 Mediadores químicos envolvidos na inflamação**

Os fenômenos da inflamação são mediados por substâncias químicas diversas, que derivam de precursores plasmáticos e celulares, como o plasma, os leucócitos, as plaquetas, o endotélio e o tecido conjuntivo. Podem ser classificados

de acordo com suas propriedades bioquímicas em: aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, produtos de clivagem do Sistema Complemento (SC), mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (TASAKA, 2006).

As aminas vasoativas, histamina e serotonina, são encontradas nos mastócitos, basófilos e plaquetas, e liberadas pela degranulação destas células, em resposta a estímulos. A histamina exerce seus efeitos mediante interação com quatro diferentes receptores da célula-alvo, H1, H2, H3 e H4. O receptor H1 quando ativado promove a contração da musculatura lisa de vários órgãos e o aumento da permeabilidade dos capilares venosos; H2 aumenta a secreção de ácido gástrico e promove relaxamento da musculatura lisa; H3 está envolvido no feedback negativo da síntese de histamina e H4 medeia quimiotaxia de mastócitos (HOFSTRA *et al.*, 2003).

Segundo Yokoyama *et al.* (1989), o sistema de cininas tem como função a ativação das plaquetas e produção de bradicinina e calicreína. A bradicinina um potente agente vasoativo, produz vasodilatação, induzindo a liberação de fatores de relaxamento vascular derivados do endotélio (EDRFs), contração da musculatura lisa e produção de dor. A calicreína age como um agente quimiotático para neutrófilos.

Os mediadores lipídicos são derivados dos fosfolipídios de membrana, quando uma injúria capaz de danificar a membrana celular, libera frações de fosfolípides, denominados ácidos araquidônicos, através da ação enzimática da fosfolipase A2. O ácido araquidônico, quando liberado não possui efeito inflamatório, entretanto, os produtos do seu metabolismo, via ação enzimática da lipo-oxigenase ou ciclo-oxigenase, são mediadores químicos fundamentais para o desenvolvimento do processo inflamatório. A via das ciclo-oxigenases leva a geração de prostaglandinas, as quais incluem-se PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) e o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), que é um poderoso agregador plaquetário e vasoconstritor, enquanto as prostaglandinas têm funções inflamatórias como febre, hiperalgesia e vasodilatação, potencializando o edema, sendo essenciais para o controle do fluxo sanguíneo necessário para a adesão e diapedese dos leucócitos (SPRINGER, 1994; TSELEPIS; CHAMPMAN, 2002).

Na via das lipo-oxigenases, temos a formação dos leucotrienos. Aqueles que contêm cistenil (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>) geram intensa vasodilatação e aumentam a

permeabilidade vascular e o LTB<sub>4</sub> causa agregação e adesão de leucócitos, além da quimiotaxia (SIQUEIRA; DANTAS, 2000).

As lipoxinas são também mediadores derivados do ácido araquidônico com importante atividade anti-inflamatória, por promover a resolução da inflamação, através do retardo no ingresso de novos neutrófilos ao sítio da inflamação (SERHAN *et al.*, 2000), redução da permeabilidade vascular e estimulação da fagocitose de células mortas (neutrófilos) pelos macrófagos (GODSON *et al.*, 2000).

O Fator ativador de plaquetas (PAF) é um mediador derivado de fosfolipídios de membrana, sintetizado pela maioria das células inflamatórias (mastócitos, basófilos, neutrófilos e plaquetas), e exerce papel importante na resposta inflamatória aguda. Além do seu efeito ativador sobre as plaquetas, causa aumento na permeabilidade vascular, vasodilatação, facilitando a agregação e adesão de neutrófilos, quimiotaxia e estimulação de outros mediadores (BRAQUET *et al.*, 1987).

O Sistema Complemento (SC) é constituído por uma família de mais de 20 glicoproteínas plasmáticas, sintetizadas principalmente no fígado, mas também por macrófagos e fibroblastos. Cada componente ativado no SC adquire atividade proteolítica, ativando os elementos seguintes em cascata. Ao longo do processo, ocorre a produção de diversos mediadores que alteram a permeabilidade vascular e contribuem para o desenvolvimento da resposta inflamatória (ABBAS; HICHTMAN, 2003; MOURA *et al.*, 2001).

Dentre os componentes do SC, o C3a e C5a são os mediadores mais envolvidos no processo inflamatório, pois induzem um aumento na permeabilidade vascular e causam vasodilatação através da liberação de histamina pelos mastócitos e da ativação dos neutrófilos. O C5a ativa a via lipo-oxigenase do metabolismo do ácido araquidônico em neutrófilos e monócitos, intensificando a liberação de mais mediadores inflamatórios; além de estimular a motilidade e adesão dos neutrófilos no endotélio, através da ativação dos neutrófilos e do aumento da avidéz das integrinas (BARRINGTON *et al.*, 2001).

O óxido nítrico, antes denominado Fator de relaxamento do endotélio (EDRF), é uma molécula gasosa, altamente hidrofóbica e facilmente difusível através de membranas biológicas. É sintetizado a partir do oxigênio molecular e do aminoácido L-arginina por um grupo de enzimas conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS) (SCHENKEL, 2006). Existem pelo menos três isoformas de NOS,

cada uma sendo produto de um gene distinto. A NOS neuronal (nNOS ou NOS-1) e a NOS endotelial (eNOS ou NOS-3) são referidas como formas constitutivas, sendo responsáveis pela liberação contínua e basal de NO (MOREIRA *et al.*, 2008). Essas duas isoformas produzem e liberam pequenas quantidades de NO, na ordem de nanomolar, por curto período de tempo em respostas à interação de agonistas (acetilcolina, bradicinina e histamina) via receptores acoplados à proteína G na membrana plasmática, e ainda por estímulos físicos, como o estresse de cisalhamento causado pela circulação sanguínea. A eNOS é encontrada no epitélio vascular e, por gerar baixas concentrações de NO, favorece a diminuição da pressão sanguínea e auxilia na inibição da agregação plaquetária. A nNOS gera NO, que atua na regulação da transmissão neuronal, funcionando como neurotransmissor (MOREIRA, 2004).

A terceira isoforma, a NOS induzida (iNOS ou NOS-2) produz e libera grandes quantidades de NO, na ordem de micromolar, durante longos períodos de tempo quando comparadas às NOS constitutivas, e geralmente está associada aos efeitos citotóxicos e às ações que promovem as patologias vasculares (ALDERTON *et al.*, 2001). A iNOS é encontrada principalmente nos macrófagos (MOREIRA *et al.*, 2008) e sua expressão ocorre em resposta a várias citocinas inflamatórias e, assim sendo, a presença de um agente indutor, como um microorganismo, é capaz de estimular sua atividade enzimática (VASQUES, 2002). Uma vez sintetizado e liberado, o NO é um gás bastante reativo, possuindo um tempo de meia vida muito curto (5 a 10 s), sendo rapidamente metabolizado em nitrito ( $\text{NO}_2$ ) e posteriormente em nitrato ( $\text{NO}_3$ ), que são os seus metabólitos estáveis. As reações químicas do NO são imediatas e variadas, produzindo efeitos diretos ou indiretos em várias funções biológicas importantes (VINCENT *et al.*, 2000).

O NO apresenta propriedades pró- e anti-inflamatórias. Está relacionado com o aumento da permeabilidade vascular, exsudação de fluido (edema), inibição da adesão de plaquetas e leucócitos (TASAKA, 2006) promove o relaxamento e consequente vasodilatação das células musculares lisas subjacentes, quando se difunde para fora das células endoteliais (PALMER *et al.*, 1988) e causa citotoxicidade em microrganismos e células tumorais (TEDGUI; MALLAT, 2001).

### 1.1.5.1 Citocinas

Citocinas são peptídeos simples de baixos pesos moleculares, produzidos e liberados por muitos tipos celulares em resposta a uma variedade de estímulos, como vírus, parasitas, bactérias e seus produtos, bem como em resposta a outras citocinas. Atuam em receptores específicos do tipo tirosina-quinase presentes nas próprias células que as produziram (efeito autócrino), ou em receptores de outras células (efeito parácrino) e ainda podem atingir a circulação sanguínea e agir em tecidos distantes (efeito hormonal) (SOMMER; WHITE, 2010). Em geral, são produzidas transitoriamente, porém possuem potentes efeitos, agindo em concentração de nível picomolar, desencadeando reações em cascata (AKIRA *et al.*, 1990). A maioria das citocinas apresenta múltiplas funções biológicas na manutenção da homeostasia, como diferenciação, sobrevivência, crescimento e metabolismo celular, bem como participam de processos inflamatórios e imunológicos (AGGARWAL; NATARAJAN, 1996; VILCEK, 2003).

Diferentes tipos de células secretam a mesma citocina, e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células, fenômeno denominado pleiotropia. As citocinas são redundantes em suas atividades, ou seja, ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas. Com frequência, são formadas em cascata, ou seja, uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas (ZHANG; AN, 2007). A resposta de uma célula a uma determinada citocina depende da concentração no local, do tipo de célula e de outros reguladores celulares a que estão continuamente expostos. As citocinas interagem em rede: primeiro pela indução mútua, segundo pela transmodulação em receptores da superfície celular e terceiro por interação sinérgica, aditiva ou antagônica na função celular (AKIRA *et al.*, 1990).

São representadas pelas interleucinas (ILs), responsáveis por mediar a comunicação entre leucócitos; fator de necrose tumoral (TNF), que apresentam ações pró- e anti-inflamatórias; interferons (IFN  $\alpha$  e  $\gamma$ ), que atuam principalmente contra infecções virais e crescimentos tumorais; fatores de crescimento mesenquimais e quimiocinas (citocinas quimiotáticas) (CURFS *et al.*, 1997; SOMMER; WHITE, 2010). As citocinas podem ser classificadas conforme sua atividade biológica, a exemplo de exercerem atividade pró-inflamatória (IL-1, IL-6,

TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ ) e/ou anti-inflamatória (IL-4, IL-10, IL-13) (OLIVEIRA *et al.*, 2011; WONG *et al.*, 2003).

Várias citocinas possuem ações inibitórias sobre a produção de outras citocinas, tais como, IL-4, que inibe a produção de TNF- $\alpha$  ou de IL-1 por monócitos e macrófagos; IL-10 que inibe a liberação de citocinas por linfócitos Th1 ou por monócitos e macrófagos; e IL-13, que apresenta potente ação inibitória sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias em monócitos estimulados por LPS (VICELK; LEE, 1994; CURFS *et al.*, 1997).

Portanto, as citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, favorecendo a resolução da agressão. No entanto, a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias a partir da lesão pode manifestar-se sistemicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos. Após lesões ou infecções graves, a resposta exacerbada e persistente de citocinas pró-inflamatórias pode contribuir para lesões em órgão-alvo, levando à insuficiência de múltiplos órgãos e à morte. As citocinas anti-inflamatórias podem minimizar alguns desses efeitos indesejáveis (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

As principais citocinas mediadoras da inflamação são a IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6 e as quimiocinas (IL-8, MIP, MCP-1 e ENA-78) (ALENCAR, 2001). Dentre estas, duas ocupam papel de destaque, a IL-1 e o TNF- $\alpha$ , visto que ambas participam no reparo e na inflamação tecidual por coordenar a atividade de muitas outras células (LARRICK; KUNKEL, 1988).

A IL-1 é produzida por uma variedade de células, incluindo macrófagos, monócitos, linfócitos B e T, neutrófilos, fibroblastos e células endoteliais, em resposta a diversos estímulos exógenos e endógenos. Pode ser secretada sob duas formas moleculares (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), sendo que essas isoformas são aparentemente sintetizadas como precursores polipeptídicos que quando clivados geram peptídeos extracelulares ativos (RAEBURN *et al.*, 2002; ZHANG; AN, 2007). Sua produção pode ser induzida por componentes do sistema complemento (C5a), produtos bacterianos (LPS), virais e parasitários, colágeno, trombina, partículas de sílica, irradiação, como também por outras citocinas (TNF- $\alpha$  e a própria IL-1) (DINARELLO, 1994). Entretanto, sua síntese pode sofrer inibição por outras citocinas, como a IL-4, IL-10, IL-13 e interferon- $\gamma$  (TATAKIS, 1993).

A IL-1 é um componente importante das respostas inflamatória e imune. Ativação de macrófagos, formação de prostaglandinas, indução da febre, neutrofilia

e liberação da proteína C-reativa são algumas das atividades biológicas mediadas pela IL-1. Células em cultura tratadas com TNF- $\alpha$  ou IL-1 tornam-se super adesivas em neutrófilos. Essa adesividade ocorre pela expressão da selectina e ICAM-1 nas células endoteliais, e ativação de integrinas nas células polimorfonucleares, induzidas pela IL-1 e outras interleucinas (BEUTLER; CERAMI, 1988; WAGNER, 2000).

IL-1Ra é um antagonista natural de IL-1 sendo produzido localmente por diversos tecidos em resposta a uma infecção ou inflamação (CURFS *et al.*, 1997). Esta molécula pode ser detectada em altos níveis na circulação e o seu principal papel fisiológico está relacionado com a inibição competitiva dos efeitos produzidos pela IL-1 após ligação ao seu receptor (AREND; GABAY, 2000).

A IL-4 é uma glicoproteína com propriedades anti-inflamatórias e produzida por linfócitos-T-CD4, mastócitos, eosinófilos e basófilos. Tem ação sobre os linfócitos-T e B, células matadoras naturais, mastócitos, sinoviócitos e células endoteliais. Induz a diferenciação de linfócitos-B para produzir IgG e IgE, que são imunoglobulinas importantes nas respostas alérgicas e anti-helmínticas. Atua sobre macrófagos ativados, reduzindo os efeitos das citocinas IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, e inibindo a produção de radicais livres de oxigênio. Em adição ao seu efeito inibitório sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-4 estimula a síntese da citocina antagonista IL-1ra (TE VELDE *et al.*, 1990). Além disso, aumenta a suscetibilidade dos macrófagos aos efeitos dos glicocorticoides (CURFS *et al.*, 1997; SUMMER; WHITE, 2010).

IL-6 é uma glicoproteína produzida por uma variedade de células incluindo fagócitos mononucleares, células T e fibroblastos, sendo TNF- $\alpha$  e IL-1 potentes indutores. É uma citocina pró-inflamatória que promove maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e diferenciação/manutenção de linfócitos-T citotóxicos e células assassinas naturais (CURFS *et al.*, 1997; TOI *et al.*, 1990).

IL-6 é um dos mais precoces e importantes mediadores de indução e controle da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos durante estímulos dolorosos, como trauma, infecção, cirurgias e queimaduras. Após lesão, concentrações plasmáticas de IL-6 são detectáveis em 60 minutos, com pico entre 4 e 6 horas, podendo persistir por 10 dias (GEBHARD *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2000).

Como muitas outras citocinas, IL-6 possui ambas as propriedades pró- e anti-inflamatórias. Alguns dos efeitos regulatórios de IL-6 envolve a inibição da produção de TNF, produzindo um feedback negativo para limitar a resposta inflamatória aguda (HIRANO *et al.*, 1992). IL-6 atenua a liberação de citocinas pró-inflamatórias, além de possuir um pequeno efeito sobre a síntese de citocinas anti-inflamatórias como as IL-10 e fator transformador de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (BARTON *et al.*, 1996; XING *et al.*, 1998). Uma regulação positiva da produção de IL-6 tem sido observada em uma variedade de desordens inflamatórias crônicas e autoimune, como as tireoidites, diabetes tipo 1 e artrite reumatóide (HIRANO *et al.*, 1992; TOI *et al.*, 1992).

O TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral) é uma citocina pró-inflamatória que apresenta papel chave em diversos processos, como a inflamação, imunomodulação, crescimento, angiogênese e citotoxicidade (WAGNER, 2000). É produzida principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos-T, células abundantes no peritônio (ZHANG, 2007). O TNF existe em duas formas biologicamente ativas: uma transmembrana de 26 kDa e outra secretada de 17 kDa. É estruturalmente relacionado à linfotóxina- $\alpha$  (LT $\alpha$ ), uma glicoproteína de peso molecular de 25 kDa, sintetizada por linfócitos estimulados por mitógenos. Após a constatação de uma homologia estrutural e funcional entre TNF e LT, estas moléculas passaram a ser denominadas, TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ , respectivamente (RUDDLE, 1994).

A estimulação na produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos e monócitos se dá principalmente pelo LPS, mas também por outros indutores como IL-1, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, o próprio TNF- $\alpha$ , vírus, antígenos fúngicos ou parasitários e C5a. De outro modo, citocinas como a IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e IFN- $\alpha$  são eficientes em inibir a síntese de TNF- $\alpha$  e IL-1 (OLD, 1985; PHILLIP; EPSTEIN, 1986).

O TNF- $\alpha$  tem importante participação no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório. Os neutrófilos podem responder ao TNF- $\alpha$  pela ativação e expressão de integrinas, produção do fator de agregação de plaquetas (PAF) e outros mediadores granulocíticos. Enquanto as células endoteliais mobilizam selectinas, regulam positivamente as moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e ativam vias pró-coagulantes em resposta a exposição ao TNF- $\alpha$  (CANETTI *et al.*, 2003).

Em resumo, as ações do TNF- $\alpha$  consistem em: ativar a coagulação, estimular a expressão ou liberação de moléculas de adesão, PGE<sub>2</sub>, fator ativador de plaquetas, glicocorticoides e eicosanóides, além de outras citocinas inflamatórias, e influenciar a apoptose celular (CURFS *et al.*, 1997). Entre outros efeitos, destacam-se a ativação de neutrófilos, com consequente degranulação, produção de intermediários reativos de oxigênio (NO), aumento da citotoxicidade para certos patógenos e da atividade fagocítica, quimiotaxia de neutrófilos e de monócitos; aumento da adesão ao endotélio (VERRI *et al.*, 2006). Contudo, o TNF- $\alpha$  não pode ser considerado um fator quimiotático clássico, uma vez que não induz a migração de neutrófilos *in vitro*; no entanto, promove a síntese e liberação de fatores quimiotáticos, como as quimiocinas, pelas células endoteliais e residentes (FACCIOLI *et al.*, 1990).

#### 1.1.5.2 Quimiocinas

As quimiocinas constituem uma grande família de citocinas quimiotáticas estruturalmente homólogas, formadas por pequenos polipeptídeos de 8 a 12 kDa; subdivididas em famílias pelo número e a localização dos resíduos de cisteína N-terminais. As duas principais famílias são as da quimiocinas CC (ex. RANTES, MCP-1 e MIP-1) nas quais os resíduos de cisteína são adjacentes, e a família CXC, como a IL-8, em que esses resíduos são separados por um aminoácido (KUNKEL; BUTCHER, 2002). As quimiocinas que contêm a sequência ácido glutâmico-leucina-arginina precedendo a sequência CXC são quimiotáticas para os neutrófilos (IL-8), enquanto as que apresentam outra sequência, como a IL-10, atraem linfócitos T e B. Já as quimiocinas CC exercem seus efeitos sobre monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos, mas geralmente não recrutam neutrófilos (DEVRIES *et al.*, 1995; PROUDFOOT *et al.*, 2003).

As quimiocinas exercem maior parte dos seus efeitos através da ativação de receptores acoplados à proteína-G, presentes na superfície celular (exemplos: CCR1, CCR2, CCR5, CXCR3 e CXCR4). Esses receptores podem ser específicos para uma dada quimiocina, mas, comumente, um mesmo receptor pode ligar-se a várias quimiocinas do mesmo grupo (KUNKEL; BUTCHER, 2002). A ligação quimiocina-receptor inicia uma complexa cascata de sinalização que gera respostas

quimiotáticas, degranulação, liberação de EROs e alteração na afinidade das integritas presentes na superfície celular (CYSTER, 1999).

As quimiocinas envolvidas em reações inflamatórias são secretadas nos sítios de infecção e inflamação por células que compõem o parênquima, leucócitos recrutados e células endoteliais ativadas por citocinas. A IL-8 é uma importante quimiocina ativadora de neutrófilos, sendo demonstrado que, o sequestro para matriz subendotelial da IL-8 produzida pelo endotélio, permite a manutenção de um gradiente estável de quimiocinas para a migração direta de neutrófilos (HUBER *et al.*, 1991). Essa quimiocina é bastante utilizada como ferramenta farmacológica em modelos experimentais de inflamação, em função dos seus efeitos sobre os neutrófilos. Dependendo do tipo de espécie envolvida, recebe diferentes denominações, como IL-8 em humanos, MIP em camundongos e KC em ratos (VERRI *et al.*, 2006).

## 1.2 Biomoléculas vegetais na modulação da resposta inflamatória

Plantas e moléculas vegetais consistem em uma estratégia alternativa na procura de novos agentes terapêuticos, sendo uma das mais antigas armas empregadas para o tratamento das doenças humanas e muito se conhece a respeito do seu uso popular. Compostos identificados em diferentes tecidos e órgãos vegetais são frequentemente responsáveis pelo crescente desenvolvimento da medicina moderna (MORALE *et al.*, 1998).

O uso de produtos naturais para o desenvolvimento de novos medicamentos oferece inúmeras vantagens, incluindo a grande variedade de estruturas químicas, possibilidade de utilização como “banco de moléculas” para *screenings*, além de serem uma fonte biológica renovável, cuja obtenção racional não causará efeitos maléficos ao meio ambiente (CALIXTO, 2001).

O estudo dos mecanismos e dos mediadores envolvidos no processo inflamatório vem sendo alvo de inúmeras pesquisas, visando a elucidação do mecanismo das respostas imunológicas desencadeadas por diversas doenças inflamatórias, bem como a descoberta de ferramentas farmacológicas para a resolução destas patologias.

Uma variedade de substâncias derivadas do metabolismo secundário das plantas, como polissacarídeos, peptídeos, lectinas, saponinas, óleos essenciais e

outras são capazes de estimular o sistema imune, apresentando atividade imunomoduladora (LIMA, 2007). Imunomoduladores são agentes capazes de modificar a resposta imune, podendo o efeito ser estimulatório ou inibitório. Os agentes estimulantes ou adjuvantes imunes, além de serem capazes de restaurar a resposta imune normal, estimulam o estado imunológico dos indivíduos susceptíveis à agentes invasores (DUTTA, 2002). As proteínas bioativas, incluindo as lectinas, podem constituir-se em um importante agente imunomodulador e antitumoral (GONZÁLEZ DE MEJÍA; PRISECARU, 2005).

Diversas plantas lactíferas têm sido estudadas por apresentarem uma fonte interessante de moléculas biologicamente ativas, e seu uso é frequentemente reportado na medicina popular (SOARES *et al.*, 2005). Além dos componentes celulares, os fluidos laticíferos são constituídos por uma grande variedade de substâncias como, por exemplo, carboidratos, lipídeos e proteínas (MORCELLE *et al.*, 2004). Também já foram encontrados diversos metabólitos secundários na composição dos fluidos laticíferos, tais como alcaloides, cardenolídeos, compostos fenólicos, terpenos, poli-isopreno, taninos e flavonoides (AGRAWAL; KONNO; 2009).

A *Calotropis procera* é uma planta lactífera que vêm se destacando diante da descoberta de importantes propriedades farmacológicas do seu látex: atividade antifúngica, antimicrobiana, anticancerígena (CHOEDON *et al.*, 2006; HUSSEIN; KINGSTON, 1981; OLIVEIRA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010; SHUKLA; MURTI, 1961) ação antidiarreica (KUMAR *et al.*, 2001) e efeito analgésico (KUMAR *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2005).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, já demonstraram que a fração proteica isolada do látex (PL) da *Calotropis procera* parece agir como um potente agente anti-inflamatório, em três diferentes modelos experimentais de inflamação: peritonite, edema de pata e cistite hemorrágica, quando administrada por via endovenosa. Os resultados sugerem que as moléculas ativas responsáveis pelos efeitos na inflamação são de natureza proteica, apesar da presença de metabólitos secundários numerosos que ocorre naturalmente no látex de *C. procera* (ALENCAR *et al.*, 2004).

Em adição, esta fração proteica, quando administrada via i.p., apresentou um efeito relevante sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal (ALENCAR *et al.*, 2006). O estímulo inflamatório das proteínas de *C. procera*

aumentou a fagocitose e equilibrou a liberação de óxido nítrico no sangue, evitando o choque séptico induzido pela infecção por *Salmonella* (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Sendo sugerido que o efeito biológico exercido por PL sobre a migração de neutrófilos depende da via de administração utilizada.

### 1.3 Látex e plantas lactíferas

No reino vegetal, existem mais de 12.000 espécies, distribuídas em torno de 22 famílias, capazes de produzir látex ao serem submetidas às agressões mecânicas. O látex é uma secreção vegetal que se apresenta geralmente como um líquido de aspecto leitoso, mas em determinadas plantas pode ter coloração avermelhada, amarelada, escura, transparente e ser mais viscoso ou não (ENDRESS; BRUYNS 2000; PICKARD, 2008). Este exsudato não apresenta nenhuma função metabólica conhecida para o vegetal, mas tem como principal atividade proteger a planta contra herbívoros, microorganismos ou dano mecânico selando o tecido danificado (AGRAWAL; KONNO, 2009).

Entre as famílias de plantas produtoras de látex, destacam-se a Euphorbiaceae (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1987) e Apocynaceae (BROCKBANK; LYNN, 1979), embora outras famílias como Moraceae, Compositae, Anarcadiaceae e Sapotaceae também produzam o látex (DELTA, 1982).

A planta laticífera mais conhecida e estudada é a Seringueira (*Hevea brasiliensis*), uma árvore nativa da Amazônia, também conhecida como “árvore da borracha”. A partir do látex desta planta são produzidos inúmeros produtos derivados da borracha de grande importância comercial (SUSSMAN *et al.*, 2002). Como o látex de *H. brasiliensis* é intensamente explorado, a maior parte dos estudos bioquímicos já desenvolvidos com fluidos laticíferos se refere ao látex desta planta. Entretanto, muitas outras espécies de plantas produzem constitutivamente algum tipo de látex (YEANG *et al.*, 2002), e algumas delas, como *Carica papaya*, *Papaver somniferum*, *Cannabis sativa* e *Calotropis procera*, por exemplo, vêm sendo estudadas por apresentarem propriedades bioquímicas consideravelmente interessantes (HAGEL *et al.*, 2008).

A grande diversidade de compostos identificada nos látex de diferentes plantas indica que o tecido especializado na produção deste exsudato deve estar envolvido em eventos biológicos distintos no vegetal, que vão desde o acúmulo de

substâncias precursoras da borracha até compostos relacionados à defesa do vegetal contra pragas e patógenos, como algumas proteinases que apresentam atividade bactericida e/ou antifúngica, incluindo também outras moléculas biologicamente ativas, como glicosídeos, taninos, flavonoides e proteínas solúveis (KEKWICK, 2001; LARHSINI *et al.*, 1997; PEREIRA *et al.*, 1999; SHUKLA; MURTI, 1961).

As proteases representam maior porcentagem das proteínas presentes no látex e parecem desempenhar papel relevante para o desenvolvimento de respostas da planta frente aos patógenos externos resultando em uma defesa eficaz. Além disso, estas enzimas são capazes de ativar receptores específicos de proteases agindo desta forma como relevantes agentes farmacológicos ou toxicológicos (HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008).

Dentre a grande variedade de proteínas já identificadas no látex de plantas temos beta-1,3-glucanases (CHEYE; CHEUNG, 1995), lisozimas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) (GIORDANI; LAFON, 1993), lectinas, quitinases (JEKEL *et al.*, 1991), amilases (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1987), inibidores de proteinases (ARCHER, 1983; SRITANYARAT *et al.*, 2006), oxidases (AGRAWAL; KONNO, 2009) dentre outros. Mais de 110 plantas produtoras de látex distribuídas em diferentes famílias são conhecidas por apresentar atividade proteolítica. Estas são pertencentes à classe das proteinases cisteínicas, serínicas e aspárticas (DOMSALLA; MELZIG, 2008).

A ocorrência de efeitos colaterais indesejáveis ao se utilizar o látex de forma íntegra no tratamento de doenças tem sido atribuída à presença do *cis*-poliisopreno (borracha) (KUMAR *et al.*, 2006), ou à presença de pequenas quantidades de proteínas remanescentes em produtos manufaturados de borracha, denominadas proteínas alergênicas (FREITAS *et al.*, 2007). Trabalhos têm sido realizados no sentido de eliminar a fração correspondente à borracha e componentes de baixo peso molecular (ALENCAR *et al.*, 2006).

#### **1.4 *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.**

A planta *Calotropis procera* pertence à família Apocynaceae, originária da Ásia e África, e atualmente, encontra-se disseminada nas regiões tropicais do planeta, sendo muito abundante na região Nordeste do Brasil (DUBEY;

JAGANNADHAN, 2003). O seu nome é derivado do grego “kalos” = belo, “tropis” = barco e proceras do latim “procerus” = alto, esbelto. A planta *C. procera* possui vários nomes populares de acordo com a região onde se encontra: algodão-de-seda (PE), flor-de-seda, ciúme ou hortências (CE), paininha-de-seda (SP) e leiteiro (SP, MG). É uma planta perene, arbustiva, ereta, pouco ramificada, podendo atingir entre 3 a 4 metros de altura, mas geralmente ficando com menor porte quando ocorre em solo de baixa fertilidade. Apresenta como característica peculiar uma intensa produção de látex branco que flui abundantemente quando se rompem os tecidos, principalmente nas partes verdes da planta (LORENZI; MATOS, 2002) (Figura 1).

#### **1.4.1 Potencial farmacológico da planta *Calotropis procera***

Diferentes partes da planta *C. procera* possuem um número variado de propriedades farmacológicas, tais como: caule, frutos, flores, raízes, folhas e o látex. Na medicina tradicional indiana, essa planta tem sido utilizada para tratar uma variedade de doenças incluindo lepra, úlceras, tumores, hemorroidas, reumatismo, doenças do baço, fígado e abdômen (WARRIER *et al.*, 1994). No estado do Ceará a planta é usada pela população de baixa renda para doenças de pele causadas por bactérias ou fungos.

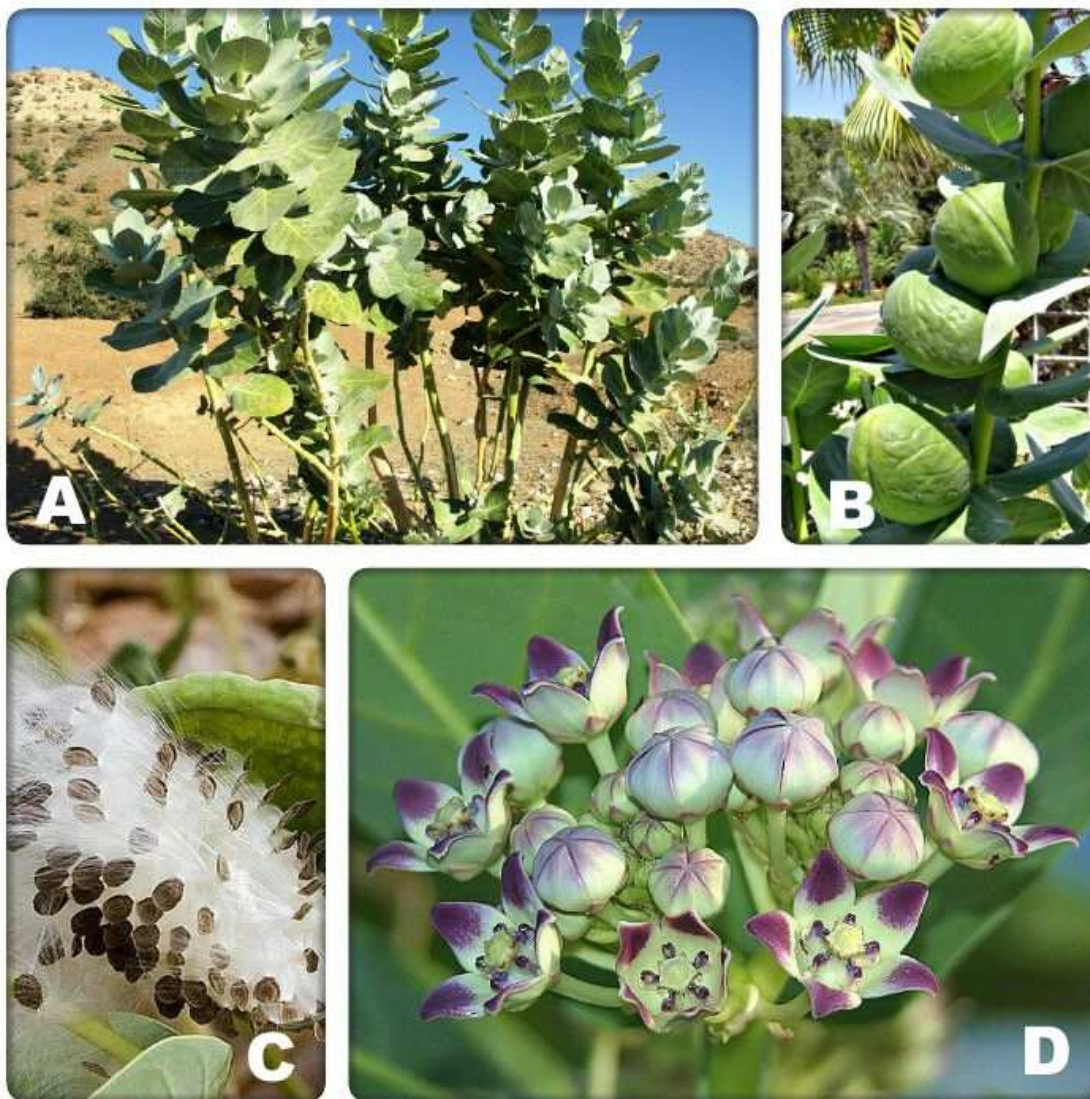
Estudos realizados com as suas flores, demonstraram atividade citotóxica contra células cancerígenas humanas (SMIT *et al.*, 1995) efeito anti-inflamatório em modelo de inflamação induzida por carragenina; antipirético e diminuição das contorções abdominais induzidas por ácido acético (MASCOLO *et al.*, 1988), além da atividade hepatoprotetora em hepatite causada por paracetamol (RAMACHANDRA *et al.*, 2007) e efeito anti-helmíntico *in vivo* e *in vitro* (IQBAL *et al.*, 2005).

Nas cascas do tronco de *C. procera*, foi demonstrado propriedades antitussígena (DIEYE *et al.*, 1993), anti-inflamatória em edema de pata induzido por carragenina e ação protetora da mucosa gástrica em úlceras causadas por ácido acetilsalicílico e etanol (TOUR; TALELE, 2011) e ainda atividade antiproliferativa de células tumorais (MAGALHÃES *et al.*, 2010).

As raízes desta planta apresentam atividade antitumoral (MATHUR *et al.*, 2009; VAN QUAQUEBEKE *et al.*, 2005), anti-inflamatória em modelo de artrite induzida por formaldeído e adjuvante completo de Freud (BASU; CHAUDHURI,

1991; PARIHAR *et al.*, 2011), assim como atividade antiulcerosa (SEN; BASU; CHAUDURI, 1998).

**FIGURA 1 – Aspecto geral da planta *Calotropis procera*.**



**(A)** Arbusto bem desenvolvido na forma adulta (<http://www.teline.fr/eng/Photographs/All-Families/Apocynaceae/Calotropis-procera>); **(B)** Frutos globosos ([http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=calotropis&lang=1](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=calotropis&lang=1)); **(C)** Sementes envolvidas com fios de seda (<https://www.flickr.com/photos/mayankbhatnagar/1284014199/>); **(D)** Flores de cor roxa (<http://portuguese.alibaba.com/product-tp/calotropis-procera-112504788.html>).

### 1.4.2 Potencial farmacológico do látex de *Calotropis procera*

Grande parte das atividades farmacológicas relevantes da *Calotropis procera* está relacionada ao seu látex. Em análises químicas dos extratos brutos do látex de *C. procera*, diversos compostos têm sido identificados, tais como cardenolídeos ativos, enzimas proteolíticas, alcalóides e carboidratos (SEIBER *et al.*, 1982), além de esteróides, terpenos e carbonatos orgânicos (GALLEGOS-OLEA *et al.*, 2002). Mais recentemente foram identificadas no látex de *C. procera* duas proteases cisteínicas (DUBEY; JAGANNADHAM, 2003; SINGH *et al.*, 2010) e uma osmotina (FREITAS *et al.*, 2011), além da presença de uma proteína com atividade de inibidor de papaína (RAMOS *et al.*, 2010).

A presença de proteínas relacionadas à defesa contra patógenos (PR-Proteínas), como glucanases e quitinases (JEKEL *et al.*, 1991; VAN LOON; VAN STTRIEN, 1999), proteinases (FREITAS *et al.*, 2007; KONNO *et al.*, 2004; MOUSSAOUI *et al.*, 2001) e inibidores de proteinases (MONTIL *et al.*, 2004; SRITANYARAT *et al.*, 2006), fortalece a hipótese de que essa secreção age como uma defesa da planta contra o ataque de insetos e patógenos. Proteínas do látex de *Calotropis procera* apresentaram ação nociva para várias pragas agrícolas (RAMOS *et al.*, 2007b) e provavelmente um inibidor de protease pode estar envolvido nos efeitos deletérios observados (RAMOS *et al.*, 2009b).

Estudos com modelos animais demonstraram alguns efeitos tóxicos do látex de *C. procera*, como injúria endotelial permanente e até efeitos letais (BIEDNER *et al.*, 1977; HANDA *et al.*, 1984; PADHY; KUMAR, 2005). Entretanto suas aplicações potenciais parecem sobrepôr as suas limitações, uma vez que muitas propriedades farmacológicas já foram demonstradas, como cicatrizante, antitumoral, antipirética, analgésica, inflamatória e anti-inflamatória, dentre outras (ALENCAR *et al.*, 2006; ARYA; KUMAR, 2005; CHOEDON *et al.*, 2006; DEWAN *et al.*, 2000a; DEWAN *et al.*, 2000b; KUMAR; BASU, 1994; RASIK *et al.*, 1999; SANGRAULA *et al.*, 2002), necessitando de estudos adicionais que possam garantir o seu uso com segurança.

O látex bruto, extraído diretamente da planta, pode apresentar efeitos variados de acordo com o tipo de solvente usado para extração e/ou a via de administração utilizada. Estudos mostram que o produto da extração do látex com solvente orgânico possui atividade antibacteriana (SHUKLA; KRISHNAMURTI, 1961;

LARHSINI *et al.*, 1997), moluscicida (HUSSEIN *et al.*, 1994), esquistossomicida (SHARMA; SHARMA, 2000) e antifúngica contra *Candida albicans* (SEHGAL *et al.*, 2005).

O látex de *C. procera* em preparações aquosas, administradas por via oral, apresentou efeito antipirético (LARHSINI *et al.*, 2002) e foi capaz de reduzir a diarreia em ratos induzida pela ingestão de óleo de mamona (KUMAR *et al.*, 2001) inibiu a inflamação induzida por Carragenina (KUMAR; BASU, 1994) e reduziu as contorções abdominais induzida por ácido acético (DEWAN *et al.*, 2000). Entretanto, dependendo da via de administração, o extrato aquoso deste látex induz processos pró-inflamatórios em animais (SINGH *et al.*, 2000; SHIVKAR; KUMAR, 2003). O látex bruto administrado diretamente na pata de ratos apresentou efeitos pró-inflamatórios, evidenciados pelo edema e hiperlagesia, com envolvimento da prostaglandina, histamina e serotonina (KUMAR; SHIVKAR, 2004; KUMAR; SEHGAL, 2007).

Os efeitos do látex de *C. procera* na resposta imune têm sido particularmente investigados. O extrato metanólico do látex reduziu o estímulo inflamatório induzido pelo adjuvante de Freud no modelo experimental de artrite (KUMAR; ROY, 2007). Além disso, a capacidade anti-inflamatória parece ser comparável à da fenilbutazona em modelos de inflamação aguda e crônica (ARYA; KUMAR, 2005; SANGRAULA *et al.*, 2002).

Em 2004, Alencar *et al.* iniciaram uma linha de estudo no intuito de investigar propriedades farmacológicas e bioquímicas de frações proteicas (PL) do látex de *C. procera*, isentas de borracha, metabólitos secundários e moléculas com massa molecular inferiores a 8000 Da, obtidas a partir do látex bruto por processos de diálises, centrifugações e cromatografias (RAMOS *et al.*, 2009).

Os primeiros resultados encontrados demonstraram que PL administrada por via intravenosa era capaz de reduzir o processo inflamatório nos modelos experimentais de peritonite e edema de pata induzidos por carragenina e cistite hemorrágica por ciclofosfamida em camundongos (ALENCAR *et al.*, 2004). Importante atividade antinociceptiva da fração proteica foi demonstrada em modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, lambadura da pata induzida por formalina e placa quente (SOARES *et al.*, 2005).

Com intuito de elucidar quais moléculas ativas participam no efeito anti-inflamatório da fração proteica do látex, esta foi submetida ao fracionamento em

coluna de CM-Sepharose em pH 5,0, e os picos obtidos (PI, PII e PIII) foram testados em modelos animais. Como resultado, observou-se que as três subfrações apresentaram atividade anti-inflamatória na peritonite por carraginitina, reduzindo o rolamento e adesão de leucócitos, sendo estes efeitos mais significativos em animais tratados com PI, possivelmente relacionado com o aumento de óxido nítrico, uma molécula envolvida no processo de migração celular na resposta inflamatória, que em alta quantidade no soro inibe a diapedese. Neste estudo, considerável avanço foi realizado quanto à identificação das moléculas envolvidas nos eventos farmacológicos promovidos pelo látex, possibilitando demonstrar que diferentes proteínas do látex desempenham suas atividades através de mecanismos distintos (RAMOS *et al.*, 2009).

Em modelos de infecção bacteriana sistêmica induzida por *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium em camundongos, PL demonstrou efeito benéfico aumentando o tempo de sobrevivência dos animais, por meio da modulação de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-12), óxido nítrico e uma atividade imunoestimulante (LIMA-FILHO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012). A análise do perfil celular e bioquímico sanguíneo revelou que PL protegeu os animais da infecção bacteriana por um mecanismo de ação indireto (imunostimulação), evitando a leucopenia provocada pela infecção, uma vez que PL não apresentou ação *in vitro* contra *S. Typhimurium* (LIMA-FILHO *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2009).

Recentemente foi demonstrado que PL diminui a resposta inflamatória da mucosite oral induzida por 5-fluorascil em hamsters através de uma regulação negativa na liberação de citocinas pró-inflamatórias (FREITAS *et al.*, 2012). Atenuou as limitações funcionais na artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund, inibindo a inflamação, dor e o estresse oxidativo, com ações comparáveis ao diclofenaco (KUMAR *et al.*, 2014).

Estudos com biomembranas contendo PL demonstraram que a sua aplicação tópica acelerou o processo de cicatrização de feridas, intensificando a fibroplasia e a deposição de colágeno, importantes para o remodelamento tecidual (FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

Quanto a segurança do seu uso, relatos de eventos toxicológicos e até letais são observados quando o látex de *C. procera*, na sua forma íntegra, é dado por via oral a mamíferos (EL-BADWI *et al.*, 1998). Por outro lado, a fração proteica (PL) administrada diariamente em animais por 35 dias consecutivos não alterou os

parâmetros bioquímicos sanguíneos, renais e hepáticos, mantendo-se rigorosamente similares aos do grupo controle. A toxicidade aguda não foi relatada nesse estudo (RAMOS *et al.*, 2006).

### 1.5 Relevância e Justificativa

A resposta inflamatória constitui um mecanismo de defesa, essencial para manutenção da homeostase tecidual, proteção contra infecções e mediação da resposta imune, cujo objetivo final é a eliminação da causa inicial da lesão celular e das possíveis consequências decorrentes desta lesão (HENSON, 2005). O influxo de neutrófilos em resposta a um estímulo agressor é um passo limitante mediador das vias de respostas imunoinflamatórias e é extremamente importante para o controle da lesão no foco inflamatório. Assim, substâncias capazes de restabelecer a capacidade de migração dos neutrófilos, recuperando a sua função de defensor do organismo, terão um potencial para o desenvolvimento de novas terapias para pacientes imunodeficientes ou portadores de doenças inflamatórias crônicas.

O látex da planta *Calotropis procera*, apresenta propriedades farmacológicas anti-inflamatórias, pró-inflamatórias e/ou imunomodulatória envolvendo mecanismos celulares, vasculares; e a liberação ou inibição de importantes mediadores inflamatórios (ALENCAR *et al.*, 2006, 2004; KUMAR *et al.*, 2011; LIMA-FILHO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2009; RAMOS *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2005). As proteínas extraídas deste látex são moléculas bioativas detentoras de múltiplos efeitos biológicos já comprovados, sobretudo, com ação significativa sobre processos imunomodulatórios (ALENCAR *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2009a).

Inúmeros trabalhos têm sido realizados com objetivo de elucidar o mecanismo das respostas imunológicas desencadeadas por diversas doenças inflamatórias, bem como a descoberta de medicamentos para a resolução dessas patologias. Nesse contexto, acreditamos que este estudo possa sugerir uma aplicação biotecnológica para as proteínas do látex de *C. procera* como substâncias úteis na construção de medicamentos alternativos com propriedades imunomodulatórias.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar, *in vivo* e *in vitro*, a resposta inflamatória aguda induzida pela fração proteica isolada do látex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br, e demonstrar os possíveis mecanismos e mediadores químicos envolvidos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de PL administrada intraperitonealmente, sobre a migração de neutrófilos e permeabilidade vascular nesta cavidade;
- Verificar o envolvimento de células residentes (macrófagos e mastócitos) na resposta inflamatória induzida por PL;
- Investigar possíveis mediadores envolvidos na resposta inflamatória induzida por PL;
- Avaliar o efeito de PL sobre a migração de neutrófilos em uma bolsa de ar subcutânea (“Air pouch”), bem como a liberação de citocinas e NO nesta cavidade;
- Avaliar o efeito de PL sobre a quimiotaxia (rolamento e adesão) dos leucócitos na microcirculação mesentérica;
- Avaliar o efeito de PL sobre a quimiotaxia e a liberação de mediadores inflamatórios por neutrófilos em modelo *in vitro*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Drogas e reagentes

- Azul de Evans (Sigma);
- Azul de toluidina (Sigma);
- Álcool etílico absoluto P.A. (Synth);
- Celecoxibe (Merck);
- Cloreto de Sódio (NaCl, Merck);
- Composto 48/80 (Sigma);
- Corante HEMA 3;
- Dexametasona - Decadron® (Aché);
- Dihidrocloro de 1,2-fenilenodiamina (ortofenileno diamina, OPD) (Sigma);
- Dimetil sulfóxido - DMSO® (Sigma);
- N-formil-metil-L- metionil-L- leucil-L-fenilalanina (fMLP) (Sigma);
- Heparina - Hemofol® (Cristália);
- Iodopolividona – Riodeine® (Rioquímica);
- Indometacina (Sigma);
- Meclizina - Meclin® (Aspen);
- PCA (Sigma);
- Pentoxifilina (Merck);
- Polimixina B (Sigma);
- Prostaglandina E<sub>2</sub>/ PGE<sub>2</sub> (R&D Systems);
- Reagente de Turk (Ácido acético e violeta de genciana – Isofar);
- Talidomida (CEME);
- Tioglicolato (Lab Difco Ltda);
- Zymosan (Sigma).

A maioria das substâncias foi preparada em solução estéril de NaCl 0,15 M ou água bidestilada. A Talidomida e PCA foram dissolvidos em DMSO (<10% do volume final). Indometacina foi dissolvida em Tris-HCl e o tioglicolato, em água bidestilada, sendo aquecido para sua completa solubilização.

### 3.2 Aparelhos e instrumentos laboratoriais

- Agitador/aquecedor, modelo 258 (Fanen®);
- Balança analítica digital, modelo Ay220 (Shimadzu);
- Balança para pesagem dos animais, modelo SF-400 (Kitchenscale);
- Banho-maria, modelo 100 (FANEN);
- Câmaras de Neubauer (0,100/0,0025 mm<sup>2</sup>);
- Centrífuga refrigerada, modelo marathon 26 KMR (Fisher Scientific);
- Citocentrífuga, modelo 2000D (Cientec);
- Estufa, modelo MA033 (Marconi);
- Microcâmara de 48 poços (NEUROPROBE Inc. CABIN JOHN, MD);
- Microscópio óptico binocular, modelo 021 (Quimis');
- Pipetas automáticas (Jencons®).

### 3.3 Obtenção da fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL)

A fração proteica utilizada neste trabalho foi extraída do látex da planta *Calotropis procera* (Ait) R. Br. Essa espécie vegetal foi identificada pelo Prof. Dr. Edson de Paula Nunes, taxonomista do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC), onde o exemplar de exsicata N° 32.663 foi depositado.

A coleta do látex foi realizada por meio de incisões no ápice caulinar de plantas saudáveis em tubos do tipo Falcon com água destilada (1:2 v/v). Vale ressaltar que o procedimento de coleta do látex em água minimiza o efeito natural de “coagulação” que ocorre nesse fluido logo após sua exsudação. Após a coleta, os tubos foram levemente agitados e mantidos à temperatura ambiente até o seu processamento no laboratório.

O processamento do látex foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais da Universidade Federal do Ceará, sob a supervisão do Prof. Dr. Márcio Viana Ramos. Inicialmente, o látex foi submetido à centrifugação a 5.000 x g; 10 °C por 10 minutos e o precipitado obtido, constituído principalmente de borracha, foi descartado. O sobrenadante foi, então, submetido à diálise contra água destilada (1:10 v/v) a 8 °C durante 60 horas, com trocas da água a cada 4 horas, utilizando uma membrana de diálise com capacidade de retenção de

moléculas com massa molecular superior a 8.000 Da. Em seguida, o material foi novamente centrifugado sob as mesmas condições anteriores, e um sobrenadante límpido, rico em proteínas e destituído de borracha foi obtido (ALENCAR *et al.*, 2006). Esta fração, designada como Proteínas do Látex (PL), foi liofilizada e utilizada nos experimentos deste trabalho.

### **3.4 Animais experimentais**

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) machos, pesando entre 25 e 30 gramas. Todos os animais foram provenientes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC e mantidos no Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Estes animais receberam ração balanceada e água *ad libitum*, permanecendo em gaiolas apropriadas, sob condições de temperatura (25°C) e ciclo claro/escuro controlados.

Os protocolos utilizados neste trabalho estão de acordo com os padrões éticos estabelecidos pelo comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Federal do Ceará (protocolo: 24/09).

### **3.5 Modelos Experimentais**

#### **3.5.1 Avaliação do efeito da fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal.**

A migração de neutrófilos induzida pela fração PL do látex de *Calotropis procera* foi avaliada após sua administração intraperitoneal (i.p.) nas concentrações de 0,15; 0,3; 1 e 3 mg/cavidade em 200 µl de NaCl 0,15 M estéril. Animais dos grupos controle negativo e positivo receberam NaCl 0,15 M estéril (200 µl/cav) e zymozan (1 mg/200 µl/cav), respectivamente.

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical ao final de 4 horas após a administração de PL. Em seguida, as células presentes na cavidade peritoneal foram coletadas através da lavagem com 3 ml de NaCl 0,15 M estéril contendo 5 UI/ml de heparina. Os abdomens dos animais foram levemente massageados e através de uma incisão foram coletados cerca de 2 ml de fluido

peritoneal, com pipeta de Pasteur. As contagens total e diferencial de leucócitos foram realizadas conforme metodologia descrita por Souza e Ferreira (1985). Nesse procedimento, 20 µl do fluido coletado de cada animal foram diluídos em 380 µl do reagente de Turk e posteriormente usados para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células foi realizada através de esfregaços corados em lâminas. Para tanto, 50 µl do lavado foram centrifugados em citocentrífuga a 400 x g, durante 10 min. Após esse processo, os esfregaços foram corados com hematoxilina-eosina (corante HEMA 3). A contagem diferencial dos leucócitos foi feita usando-se microscopia óptica e expressa como a média  $\pm$  E.P.M. do número de neutrófilos/µl do fluido peritoneal e comparados aos valores obtidos nos grupos controle do experimento, ou seja, animais que foram injetados apenas com NaCl 0,15 M estéril.

### **3.5.2 Efeito da fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) associada à polimixina B sobre a migração de neutrófilos.**

A relação da migração de neutrófilos no modelo de peritonite com possíveis contaminações das preparações de PL com endotoxina foi avaliada através do protocolo descrito por Arruda *et al.*, 2003. PL (5 mg/ml) foi incubada (30 min, 37 °C) com sulfato de polimixina B (10 µg/ml). Em seguida, animais foram tratados com NaCl 0,15 M estéril (Sal; i.p), PL (1 mg/cav) ou PL associado à polimixina B. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após o tratamento.

### **3.5.3 Curso Temporal da Migração de Leucócitos para cavidade peritoneal induzida pela fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL).**

A fração PL de *Calotropis procera* foi administrada por via intraperitoneal (i.p) nos animais na menor concentração que apresentou efeito pró-inflamatório (1 mg/cav). Animais do grupo controle receberam apenas NaCl 0,15 M estéril (i.p). Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical ao final de intervalos de tempo que variaram de 2, 4, 8, 24 e 48 horas, sendo a migração de leucócitos avaliada no fluido peritoneal, conforme descrito no item 3.5.1.

#### **3.5.4 Avaliação do efeito da fração PL sobre a migração de neutrófilos, após incremento da população de macrófagos residentes na cavidade peritoneal (pré-tratamento com tioglicolato).**

Tioglicolato (Tg; 3 % v/v; 1 ml i.p.) foi administrado por via intraperitoneal e 4 dias após os macrófagos peritoneais foram coletados, contados e comparados com a contagem obtida em grupo de animais não tratados com Tg (controle), de acordo com o método descrito por Ribeiro *et al.* (1991).

A Fração PL de *C. procera* (1 mg/200 µl/cav) e fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/cav – um agente quimiotático direto) foram administrados i.p. em animais tratados ou não com tioglicolato. Conforme descrito para o modelo de peritonite, a migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após a injeção dos estímulos, sendo os resultados comparados com os obtidos em animais que receberam somente NaCl 0,15 M estéril (i.p.).

#### **3.5.5 Avaliação do efeito da fração PL sobre a migração de neutrófilos, após depleção de mastócitos peritoneais (pré-tratamento com o composto 48/80).**

A depleção de mastócitos da cavidade peritoneal dos animais pelo composto 48/80, foi realizada pelo método descrito anteriormente por Di Rosa *et al.* (1971). Para tanto, os animais foram pré-tratados i.p., durante quatro dias consecutivos, duas vezes ao dia com o composto 48/80. As dosagens utilizadas foram: no primeiro dia 0,6 mg/kg, no segundo dia 1,0 mg/kg, no terceiro dia 1,2 mg/kg e no quarto dia 2,4 mg/kg. No quinto dia após o início do tratamento, a depleção dos mastócitos foi avaliada através da coleta do fluido peritoneal dos animais o qual foi diluído (1:5) em azul de toluidina e a contagem realizada em câmara de Neubauer. Os resultados foram comparados aos obtidos no grupo de animais não tratados com o composto 48/80. A viabilidade celular foi avaliada, observando-se o número de mastócitos íntegros ou degranulados e também pela presença de células contaminantes.

PL na concentração de (1 mg/cav), NaCl 0,15 M estéril (1 ml i.p.) e fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/cav.) foram injetados i.p. em animais tratados ou não com composto 48/80. A migração de neutrófilos foi quantificada 4 horas após a injeção dos estímulos e os resultados comparados aos respectivos controles

### **3.5.6 Efeito de diferentes moduladores farmacológicos sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL).**

Com o objetivo de se investigar os possíveis mediadores envolvidos na migração de neutrófilos induzida pela fração, PL foi administrada i.p. (1 mg/cav.) em diferentes grupos de animais pré-tratados com os bloqueadores farmacológicos: dexametasona (0,5 mg/kg; s.c.); talidomida (50 mg/kg; s.c.); celecoxibe (30 mg/kg, s.c.); pentoxifilina (100 mg/kg, s.c.) e meclizina (40 mg/kg; s.c.) 1 hora antes da administração de PL, e indometacina (3 mg/kg; s.c) ou PCA (10 mg/kg; s.c.), 30 minutos antes da administração da PL. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após a administração da PL como descrito anteriormente no item 3.5.1. Os resultados foram comparados com os do grupo controle positivo de migração (animais tratados i.p. somente com a fração) e com o grupo controle negativo (animais que receberam somente NaCl 0,15 M estéril).

### **3.5.7 Determinação do efeito da fração PL sobre a permeabilidade vascular em camundongos.**

Esse método foi delineado com o objetivo de avaliar o efeito do látex sobre o aumento da permeabilidade vascular no peritônio dos animais tratados. A quantificação baseou-se naquela utilizada por Garcia-Leme e Wilhelm (1975). Os animais receberam PL (1 mg/cav; i.p.), NaCl 0,15 M estéril (200 µl; i.p) ou Zymozan (1 mg/cav; i.p.) e em seguida administrou-se o Azul de Evans (50 mg/kg) pelo plexo orbital. Após duas ou três horas os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os abdomens dos animais foram levemente massageados, e através de uma incisão foram coletados cerca de 1 ml de fluido peritoneal, com pipeta de Pasteur. Em seguida, para se quantificar o azul de Evans foi realizada a leitura por espectrofotometria, utilizando-se o comprimento de onda de 600 nm. Os dados obtidos em absorbância foram convertidos em mg de azul de Evans, através de regressão linear baseado em uma curva padrão de azul de Evans. Os resultados foram calculados em mg de azul de Evans no fluido peritoneal (mg/ml) e expressos como média  $\pm$  E.M.P.

### **3.5.8 Efeito da fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias na cavidade peritoneal.**

As concentrações das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  foram determinadas por imunoenensaio (ELISA) no fluido peritoneal dos animais pré-tratados com salina ou PL (1 mg/200  $\mu$ l/cav). Grupo controle negativo recebeu somente salina i.p. Quatro horas após a injeção da PL o fluido peritoneal foi coletado (como descrito no item 3.5.1.) em 1,0 ml de salina e estocado a -70 ° C para posterior dosagem das citocinas.

O ensaio para determinação da concentração de IL-1 e IL-6 foi baseado no protocolo descrito por Taktak *et al.* (1991). Placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50  $\mu$ l de tampão PBS contendo 2,0  $\mu$ g/mL do anticorpo monoclonal (mAb) anti-IL-1, anti- IL-6 e anti-TNF- $\alpha$ . A placa foi incubada durante uma noite a 4°C. Após esse período, a placa foi lavada de 3 a 5 vezes com PBS contendo 0,1% Tween 20 (PBS-T; 200  $\mu$ L/poço), e em seguida foram incubadas com 50  $\mu$ L de solução de bloqueio (1% de albumina bovina) durante 2 h em temperatura ambiente. A placa foi lavada conforme descrito acima e, em seguida adicionou-se as amostras testes (duplicata), colhidas do fluido peritoneal. Concentrações decrescentes das citocinas foram diluídas em PBS-Tween, e utilizadas para a confecção de uma curva padrão. A placa foi novamente coberta e mantida durante 12 horas a 4°C. No terceiro dia, a placa foi lavada por três vezes e adicionados os anticorpos biotinizados anti-IL-1, anti- IL-6 e anti-TNF- $\alpha$  (1:1000 em solução de lavagem contendo 1% de soro de cabra).

Após 1 h de incubação à temperatura ambiente, a placa foi lavada e em seguida adicionou-se 50  $\mu$ l de uma solução 1:5000 do conjugado avidina horseradish peroxidase (DAKO A/S, Denmark) diluída em PBS-T. Após incubação por 30 minutos, a placa foi lavada e incubada com 50  $\mu$ l do substrato dihidrocloro 1,2-fenilenodiamina (ortofenileno diamina, OPD, Sigma) diluído em tampão e adicionado com 0,4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% por ml.

Após o desenvolvimento da cor, a reação foi interrompida pela adição de 75  $\mu$ l de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M). A medida da absorbância foi determinada a 490 nm. Os resultados foram expressos em pg/ml de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  com base na curva padrão obtida.

### **3.5.9 Avaliação da atividade pró-inflamatória da fração proteica PL no modelo de bolsa de ar subcutânea (“Air pouch”).**

A bolsa de ar foi produzida na pele do dorso dos camundongos de acordo com método descrito por Edwards *et al.* (1981). Após tricotomia do dorso dos animais e assepsia com álcool iodado foram injetados subcutaneamente 5 ml de ar estéril (obtido em câmara de fluxo laminar). Três dias após, a cavidade formada foi mantida injetando-se 2,5 ml de ar. No sexto dia após a injeção inicial de ar os animais foram utilizados para os experimentos de migração.

A avaliação da migração de neutrófilos seguiu ao procedimento experimental descrito para o modelo de peritonite (item 3.5.1). Os animais receberam salina estéril, PL (1 mg) ou zymosan (2 mg) administrados em 200 µl de solução/bolsa. Os animais foram sacrificados 4, 24 e 48 horas após a injeção de PL e a lavagem da cavidade artificial foi realizada com 1 ml de salina heparinizada. A migração de neutrófilos para a bolsa de ar foi avaliada pela contagem total e diferencial dos leucócitos.

### **3.5.10 Dosagem do óxido nítrico (NO) no fluido da bolsa de ar subcutânea.**

O fluido da bolsa de ar subcutânea, nos tempos descritos no item 3.5.9., foi utilizado também para determinação indireta de NO, mensurado pelos níveis de nitrato, os quais foram determinados através da conversão de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), pela ação da enzima nitrato-redutase e os níveis de nitrito quantificado pela reação de Griess (CHEN *et al.*, 2000). Para o ensaio, placas de 96 poços foram utilizadas e 50 µl de fluido foi incubado com 80 µl do reagente de Griess (1% Sulfanilamida em 1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ / 0,1% de N-1-naftil-etilenodiamina dihidrocloro/ 1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ / água destilada, 1:1:1:1) em cada poço da placa. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA em 560 nm. A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão realizada com  $\text{NaNO}_2$  e expressos em µM de  $\text{NO}_2^-$ .

### **3.5.11 Efeito da fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) sobre a quimiotaxia (rolamento e adesão) de leucócitos na microcirculação mesentérica.**

O processo de quimiotaxia de leucócitos visto por microscopia intravital foi realizado para avaliar o efeito de PL sobre o rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio vascular (BAEZ, 1969; FORTES *et al.*, 1991). Para tanto, animais receberam PL na concentração de 1,0 mg/i.p., previamente dissolvido em 200 µl de solução fisiológica. Animais do grupo controle negativo receberam PBS estéril (200 µl/i.p) ou a quimiocina KC (500 ng/i.p) em animais do grupo controle positivo. Decorridas quatro horas da administração de substâncias, os animais foram anestesiados com 250 mg/kg de tribromoetanol (i.p), previamente solubilizado em solução fisiológica, para realização do procedimento cirúrgico.

Através de uma incisão lateral cutânea na cavidade abdominal, o mesentério foi exteriorizado para a observação da microcirculação *in situ*. Os animais foram mantidos sobre uma placa aquecida (37 °C), dotada de área transparente, sobre a qual o tecido foi fixado. A preparação foi mantida úmida e aquecida por irrigação com solução fisiológica a estéril a 37 °C. A placa aquecida foi posicionada em um microscópio óptico tri-ocular, acoplado à um fototubo com sistema de lentes ampliadoras superpostas, um monitor de computador e um vídeo que permitiu a projeção e gravação de imagem com aumento final de 3400 vezes (BAEZ, 1969). Os vasos selecionados para o estudo foram vênulas pós-capilares com diâmetro variando 10 a 18 µm, nos quais foram avaliados o rolamento dos leucócitos e o número desses aderidos ao endotélio durante 5 minutos em uma extensão de 10 µm de vênula. A extensão das vênulas foi definida na tela do monitor: 10 µm no tecido correspondem a 3,4 cm na tela (FORTES *et al.*, 1991). Portanto, resultados foram expressos em rolamento celular/10 µm/min e células aderidas/10 µm<sup>2</sup>. Foram considerados nesta análise, leucócitos que permaneceram aderidos ao endotélio vascular por mais de 30 segundos (GRANGER *et al.*, 1989; GRANGER; KUBES, 1994). Duas determinações numéricas foram feitas por animal, estimando-se o resultado como média de ambos.

### **3.5.12 Efeito da fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) em neutrófilos cultivados *in vitro*.**

#### **3.5.12.1 Isolamento de neutrófilos e preparo da cultura celular.**

Neutrófilos foram isolados da medula óssea de camundongos, seguindo método descrito por Zhang *et al.* (2001). Para tanto, animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, submetidos à assepsia com álcool 70% e mantidos em fluxo laminar para realização do procedimento experimental. Os fêmures e tíbias foram dissecados com bisturi e com uma seringa de 10 ml acoplada com agulha de insulina, as cavidades dos ossos foram lavadas com tampão HBSS (*Hank's buffered salt solution*) até coleta total da medula óssea. O tecido obtido foi centrifugado à 400 x *g* por 10 minutos a 4 °C e, em seguida, ressuspensão em 3 ml de tampão de lise ACK (solução de lise eritrocitária: NH<sub>4</sub>Cl<sup>-</sup> cloreto de amônio 0,15 M; KHCO<sub>3</sub> – bicarbonato de potássio 1 mM; Na<sub>2</sub>EDTA – EDTA sódico 0,1 mM; pH 7,2 -7,4) e mantido em gelo. Após 10 minutos, a suspensão celular foi centrifugada, sob as mesmas condições descritas anteriormente, e o isolamento dos neutrófilos realizado por meio de gradientes descontínuos de Percoll e Histopaque 1119 (FIEDLER *et al.*, 2011). Os neutrófilos isolados foram ressuspensos em um meio contendo RPMI/BSA, onde então foi obtida uma concentração celular de 1 x 10<sup>6</sup> /ml para utilização nas abordagens descritas a seguir.

#### **3.5.12.2 Quimiotaxia de Neutrófilos *in vitro*.**

Neste ensaio, foi investigado se a fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) interage diretamente com neutrófilos, promovendo a quimiotaxia. Para tanto, foi utilizado o ensaio de migração de neutrófilos *in vitro* em microcâmara apropriada, conforme método descrito por Boyden (1962), modificada por Zigmond e Hirsch (1973).

A suspensão celular de neutrófilos (1 x 10<sup>6</sup> / ml), obtida anteriormente, foi utilizada para plaqueamento (50 µl/poço) no compartimento superior da Câmara de Boyden. No compartimento inferior da câmara, foram adicionados PL (100 µg/poço), controle negativo RPMI e o controle positivo KC (20 ng/poço) em um volume final de 28,6 µl/poço. Os dois compartimentos foram separados por uma membrana de

polycarbonato (5  $\mu\text{m}$ ) e em seguida a câmara foi incubada (37 °C/CO<sub>2</sub> 2%) por 1 hora. No final do período de incubação, o filtro foi removido, fixado e corado (kit de coloração HEMA). A migração de neutrófilos foi quantificada por microscopia óptica (aumento de 1000 X). A contagem de células foi realizada em cinco campos aleatórios, para cada poço, perfazendo um total de 5 poços por grupo experimental. A migração foi expressa como o número de neutrófilos por campo.

### **3.5.12.3 Avaliação do efeito da fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) sobre a liberação de mediadores inflamatórios por neutrófilos *in vitro*.**

A suspensão de neutrófilos mantida em cultura (37 °C/CO<sub>2</sub>/2%) foi incubada com PL (100  $\mu\text{g}$ /poço), LPS (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) - controle positivo e RPMI- controle negativo por 24 horas. Decorrido o período de incubação, o sobrenadante da cultura foi coletado para dosagens de mediadores inflamatórios, conforme descrito a seguir.

Os níveis de óxido nítrico no sobrenadante da cultura foi estimado de forma indireta através da determinação da concentração de nitrito (NO<sub>2</sub>) pela reação de Griess (CHEN *et al.*, 2000). Neste ensaio, uma curva-padrão de referência de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, a partir de uma diluição seriada de uma solução de NaNO<sub>2</sub>, foi preparada e plaqueada em placa de 96 poços. Em seguida, adicionou-se em duplicata as amostras dos sobrenadantes coletados (100  $\mu\text{L}$  de cada amostra), seguido da adição de 100  $\mu\text{L}$  da solução de Griess (1% de sufamilamida em 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ 0,1% de N-1-nafitil-etilenodiamina dihidroclorato/água destilada/1:1:1:1) em cada poço. A placa foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e a coloração púrpura/magenta foi medida em leitor de ELISA com filtro de 540 nm. Os valores obtidos para as amostras foram plotados com curva padrão e expressos em  $\mu\text{M}$  de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

A detecção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foi determinada no sobrenadante da cultura de neutrófilos por ELISA (CUNHA *et al.*, 1993). Placas de 96 poços foram incubadas por 12 h a 4 °C com anticorpo anti-IL-1 ou anti- TNF- $\alpha$  murino (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ou 0,8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; kit da R&D systems- Cat. N<sup>o</sup> DY501 ou DY510, respectivamente). Após sensibilização das placas, as amostras foram adicionadas em duplicata e a curva padrão foi preparada, em seguida incubadas por 24 h a 4 °C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão PBS/Tween-20 (0,05% SIGMA) e incubadas

com anticorpo monoclonal biotilado anti- IL-1 $\beta$  ou anti- TNF- $\alpha$  diluídos (1:1000 com BSA/Tween 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1 h, as placas foram novamente lavadas e 50  $\mu$ L do complexo HRP-avidina diluído 1:5000 foram adicionados. Decorridos 20 minutos, o reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 50  $\mu$ l) foi adicionado e as placas foram incubadas na ausência de luz a 37 °C por 20 min. A reação enzimática foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M) e a densidade óptica medida a 490 nm em espectrofotômetro. As concentrações de citocinas contidas nos sobrenadantes foram calculadas a partir de uma curva padrão com 11 pontos, obtida por diluição seriada, sendo as concentrações iniciais de 2000 pg/ml para TNF- $\alpha$  ou 4000 pg/ml para IL-1 $\beta$ . Os resultados foram expressos em picograma de citocinas/ml de sobrenadante.

A determinação dos níveis de PGE<sub>2</sub> produzidos nos sobrenadantes das culturas de neutrófilos foi realizada utilizando Kit comercial de ELISA para dosagem de PGE<sub>2</sub> (R&D Systems) com sensibilidade de 8,25 pg/ml. O procedimento foi realizado conforme as indicações do fabricante. A concentração de PGE<sub>2</sub> foi determinada utilizando como referência uma curva padrão diluída de forma seriada, sendo o menor valor detectado de 19,6 pg/ml. A leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA com comprimento de onda de 492 nm.

### **3.6 Análise estatística dos dados**

Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), de acordo com o parâmetro avaliado. Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas das médias ou teste T-student para comparação de pares de médias. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos sob intervalo de confiança de 95%. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 5.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 A fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de forma concentração-dependente.

A administração intraperitoneal da fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) induziu a migração de neutrófilos para esta cavidade de forma concentração-dependente 4 horas após sua injeção e, de forma significativa, quando comparada ao grupo controle salina (\* $p < 0,05$ ). PL apresentou efeito pró-inflamatório com um máximo nas concentrações de 1 e 3 mg/cavidade, não sendo observada diferença entre as mesmas. Portanto, a menor concentração com efeito pró-inflamatório significativo foi de 1 mg/cavidade, sendo esta a concentração da fração proteica utilizada nos demais experimentos (Figura 2).

### 4.2 Efeito da fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) associada à polimixina B sobre a migração de neutrófilos.

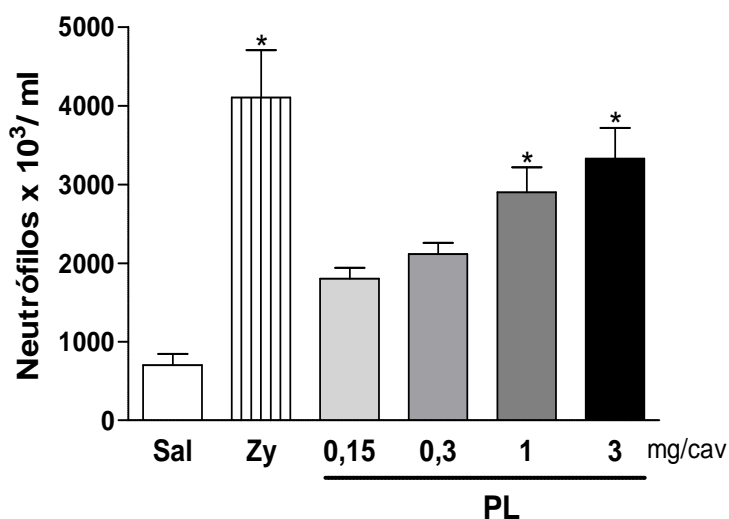
No intuito de investigar a relação do efeito pró-inflamatório de PL com possíveis contaminações das preparações com endotoxina, incubou-se as proteínas do látex com sulfato de polimixina B (PmB) antes do tratamento por via intraperitoneal. Neste ensaio, o perfil de migração de neutrófilos ocorreu de forma similar em animais tratados com PL (1 mg/cav) associado ou não à polimixina B e, de forma significativa, quando comparado ao grupo controle salina (\* $p < 0,05$ ) (Figura 3).

### 4.3 Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) induz migração de neutrófilos de forma tempo dependente.

Com o objetivo de investigar o curso temporal desta atividade pró-inflamatória da fração proteica, a migração de neutrófilos foi avaliada 2, 4, 8, 24, 48 horas após a administração de PL (Figura 4). Observou-se que PL induziu um aumento significativo do número de neutrófilos no fluido peritoneal a partir da 4ª hora, tendo valor máximo observado na 8ª hora e havendo um significativo declínio na 48ª hora após sua administração. Apesar do pico da migração de neutrófilos ter

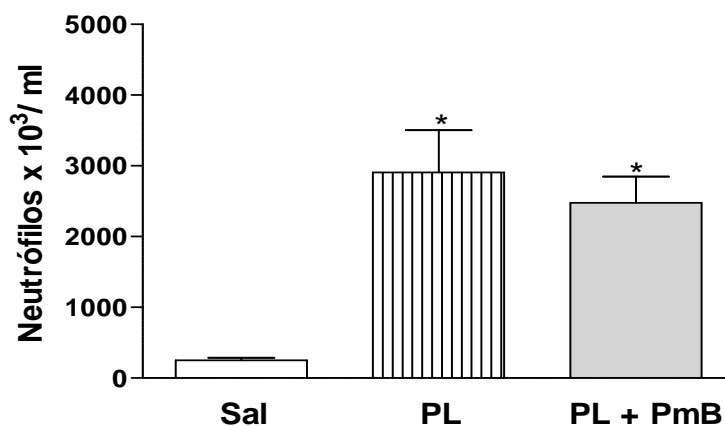
ocorrido oito horas após administração da fração proteica, não houve diferenças significativas quando comparada à quarta hora. Portanto, o tempo de avaliação escolhido para nos demais ensaios a seguir foi de 4 horas.

**Figura 2 - Efeito da fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) sobre a migração de neutrófilos.**



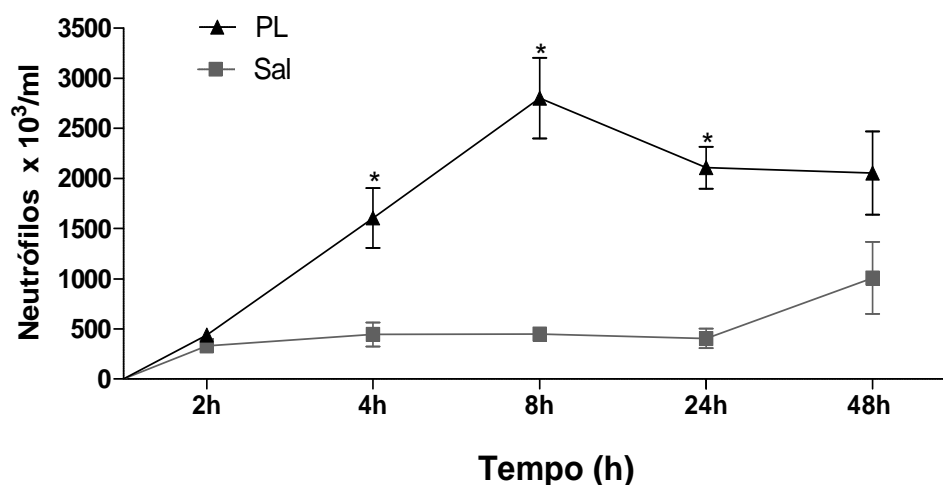
Animais foram tratados com NaCl 0,15 M estéril (Sal; i.p), PL (0,15, 0,3, 1, e 3 mg/cav; i.p.) ou Zymozan (1 mg/cav) e a migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após o tratamento. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M de neutrófilos por cavidade. \* $p < 0,05$  indica diferença estatística comparado com o grupo NaCl 0,15 M estéril (Sal) (n=8; ANOVA - teste de Bonferroni).

**Figura 3 - Efeito da fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) associada à polimixina B (PmB) sobre a migração de neutrófilos.**



Os animais foram tratados com NaCl 0,15 M estéril (Sal; i.p), PL (1 mg/cav) ou PL associado à polimixina B (10  $\mu$ g/ml). A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após o tratamento. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M de neutrófilos por cavidade. \* $p < 0,05$  indica diferença estatística comparado com o grupo NaCl 0,15 M estéril (Sal) (n=8; ANOVA - teste de Bonferroni).

Figura 4 - Curso temporal da migração de neutrófilos induzida por PL.



Os animais foram tratados i.p com PL (1 mg/cav) ou NaCl 0,15 M estéril (Sal) por via i.p. A migração de neutrófilos avaliada após 2, 4, 8, 24 e 48 horas. Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo Sal. ANOVA - Bonferroni.

#### 4.4 O aumento da população de macrófagos na cavidade peritoneal aumentou a migração de neutrófilos induzida pela fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL).

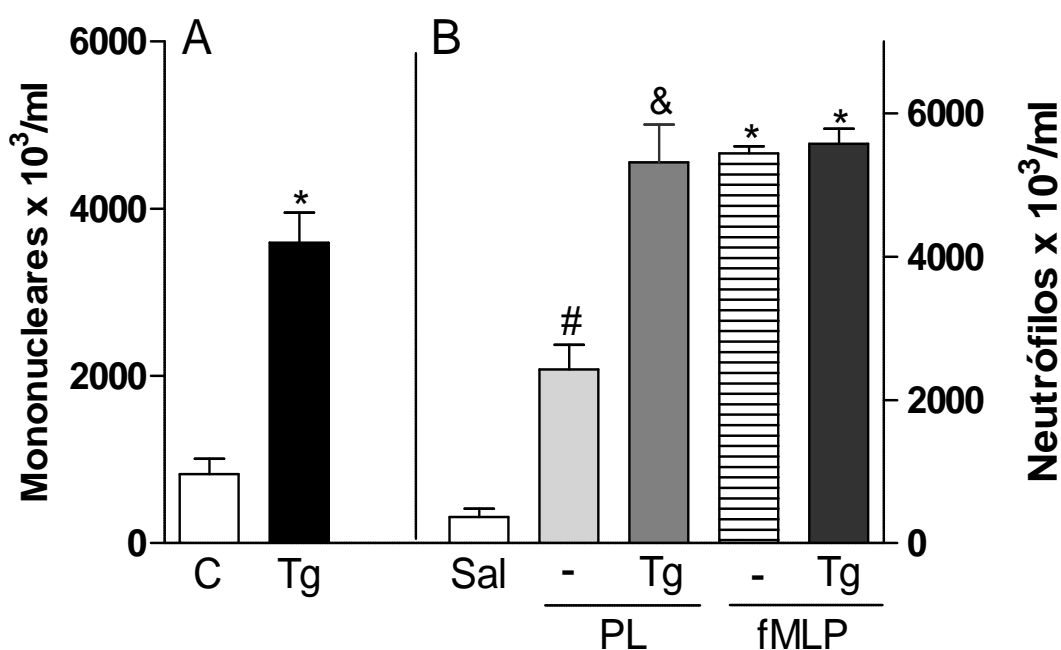
O tratamento de animais com tioglicolato aumentou de forma significativa a população de macrófagos na cavidade peritoneal quando comparado ao grupo controle salina (\* $p < 0,05$ ) (Figura 5- painel A).

O aumento da população de macrófagos intensificou a migração de neutrófilos induzida pela fração proteica quando comparado aos animais que receberam apenas PL (\* $p < 0,05$ ). O efeito do fMLP, agente quimiotático direto ( $10 \times 10^{-9}$  moles/cavidade) não foi alterado pelo aumento da população de macrófagos (Figura 5- painel B).

#### 4.5 A depleção de mastócitos da cavidade peritoneal aumenta a migração de neutrófilos induzida pela fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL).

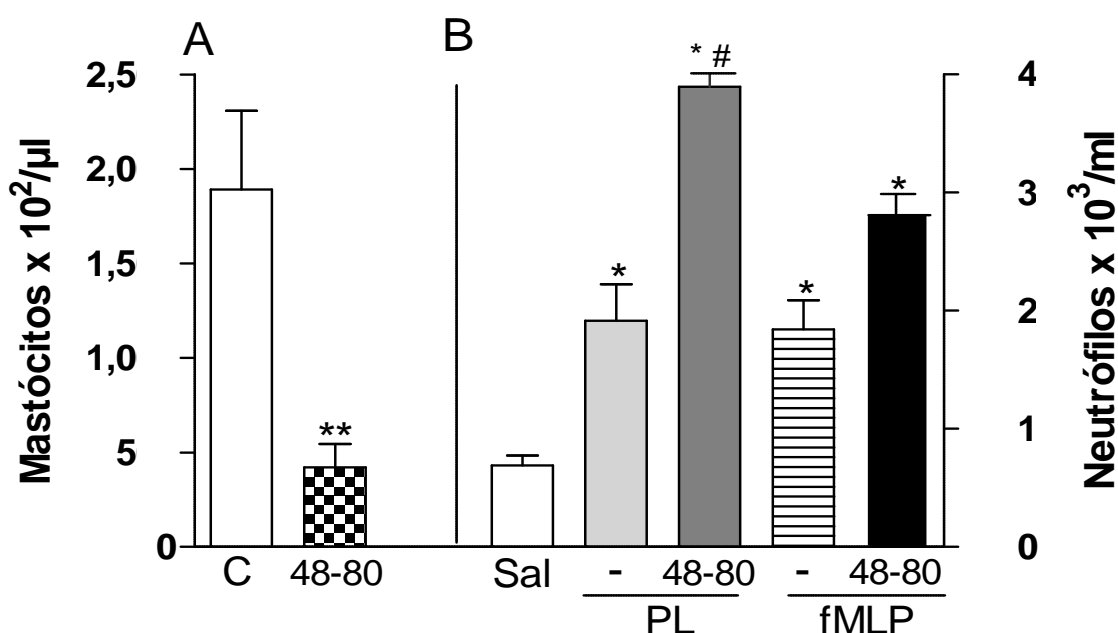
A depleção de mastócitos residentes na cavidade peritoneal com o composto 48/80 ocorreu de forma significativa em relação ao grupo controle (Figura 6- painel A). A depleção de mastócitos peritoneais interferiu na migração de neutrófilos induzida pela fração proteica (PL), bem como do fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/cav.) (figura 6- painel B). Esses dados sugerem que os mastócitos estão envolvidos na migração de neutrófilos induzido pela fração proteica.

**Figura 5 - O aumento da população de macrófagos na cavidade peritoneal aumentou a migração de neutrófilos induzida pela fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL).**



**Painel A:** número de macrófagos do grupo controle (C) e dos animais tratados com tioglicolato (Tg; 3% v/v; 1 ml i.p.). **Painel B:** migração de neutrófilos em animais tratados por NaCl 0,15 M estéril (Sal, 1 ml), PL (1 mg/cav), fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/cav), nas cavidades pré-tratadas com Tg ou não. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. do número de mononucleares ou neutrófilos em 6 animais. \*  $p < 0,05$  comparado a C; #  $p < 0,05$  comparado a Sal. & $p < 0,05$  comparado ao grupo PL não tratado com tioglicolato. ANOVA – Bonferroni.

**Figura 6 - A depleção de mastócitos da cavidade peritoneal aumentou a migração de neutrófilos induzida pela fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL).**



**Painel A:** população de mastócitos em animais controles (C) e pré-tratados com composto 48/80.

**Painel B:** migração de neutrófilos induzida em animais tratados com: NaCl 0,15 M estéril (Sal, 1 ml i.p.), PL (1 mg/cav.), nas cavidades tratadas ou não com 48/80. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de mastócitos e neutrófilos de 6 animais. \*\*  $p < 0,05$  comparado ao grupo C e \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo Sal e #  $p < 0,05$  comparado ao grupo PL. ANOVA – Bonferroni.

#### 4.6 Efeito de diferentes bloqueadores farmacológicos na migração de neutrófilos induzida por PL na cavidade peritoneal.

Com o intuito de investigar os possíveis mediadores envolvidos na atividade pró-inflamatória da fração proteica (PL) foi realizada a modulação farmacológica no modelo de peritonite (Tabela 1).

Neste estudo ficou demonstrado que as drogas anti-inflamatórias dexametasona e talidomida, glicocorticoide e inibidor específico de TNF- $\alpha$ , respectivamente, inibiram significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela fração PL quando comparados aos grupos controle PL e salina (NaCl 0,15 M estéril) ( $p < 0,05$ ). O pré-tratamento dos animais com indometacina, um inibidor inespecífico das ciclo-oxigenase 1 e 2, bem como o

celecoxib, inibidor seletivo da COX-2, reduziu significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela fração PL ( $p < 0,05$ ). Efeitos similares na modulação dos efeitos de PL foram observados no pré-tratamento com pentoxifilina, fármaco com potente ação vasodilatador. Por outro lado, o tratamento dos animais com PCA e meclizina, um antagonista do receptor ativador de plaquetas e um anti-histamínico, respectivamente, não produziram nenhum efeito inibitório sobre a migração induzida por PL.

**Tabela 1 - Efeito de diferentes bloqueadores farmacológicos na migração de neutrófilos induzida por PL na cavidade peritoneal.**

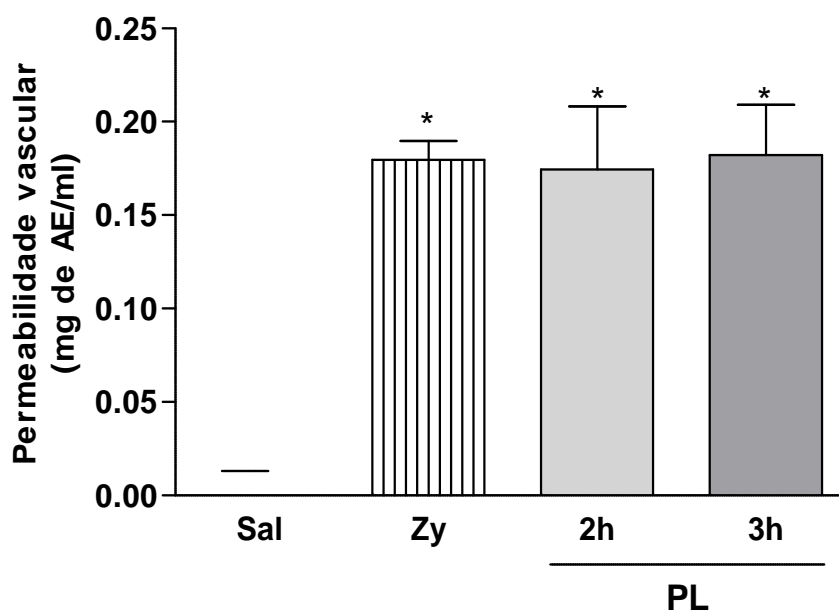
<b>Tratamento</b>	<b>Dose ou concentração</b>	<b>Migração de neutrófilos (Neutrófilo x 10<sup>3</sup>/ml)</b>
NaCl 0,15M estéril	1 ml/cav; i.p.	293,3 ± 0.6
PL	1 mg/cav; i.p.	3.221 ± 3.3*
PL + Meclizina	40 mg/kg; s.c.	3.143 ± 3.7
PL + PCA	10 mg/kg; s.c.	2.049 ± 2.5
PL + Dexametasona	0.5 mg/kg; s.c.	1.044 ± 2.6*#
PL + Pentoxifilina	100 mg/kg; s.c.	1.860 ± 2.1*#
PL + Talidomida	50 mg/kg; s.c.	1.483 ± 1.7*#
PL + Indometacina	3 mg/kg; s.c.	1.011 ± 2.0*#
PL + Celecoxibe	30 mg/kg; s.c.	1.501 ± 2.2*#

Pré-tratamento com celecoxibe, pentoxifilina, indometacina, talidomida e dexametasona, mas não com meclizina e PCA (antagonista do receptor ativador de plaquetas) inibiram a migração de neutrófilos induzida por PL. Os resultados reportam a média ± E.P.M. de 6 animais. # $p < 0,05$  comparado ao grupo PL, \* $p < 0,05$  comparado ao grupo NaCl 0,15 M estéril. ANOVA – Bonferroni.

#### **4.7 Efeito da fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) sobre a permeabilidade vascular.**

O aumento da permeabilidade vascular, levando ao extravasamento de fluido rico em proteína (exsudato) para o tecido extravascular, é uma característica fundamental da inflamação aguda. Nesse sentido foi realizado o protocolo para avaliar o possível aumento da permeabilidade vascular induzido pela fração proteica (PL) na cavidade peritoneal de camundongos. A Figura 7 demonstra que a fração proteica promove de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o aumento da permeabilidade vascular com 2 e 3 horas após tratamento quando comparado aos animais tratados com salina (NaCl 0,15 M estéril) ou zymosan (grupos controles).

**Figura 7 – A fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) aumentou a permeabilidade vascular na cavidade peritoneal.**



Animais foram tratados com PL (1 mg/cav; i.p.) ou Zymozan (1 mg/cav) e a permeabilidade vascular foi avaliada 2 ou 3 horas após os tratamentos. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M da quantidade de azul de Evans (AE) no fluido peritoneal (mg/ml). \* $p < 0,05$  indica diferença estatística comparado com o grupo NaCl 0,15 M estéril (Sal). (n=7; ANOVA – teste de Bonferroni).

#### **4.8 A fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) aumenta os níveis de citocinas (IL-1 e IL-6) no fluido peritoneal de camundongos.**

Considerando que a ação pró-inflamatória da fração proteica estaria relacionada à sua habilidade de induzir a síntese de mediadores por leucócitos e células residentes na cavidade peritoneal, após o estímulo com PL, realizou-se uma lavagem dessa cavidade e o fluido foi coletado para dosagens de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ .

A administração intraperitoneal da fração proteica (PL – 1 mg/cav) estimulou a produção de mediadores pró-inflamatórios no exsudato peritoneal, após 4 horas do tratamento, visto pelo aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos níveis de IL-1 ( $3196 \pm 725,5$  pg/ml) (FIGURA 8 – painel A) e IL-6 ( $588,2 \pm 52,2$  pg/ml) (FIGURA 8 – painel B), quando comparado aos níveis obtidos em resposta ao controle negativo SAL: IL-1( $178,4 \pm 77,29$ ) e IL-6 ( $0,083 \pm 0,085$ ). Os níveis de TNF- $\alpha$  no fluido peritoneal não foram alterados de forma significativa após tratamento com PL (Figura 8 - painel C).

**FIGURA 8 - A fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) aumenta os níveis de citocinas (IL-1 e IL-6) no fluido peritoneal de camundongos.**



**PAINEL A** - níveis de IL-1. **PAINEL B** - níveis de IL-6. **PAINEL C** – níveis de TNF- $\alpha$ . Os animais receberam salina (controle) ou PL (1 mg/cav) e após 4 horas a concentração de citocinas foi determinada por ELISA. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pg de citocina/ml de fluido peritoneal (n=5). \* indica significância estatística ( $p < 0.05$ ) comparado ao grupo salina (Test Student).

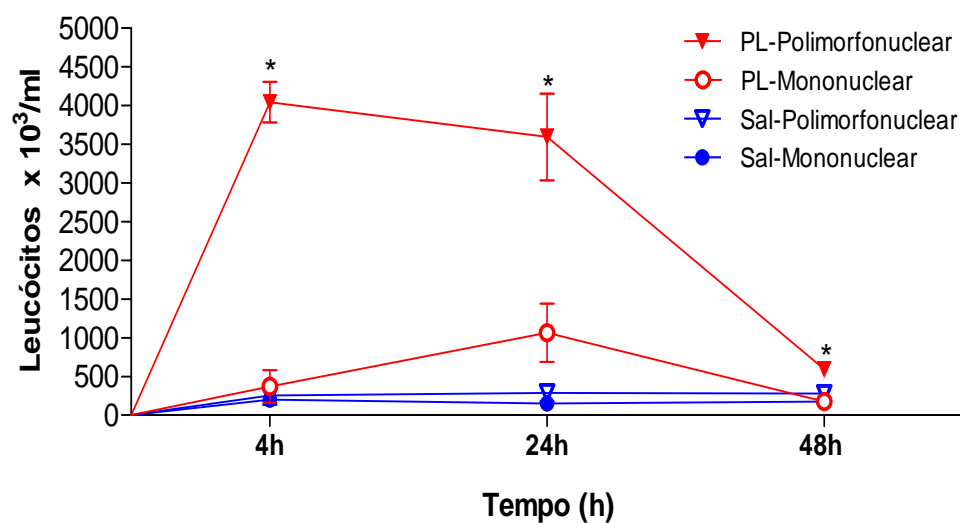
#### **4.9 A fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) induz migração de leucócitos no modelo da bolsa de ar (“Air pouch”).**

O potencial da fração proteica (PL) em exercer quimiotaxia para neutrófilos em uma cavidade com predomínio de macrófagos residentes foi investigado no modelo da bolsa de ar subcutânea (Figura 9). Nessa cavidade artificial, coletou-se o fluido após 4, 24 e 48 horas da administração de PL para avaliação do perfil da migração leucocitária. Demonstrou-se que PL induz uma potente migração de leucócitos com 4 e 24 horas, com predomínio de células polimorfonucleares, quando comparado à mononuclear (\* $p < 0,05$ ). Um declínio desta migração foi evidenciado com 48 horas.

#### **4.10 Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) induz aumento dos níveis de nitrito no fluido da bolsa de ar subcutânea.**

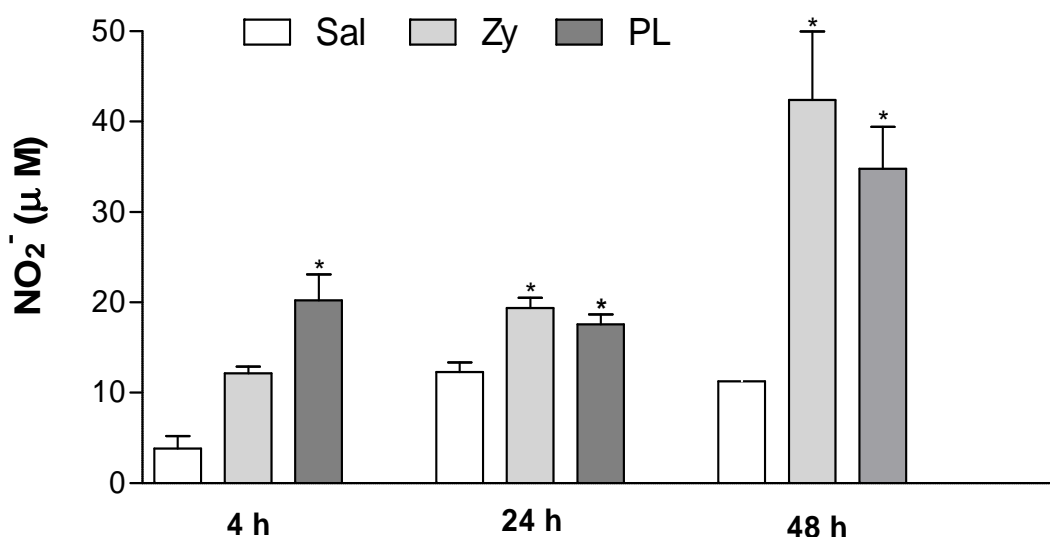
Nos processos inflamatórios, o óxido nítrico (NO) promove vasodilação, relaxamento da musculatura lisa, reduz a agregação e adesão plaquetária, além de ser citotóxico para determinados patógenos. Entretanto, como o NO é dificilmente dosado diretamente, seus metabólitos, como nitrito e nitrato podem ser utilizados para monitorar a sua formação, inclusive em fluidos inflamatórios através da reação de Griess. Portanto, o fluido obtido na bolsa de ar foi utilizado na determinação dos níveis de nitrito (Figura 10). Os resultados demonstraram que houve um aumento nos níveis de nitrito no fluido da bolsa de ar de camundongos após 4, 24 e 48 horas da administração de PL. Esse efeito ocorreu de forma significativa (\* $p < 0,05$ ) quando comparado aos níveis de animais que receberam apenas NaCl 0,15 M estéril e foi similar ao controle positivo zymosan.

**Figura 9 - Curso-temporal da migração de leucócitos induzido pela fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) no modelo da bolsa de ar.**



Após indução da bolsa de ar, os animais foram tratados com PL (1 mg/cav). A migração de leucócitos foi avaliada com 4, 24 e 48 horas. Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais. \*  $p < 0,05$  representa a diferença entre leucócitos polimorfonuclear e mononuclear nos grupos tratados com PL. ANOVA - Bonferroni.

**Figura 10 - Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) induz aumento dos níveis de nitrito no fluido da bolsa de ar subcutânea.**

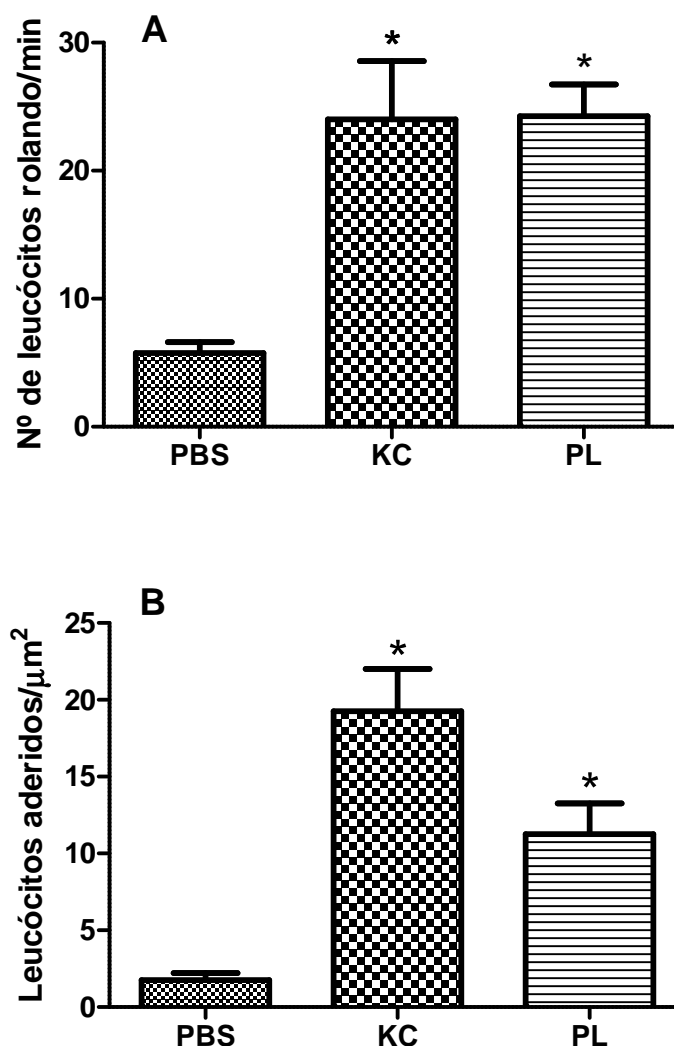


Após indução da bolsa de ar, animais foram tratados com PL (1 mg/cav) ou zymosan (2 mg/cav) e o fluido coletado 4, 24 e 48 horas para determinação dos níveis de nitrito através da reação de Griess. Resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. da concentração de  $\text{NO}_2^-$  ( $\mu\text{M}$ ). \* $p < 0,05$  indica diferença estatística comparado com o grupo NaCl 0,15 M estéril ( $n=6$ ; ANOVA - teste de Bonferroni).

#### **4.11 A fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) induz rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular do mesentério de camundongos.**

A administração da quimiocina derivada de queratinócitos (KC) por via intraperitoneal (500 ng/cavidade) induziu um aumento significativo do rolamento ( $24 \pm 4,5$  leucócitos/min) e adesão ( $19,25 \pm 2,7$  leucócitos aderidos/ $10 \mu\text{m}^2$ ) de leucócitos no endotélio (vênulas mesentéricas pós-capilares; *in vivo*) quando comparado ao grupo controle negativo que recebeu apenas PBS (200  $\mu\text{l}$ /cavidade) (rolamento:  $5,7 \pm 0,8$  leucócitos/min; adesão:  $1,7 \pm 0,5$  leucócitos aderidos/ $10 \mu\text{m}^2$ ). O tratamento com a fração proteica (PL) na concentração de 1mg/cavidade induziu de forma significativa o rolamento ( $24,25 \pm 2,5$  leucócitos/min; indução de 325,44%) e adesão ( $11,25 \pm 2,0$  leucócitos aderidos/ $100 \text{mm}^2$ ; indução de 561,71%) de leucócitos ao endotélio quando comparado ao controle negativo (\* $p < 0,05$ ) e similar ao grupo controle positivo (Figura 11; painel A e B).

Figura 11 – A fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) induz rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular do mesentério de camundongos.



Os animais foram tratados i.p. com PBS, PL (1,0 mg/cav) ou KC (500 ng/cav). Após 4h o rolamento e a adesão de leucócitos foram avaliados por microscopia intravital mesentérica. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. do número de leucócitos rolando/min (painel A) e do número de leucócitos aderidos/ $10 \mu\text{m}^2$  (painel B). \*indica significância estatística ( $p < 0.05$ ) comparado ao grupo PBS ( $n=6$ ; ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

#### **4.12 A fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) induz quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*.**

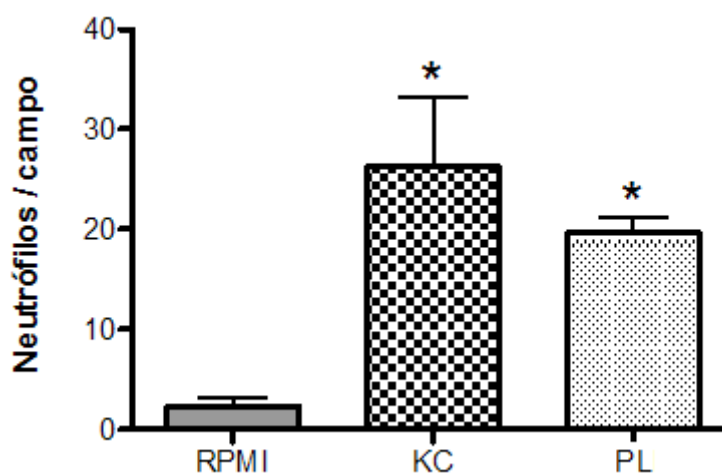
No intuito de investigar o potencial quimiotático da fração proteica (PL) para leucócitos ocorreria também pela sua interação diretamente em neutrófilos, utilizou-se a câmara de Boyden como modelo experimental, em condições adequadas para que um ensaio de migração pudesse mimetizar *in vitro* o recrutamento de leucócitos observado durante processos inflamatórios *in vivo*. Através dos dados dispostos na figura 12, observou-se que houve migração significativa ( $p < 0,05$ ) de neutrófilos quando estimulados pelo controle positivo ( $26,2 \pm 6,9$ ) em relação ao controle negativo RPMI ( $2,0 \pm 1,0$ ). Da mesma forma, essa migração foi significativa em resposta ao efeito quimiotático induzido pela fração proteica ( $19,6 \pm 1,6$ ).

#### **4.13 Efeito da fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) sobre a liberação de mediadores inflamatório por neutrófilos *in vitro*.**

Considerando que a ação quimiotática da fração proteica estaria relacionada à sua habilidade de induzir a liberação de mediadores pró-inflamatória por leucócitos, a suspensão de neutrófilos foi mantida em cultura e incubada com os estímulos. O sobrenadante da cultura foi coletado para dosagens de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NO<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>.

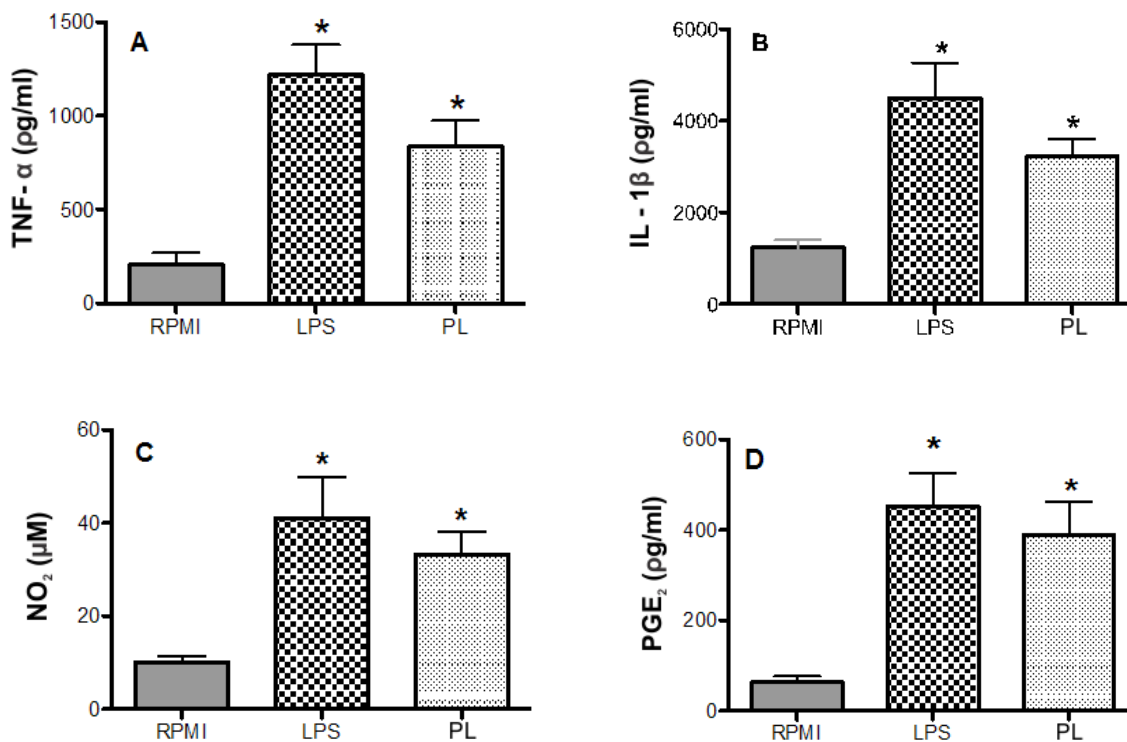
Neutrófilos incubados com LPS foram induzidos à produção de TNF- $\alpha$  ( $1218,5 \pm 154,5$  pg/ml), IL-1 $\beta$  ( $4498 \pm 766$  pg/ml), NO<sub>2</sub> ( $41,2 \pm 8,8$  pg/ml) e PGE<sub>2</sub> ( $452,6 \pm 73,5$  pg/ml), de forma significativa ( $p < 0,05$ ), quando comparado aos níveis obtidos em resposta ao controle negativo RPMI: TNF- $\alpha$  ( $267,3 \pm 60,7$  pg/ml), IL-1 $\beta$  ( $1234 \pm 168$  pg/ml), NO<sub>2</sub> ( $10,2 \pm 1,4$  pg/ml) e PGE<sub>2</sub> ( $104,5 \pm 26,4$  pg/ml). De forma similar, a fração proteica estimulou neutrófilos em cultura à produção de mediadores pró-inflamatórios, visto pelos níveis significativos de TNF- $\alpha$  ( $834,2 \pm 138,5$  pg/ml), IL-1 $\beta$  ( $3226 \pm 383$  pg/ml), NO<sub>2</sub> ( $33,2 \pm 4,9$  pg/ml) e PGE<sub>2</sub> ( $346,6 \pm 28,5$  pg/ml), quando comparado àqueles ao controle negativo - RPMI (Figura 13 - painel A, B, C e D).

Figura 12 – A fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) induz quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*.



Os neutrófilos foram estimulados em microcâmara com PL (100 ug/poço), KC (20 ng/poço) - controle positivo de quimiotaxia e RPMI - controle negativo. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. do número de neutrófilos por campos de um total de cinco campos. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle RPMI (ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

**Figura 13 - A fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL) induz a liberação de mediadores inflamatórios por neutrófilos *in vitro*.**



Neutrófilos ( $1 \times 10^6$ ) de camundongos foram incubados com PL (100  $\mu$ g/poço), LPS (5  $\mu$ g/ml) ou RPMI por 24h. Os valores de TNF- $\alpha$  (painel A), IL-1 $\beta$  (painel B), NO<sub>2</sub> (painel C) e PGE<sub>2</sub> (painel D) representam a média  $\pm$  E.P.M. de ensaios em duplicatas. \*p<0,05 comparado ao grupo controle RPMI (ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

## 5 DISCUSSÃO

As plantas laticíferas são uma interessante fonte de moléculas com atividades biológicas e sua eficiência é frequentemente suportada pelo uso na medicina popular (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

O látex *per si*, na sua forma bruta, íntegra, é conhecido por ocasionar efeitos medicinais, como também, efeitos tóxicos, tais como congestão ocular, dermatite após exposição acidental (TOMAR *et al.*, 1970), injúria endotelial permanente e efeitos letais em modelos animais (AL-MEZAINNE *et al.*, 2005; BADWI *et al.*, 1998; BIEDNER *et al.*, 1977; HANDA *et al.*, 1984; PADHY; KUMAR, 2005). A fim de evitar tais efeitos indesejáveis, vários grupos de pesquisa têm buscado isolar seus componentes tóxicos dos terapêuticos. Alencar *et al.* (2006) promoveram a separação total do látex de *C.procera*, isolando o seu principal componente tóxico (borracha), obtendo uma fração rica em proteínas. A fração isolada denominada PL tem exibido propriedades anti- e pró-inflamatórias, antinociceptiva, cicatrizante, antitumoral (ALENCAR *et al.*, 2004, ALENCAR *et al.*; 2006; FIGUEIREDO *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2007; RASIK *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 2005; SINGH; KUMAR, 2000).

Com intuito de avaliar o potencial citotóxico da fração proteica (PL), estudos preliminares realizados em nosso laboratório avaliaram o efeito *in vitro* de PL em culturas de neutrófilos humanos através dos testes clássicos de viabilidade celular: MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide) e LDH (lactato desidrogenase) que permitem a detecção de alterações na atividade metabólica mitocondrial e danos ao nível da membrana celular, respectivamente (MOSMANN, 1983). Os resultados demonstraram que PL, mesmo em concentrações crescentes (1 - 100 µg/ml), não conferiu nenhum estímulo nocivo à integridade dos neutrófilos, visto pela baixa atividade de LDH e a alta viabilidade dos neutrófilos pelo teste do MTT, quando comparado ao composto triton X-100, cuja atividade citotóxica é bem caracterizada (FIGUEIREDO, 2011). Oliveira *et al.* (2007), avaliaram a citotoxicidade de PL contra diferentes linhagens de células tumorais e relataram a alta toxicidade nas concentrações entre 0,42 à 1,36 µg/ml. Entretanto, nestas mesmas concentrações, não foram observados efeitos visíveis sobre a viabilidade ou morfologia de células mononucleares saudáveis expostas a PL, o que

em conjunto parece sugerir uma seletividade destas proteínas no reconhecimento de moléculas na superfície de células tumorais ou normais.

Os efeitos das proteínas do látex de *C. procera* (PL) na resposta imune têm sido particularmente investigados. Existem muitos relatos, principalmente do nosso grupo de pesquisa, sobre os efeitos pró e anti-inflamatório das proteínas do látex de *C. procera*. Estudos sugerem que este antagonismo de atividades depende do meio de extração e da via de administração nos animais experimentais (ALENCAR *et al.*, 2006).

O efeito anti-inflamatório da administração intravascular das proteínas pode ser uma consequência da formação de um gradiente quimiotático negativo, com maiores concentrações das proteínas no lúmen do vaso do que no tecido perivascular, bloqueando a migração para o sítio da inflamação (PEREIRA-DASILVA *et al.*, 2012). De fato, este efeito antagonista, pró- e anti-inflamatório, dependente da via de administração já foi relatado na literatura para outras proteínas vegetais. Estudos desenvolvidos por Alencar (2001) demonstram que a lectina de *Lonchocarpus sericeus* apresenta atividade pró-inflamatória quando administrada por via intraperitoneal e anti-inflamatória quando administrada por via endovenosa.

Investigando o efeito de PL em modelos experimentais de sepse o nosso grupo de pesquisa demonstrou ser esta fração detentora de importante potencial modulador da resposta imunológica/inflamatória em animais sépticos. Camundongos tratados com um inóculo letal de *S. enterica* morriam até 7 dias após. Entretanto, a administração intraperitoneal de PL 24 horas anteriores a infecção, diminuiu de forma significativa a mortalidade dos animais. Foi verificado também que animais que recebiam as proteínas do látex após o início da infecção não eram protegidos e morriam (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Em acréscimo, foi demonstrado também que PL intraperitonealmente, mantém a homeostasia da coagulação em camundongos sépticos (RAMOS *et al.*, 2012).

Esses resultados são consistentes e credenciam a PL como uma ferramenta de potencial imunomodulador a ser investigado com estudos complementares. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da administração local de PL sobre a resposta inflamatória aguda em modelos experimentais *in vivo* (peritonite e bolsa de ar subcutânea) e *in vitro* (cultura de neutrófilos).

A inflamação aguda é uma resposta do sistema imune inato que pode ser iniciada por uma grande diversidade de injúrias (física, química ou biológica) e é seguida por uma cascata de eventos bioquímicos e celulares, que incluem extravasamento de fluidos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise e reparo tecidual (BECKER, 1983).

A migração de leucócitos da circulação para o local da inflamação é mediada por interações moleculares sequenciais entre os neutrófilos, as células endoteliais e os componentes da matriz extracelular. Sistemas de adesão das selectinas permitem que os leucócitos rolem sobre a superfície do endotélio, através de domínios lectínicos que reconhecem e interagem de forma específica com carboidratos de superfície. Isto induz alterações conformacionais nas moléculas de adesão do tipo integrinas que interagem com moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, conduzindo à uma maior afinidade e aderência do leucócito ao endotélio (LEY *et al.*, 2007).

O neutrófilo é o principal tipo de leucócito participante nos mecanismos inatos de defesa, e seu recrutamento é crucial para resposta do hospedeiro contra a invasão de tecidos por microrganismos (MALECH; GALLIN, 1987). Os neutrófilos são atraídos para os locais de inflamação por vários estímulos, tais como produtos de micro-organismos (LPS) e fatores quimiotáticos liberados por células residentes (WAGNER; ROTH, 2000). Citocinas, quimiocinas, eicosanóides, LTB<sub>4</sub> e C5a estão entre os principais mediadores quimioatratadores para neutrófilos (DINARELLO, 2000; KUMAR *et al.*, 2005; TAGER; LUSTER, 2003). Em adição, os neutrófilos também liberam citocinas e quimiocinas que promovem sua auto-ativação, além do recrutamento de outras células do sistema imunológico (YAMASHIRO *et al.*, 2001).

Há evidências consistentes na literatura que uma resposta inflamatória aguda, caracterizada por uma elevada infiltração de neutrófilos, também pode ser induzida em animais por várias moléculas bioativas derivadas de plantas. Neste estudo, administração intraperitoneal da fração protéica do látex de *Calotropis procera* (PL) induziu a migração de neutrófilos para esta cavidade de forma concentração-dependente 4 horas após sua injeção. A PL apresentou efeito pró-inflamatório crescente nas concentrações de 1 e 3 mg/cavidade, mas não sendo observada diferença significativa entre as mesmas. Portanto, a menor concentração

com efeito pró-inflamatório significativo foi de 1 mg/cavidade, sendo esta a concentração da fração proteica utilizada nos demais experimentos.

Está descrito na literatura científica que endotoxinas como lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) quando presentes na cavidade peritoneal de animais experimentais causam um intenso influxo de neutrófilos e estimulam a liberação de citocinas por macrófagos e monócitos (AMURA *et al.*, 1997). Assim, a relação do efeito pró-inflamatório de PL com possíveis contaminações das preparações com endotoxinas foi excluída, uma vez que a incubação das proteínas do látex com sulfato de polimixina B (antibiótico capaz de neutralizar endotoxinas bacterianas) antes do tratamento, não alterou o perfil de migração de neutrófilos já estabelecido pela fração PL.

O curso temporal do efeito estimulador de leucócitos exercido pela fração PL seguiu um padrão característico da resposta inflamatória aguda. A fração PL induziu um aumento significativo no número de neutrófilos no fluido peritoneal dos animais a partir da 4ª hora, tendo valor máximo observado na 8ª hora, com um significativo declínio na 48ª hora após sua administração. Apesar do pico da migração de neutrófilos ter ocorrido oito horas após administração da fração proteica, não houve diferenças significativas quando comparada à quarta hora. Portanto, o tempo de avaliação escolhido para os demais ensaios foi de 4 horas.

Estudos realizados com proteínas (CgLP) isoladas do látex da planta *Cryptostegya grandiflora* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009), utilizando o mesmo modelo experimental de peritonite, demonstraram um efeito indutor sobre a migração de neutrófilos quando administrada intraperitonealmente. Resultados semelhantes também foram encontrados para uma lectina (DrosL) isolada das sementes da planta *Dioclea rostrata* (FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

A transmigração através da barreira endotelial envolve interações homofílicas e heterofílicas entre moléculas de adesão e receptores em leucócitos e no endotélio. Uma vez tendo deixado a circulação e passado através do endotélio, os neutrófilos migram para o tecido inflamado ao longo de um gradiente de mediadores quimiotáticos (WOODFIN *et al.*, 2009).

Os macrófagos e mastócitos colaboram no recrutamento de neutrófilos, através da liberação de mediadores inflamatórios tais como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL-1), IL-8, componentes do sistema complemento, quimiocinas, e leucotrienos B4 (LTB4) (AJUEBOR *et al.*, 1999). Está bem descrito na

literatura a participação do TNF- $\alpha$  e IL-1 no recrutamento de neutrófilos. Estas citocinas favorecem um aumento da expressão das moléculas de adesão, selectina e ICAM-1, nas células endoteliais, induzindo a migração de neutrófilos ao espaço extravascular (CANETTI *et al.*, 2001; SAUNDERS *et al.*, 2005; WAGNER, 2000).

Neste contexto, investigamos a participação de células residentes (macrófagos e mastócitos) na resposta inflamatória da fração PL do látex de *C. procer*a no modelo de peritonite, alterando o padrão destas células na cavidade peritoneal, por meio de ferramentas farmacológicas descritas na literatura.

O incremento na população de macrófagos da cavidade peritoneal pelo tratamento dos animais com tioglicolato intensificou a migração de neutrófilos, aumentando a resposta inflamatória induzida pela fração proteica do látex. Entretanto, o efeito quimiotático do fMLP não foi alterado pelo aumento da população de macrófagos, uma vez que já se sabe que este fator age por meio independente de células residentes (RIBEIRO *et al.*, 1997). Estes resultados, portanto, sugerem que a PL induz o recrutamento de neutrófilos por mecanismos indiretos dependentes de macrófagos residentes. Como os macrófagos são fontes importantes de citocinas, poderiam ser estas as responsáveis pela atividade quimiotática para neutrófilos induzida pela fração PL.

A participação dos macrófagos residentes no recrutamento de neutrófilo para o foco inflamatório já foi bastante demonstrada na literatura. De acordo com Souza *et al.* (1988), a migração de neutrófilos induzida por carragenina ou zymosan na cavidade peritoneal diminui quando a cavidade é depletada de macrófagos residentes, enquanto é aumentada pelo o pré-tratamento com tioglicolato. Corroborando com esses achados, outros resultados demonstraram que o lipopolissacarídeo (LPS) quando administrado na cavidade peritoneal de ratos, induzia a migração de neutrófilos através da liberação por macrófagos de um potente fator quimiotático para neutrófilos (CUNHA; FERREIRA, 1986).

O envolvimento de macrófagos residentes também foi demonstrado no estudo da resposta inflamatória induzida por proteínas (CgLP) isoladas do látex da planta *Cryptostegya grandiflora* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009). O aumento na população de macrófagos residentes na cavidade peritoneal com tioglicolato aumentou mais de 100% a migração induzida pela CgLP. O pré-tratamento com tioglicolato na cavidade peritoneal também induziu um aumento de 303% na migração neutrofílica induzida pela lectina DrosL (FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

Mastócitos se distribuem amplamente nos tecidos conjuntivos e participam das reações inflamatórias agudas e persistentes. Esta célula secretora, em estado de repouso, contém grande quantidade de grânulos compostos por um complexo de moléculas bioativas, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1, MCP-1, histamina, proteases, leucotrienos e interleucinas dispersas pelo citoplasma. O mastócito quando ativado, em um processo conhecido como degranulação, libera o conteúdo dos seus grânulos, que por sua vez deflagram diferentes respostas inflamatórias, tais como o recrutamento de neutrófilos e monócitos, dilatação arterial e o aumento da permeabilidade vascular (BRIGHTLING *et al.*, 2003; NOLI *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2010; TANG *et al.*, 1998).

O envolvimento dos mastócitos no efeito quimiotático para neutrófilos induzido pela fração PL foi investigado, depletando-se os mastócitos residentes na cavidade peritoneal com o composto 48/80. De forma inesperada, observou-se que a migração de neutrófilos induzida pela fração proteica (PL) foi significativamente aumentada nos animais depletados de mastócitos. Como já havíamos sugerido que o efeito quimiotático para neutrófilos induzida pela PL dependia de macrófagos residentes, em conjunto com este novo resultado, podemos supor uma possível ação moduladora inibitória dos mastócitos sobre os macrófagos, uma vez que a depleção dos mastócitos, intensificou a migração neutrofílica. Entretanto, investigações futuras são necessárias para elucidar o papel dos mastócitos sobre a quimiotaxia de neutrófilos induzida pela PL.

O papel dos mastócitos como moduladores da migração de neutrófilos tem sido descrito na literatura (ALENCAR *et al.*, 2005b; RODGERS; XIONG, 1996). Citocinas inibitórias, tais como IL-4 e IL-10, controlando a resposta imune-inflamatória, podem estar envolvidas neste efeito (CUNHA *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2011; VICELK; LEE, 1994). Assreuy *et al.* (2003), durante um estudo da atividade pró-inflamatória da Espermedesina suína, uma glicoproteína do fluido seminal suíno, demonstraram que tanto o tratamento com o tioglicolato quanto a depleção de mastócitos pelo composto 48/80 aumentavam a migração de neutrófilos induzida pela Espermedesina. O efeito quimiotático indireto também foi demonstrado injetando o sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados pela Espermedesina na cavidade peritoneal dos animais. Utilizando anticorpos anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-4 em cultura de macrófagos e mastócitos, respectivamente, demonstraram que a migração neutrofílica induzida pela Espermedesina envolvia a

liberação do mediador inflamatório TNF- $\alpha$  por macrófagos estimulados e que esta atividade era modulada pela interleucina-4 (IL-4) liberada por mastócitos.

O equilíbrio entre as citocinas liberadas pelos macrófagos (TNF- $\alpha$ ) e mastócitos (IL-4) parecem controlar o início da migração de neutrófilos em resposta à estímulos inflamatórios, evitando um recrutamento neutrofílico excessivo. Esta regulação parece ser crucial durante situações em que o acúmulo excessivo de neutrófilos poderia provocar danos aos tecidos (ASSREUY *et al.*, 2003).

No intuito de evidenciar os possíveis mediadores envolvidos na atividade pró-inflamatória da fração proteica (PL) foi realizada uma modulação farmacológica no modelo de peritonite, utilizando diversos tipos de bloqueadores.

Neste estudo, ficou demonstrado que as drogas anti-inflamatórias dexametasona e talidomida, um glicocorticóide e um inibidor específico de TNF- $\alpha$ , respectivamente, inibem significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pelo látex. Estes resultados sugerem a participação de citocinas, inclusive TNF- $\alpha$  na resposta inflamatória induzida pela fração PL de *C. procera*, uma vez que é bem estabelecido o efeito inibidor da dexametasona sobre a liberação de prostaglandinas, citocinas e quimiocinas por macrófagos (KARTORI *et al.*, 1990; ODA; KARTORI, 1992; ROCHA *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 1997).

Os efeitos farmacológicos dos glicocorticóides são geralmente atribuídos à supressão de múltiplas vias sinalizadoras envolvidas na resposta inflamatória levando a uma redução nos níveis de mediadores químicos da inflamação (PG5, leucotrienos, citocinas, quimiocinas e NO) no sítio da injúria. Essas drogas são responsáveis pela indução da síntese de vários genes, incluindo o gene da anexina 1, que inibe a fosfolipase A2 (PLA2), uma enzima responsável pela liberação de ácido araquidônico a partir dos fosfolipídios da membrana celular, com posterior ativação das vias das ciclo-oxigenases, que determina formação de PGs, e pela ativação da via das lipo-oxigenases, responsável pela síntese dos leucotrienos. Tal mecanismo de ação pode explicar, pelo menos em parte o efeito global desses agentes sobre as células, contribuindo para a redução das consequências da resposta inflamatória (CAMERON, 2005; GOLIKOV *et al.*, 1994; HIRSCHMANN *et al.*, 1991; STEWART *et al.*, 2002).

Com relação a migração de neutrófilos, tem sido descrito que a dexametasona inibe a migração dessas células, sendo esse efeito explicado como resultado do bloqueio da liberação de fatores quimiotáticos em resposta a estímulos

inflamatórios (FACCIOLI *et al.*, 1990; CUNHA; FERREIRA, 1986) ou pelo bloqueio da adesão neutrófilo-endotélio (MOON; TERSHAKOVIC, 1953). Este bloqueio parece ocorrer, mas precisamente, na etapa da migração, visto que os neutrófilos permanecem entre o endotélio e a membrana basal sem atingir o tecido perivascular (KATORI *et al.*, 1990; ODA; KATORI, 1992).

Além disso, atribuem-se aos glicocorticoides o bloqueio da transcrição do RNA mensageiro de determinadas citocinas, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-8, com consequente inibição da síntese destes mediadores por macrófagos (AUPHAN *et al.*, 1995; BARNES; ADCOCK, 1993; BEUTLER *et al.*, 1986; WILCKENES; DERIJK, 1997) bem como, uma redução na expressão dos seus receptores, de moléculas de adesão e de várias enzimas que produzem mediadores participantes do processo inflamatório, como a fosfolipase A2, ciclooxigenase 2 (induzida) e óxido nítrico sintase (BARNES; ADCOCK, 1993). O suposto envolvimento do TNF- $\alpha$  no efeito pró-inflamatório das proteínas do látex é corroborado por estudos que demonstram que a talidomida suprime de forma seletiva a produção desta citocina através da degradação do RNA mensageiro (MOREIRA *et al.*, 1993).

O pré-tratamento dos animais com indometacina, um inibidor inespecífico das ciclooxigenase 1 e 2, bem como o celecoxib, inibidor seletivo da COX-2, reduziu significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela fração PL. Estes dados sugerem a participação de mediadores lipídicos (prostaglandinas) derivados do metabolismo do ácido araquidônico, uma vez que inibida sua formação, houve consequente redução na migração neutrofílica induzida por PL.

Efeitos similares na modulação dos efeitos de PL foram observados no pré-tratamento com pentoxifilina, fármaco com potente ação vasodilatador. A pentoxifilina (PTX), um inibidor da fosfodiesterase, apresenta propriedades anti-inflamatórias exercendo efeitos inibitórios sobre interleucina-1 (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8 (NEUNER *et al.*, 1994), IFN- $\gamma$  e IL-2 (RIENECK, 1993), e um forte efeito inibidor na produção de NO em camundongos (VADIEI *et al.*, 1996). Pentoxifilina possui efeito inibidor na produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos (SZTRYMF *et al.*, 2004), por aumentar os níveis intracelulares de AMPc, diminuir os níveis de RNAm para a produção de TNF- $\alpha$  afetando a transcrição para a sua síntese (HEN-I *et al.*, 2004; JI *et al.*, 2004). Portanto, a ação anti-inflamatória da PTX reduziu a ação pró-inflamatória da fração proteica, possivelmente pela sua capacidade de inibir a

produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ . É demonstrado na literatura que a PTX reduz citocinas como TNF- $\alpha$  (JI *et al.*, 2004; SULLIVAN *et al.*, 1988), IL-1 $\beta$  (SILVA *et al.*, 2000) e IL-8 (GUTIERREZ REYES *et al.*, 2006).

Por outro lado, o envolvimento de PAF (Fator Ativador de Plaquetas) e histamina, pode ser descartado considerando-se que o tratamento dos animais com drogas inibidoras da liberação destes mediadores (PCA e meclizina, respectivamente), foi ineficiente em inibir o efeito pró-inflamatório da fração PL de *C. procera*.

Estudos preliminares desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, demonstraram a capacidade das proteínas do látex de *C. procera* (PL) em estimular diretamente macrófagos cultivados *in vitro*. O sobrenadante da cultura foi utilizado para determinação dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . A estimulação de macrófagos com PL induziu um aumento significativo dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , de forma semelhante ao LPS e significativamente diferente do controle negativo RPMI (FIGUEIREDO, 2011). Estes dados confirmam a hipótese de que a fração proteica confere um estímulo aos macrófagos com consequente liberação destas citocinas pró-inflamatórias.

Ao investigar a presença das citocinas inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  no fluido peritoneal após o estímulo com a fração PL, verificamos que os níveis de IL-1 e IL-6 estavam aumentados quando comparado com o grupo salina. Mais uma vez confirmamos que PL é capaz de induzir a liberação de mediadores quimiotáticos por células residentes, evento importante para o recrutamento de neutrófilos. Entretanto, os níveis de TNF- $\alpha$  não estavam aumentados. Este dado corrobora com os dados relatados por Assreuy *et al.* (2003), em que a atividade quimiotática para neutrófilos envolvia a liberação do mediador inflamatório TNF- $\alpha$  por macrófagos estimulados e que esta atividade era modulada pela interleucina-4 (IL-4) liberada por mastócitos. Portanto, os níveis baixos de TNF- $\alpha$  no fluido peritoneal dos animais estimulados i.p. com PL, pode ser explicado por uma possível modulação negativa exercida pelo mastócito via liberação de IL-6, uma vez que esta citocina possui efeito regulatório sobre a produção de TNF- $\alpha$  e se encontrava em altos níveis no fluido peritoneal.

O potencial da fração proteica (PL) em promover quimiotaxia para neutrófilos em uma cavidade com predomínio de macrófagos residentes foi investigado no modelo da bolsa de ar subcutânea. Nesta cavidade artificial, coletou-se o fluido após 4, 24 e 48 horas da administração de PL para avaliação do perfil da

migração leucocitária. Demonstrou-se que PL induz uma potente migração de leucócitos com 4 e 24 horas, com predomínio de células polimorfonucleares, quando comparado às mononucleares. Corroborando com os resultados do modelo de peritonite, estes dados confirmaram a hipótese levantada anteriormente de que o efeito ativador da migração de neutrófilos induzida pela fração PL é dependente da interação desta fração com macrófagos, provavelmente através da ligação com receptores de membrana elicitando assim a liberação/síntese de fatores quimiotáticos como as citocinas. Neste modelo, observou-se uma maior responsividade ao efeito quimiotático para neutrófilos induzido pela PL quando comparado àquele obtido no modelo de peritonite. Isto pode ser explicado pelo fato desta cavidade ser naturalmente depletada de mastócitos, evitando assim a modulação inibitória exercida pelos mastócitos sobre os mediadores quimiotáticos liberados pelos macrófagos.

Está comprovado que o óxido nítrico derivado de macrófagos (NO) é um dos principais reguladores da inflamação e da função imunológica (MACMICKING *et al.*, 1997; SCHIMIDT; WALTER, 1994). Por exemplo, demonstrou-se que o NO produzido em macrófagos tem efeitos antibacterianos e antivirais (JORENS *et al.*, 1995). Em macrófagos ativados, a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é aumentada, resultando em produção abundante de NO (JORENS *et al.*, 1995; KLEINERT *et al.*, 2003). Assim, a expressão de iNOS e/ou os níveis de produção de NO em macrófagos servem como indicadores para a ativação dos macrófagos. Na verdade, atividades inflamatória e imunomodulatória de várias plantas medicinais foram avaliadas usando esses parâmetros, por exemplo, a *Glycyrrhiza uralensis Fisch* (CHENG *et al.*, 2008); *Antrodia camphorata* (HSEU *et al.*, 2005); *Poria cocos* (LEE; JEON, 2003); *Hericium erinaceum* (SON *et al.*, 2006). Kesharwani e Sodhi (2007) também demonstraram, *in vitro*, a capacidade de lectina de Concanavalina A e a fitohemaglutinina em induzir a produção de NO e a expressão de iNOS em macrófagos murinos.

Estudos anteriores, utilizando extratos aquosos do látex de *C.procera*, demonstraram uma capacidade do látex em promover a migração e ativação de macrófagos e facilitar a produção de NO via regulação positiva da expressão do gene iNOS em macrófagos, quando administrado intraperitonalmente em camundongos (ABDEL *et al.*, 2009).

Nos processos inflamatórios, o óxido nítrico (NO) promove vasodilação, relaxamento da musculatura lisa, redução da agregação e adesão plaquetária, além de ser citotóxico para determinados patógenos. Logo, este mediador é bastante investigado na resposta inflamatória, porém por ser um gás bastante reativo, o NO é dificilmente dosado de forma direta, sendo os seus metabólitos, nitrito e nitrato, utilizados para monitorar a sua formação através da reação de Griess. Portanto, neste estudo o fluido coletado no modelo de bolsa de ar foi utilizado na determinação dos níveis de nitrito. Os resultados demonstraram que houve um aumento nesses níveis após 4, 24 e 48 horas da administração de PL.

O aumento da permeabilidade vascular, levando ao extravasamento de fluido rico em proteína (exsudato) para o tecido extravascular, é uma característica fundamental da inflamação aguda. Neste sentido foi avaliada a capacidade da fração proteica (PL) em aumentar a permeabilidade vascular na cavidade peritoneal de camundongos. A fração proteica promoveu um significativo aumento da permeabilidade vascular com 2 e 3 horas após tratamento quando comparado aos animais tratados com salina ou zymosan, evento importante na formação do edema e na exsudação de leucócitos através do endotélio para o tecido perivascular. Estes resultados juntamente com níveis aumentados de NO, sugerem a participação desse mediador no efeito pró-inflamatório da fração proteica.

As prostaglandinas originadas da conversão do ácido araquidônico também agem como importantes substâncias vasodilatadoras. A liberação do ácido araquidônico ocorre como consequência da estimulação específica de receptores da superfície celular e da subsequente ativação de fosfolipases do tipo A2. Vários tipos de células liberam ácido araquidônico em resposta a diferentes estímulos tais como bradicinina, angiotensina II, vasopressina, trombina, colágeno, adrenalina, peptídios quimiotáticos e histamina (CARVALHO *et al.*, 1996). A modulação farmacológica com indometacina e celecoxib reduziram o efeito da PL sobre a migração de neutrófilos, indicando o envolvimento de mediadores lipídicos, como as prostaglandinas, nos eventos que medeiam o recrutamento das células inflamatórias.

De posse dos resultados obtidos até o momento, pode-se especular o importante papel de macrófagos e de citocinas na resposta inflamatória induzida pela fração PL de *C. procera*. Essa capacidade da PL para ativar células efetoras em respostas inflamatórias e imunes, demonstra a necessidade de maior investigação

sobre os mecanismos subjacentes à ampla gama de ações farmacológicas de *C. procera*.

Em aprofundamento ao estudo do mecanismo de ação da fração PL na inflamação, investigamos o efeito dessas proteínas na quimiotaxia para leucócitos na microcirculação mesentérica. A observação *in situ* demonstrou que a fração PL promove uma indução no rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio vascular.

A adesão ao endotélio é um pré-requisito para a infiltração dos neutrófilos no local da inflamação. Este processo é mediado pelas selectinas, que através de domínios lectínicos reconhecem e interagem de forma específica com carboidratos de superfície. Entre as moléculas envolvidas na adesão firme de neutrófilos estão CD11b/CD18 (nos neutrófilos) ou ICAM-1 e VCAM-1 nas células endoteliais (ROBBINS *et al.*, 2005).

Tanto a adesão como a diapedese leucocitárias são afetadas por mediadores químicos da inflamação, os quais, além do efeito quimiotático, podem gerar uma cascata capaz de ampliar e liberar outros fatores estimulantes. A quimiotaxia envolve a ligação de mediadores químicos ou agentes quimiotáticos a receptores específicos na superfície da proteína G de leucócitos que ativa a via da fosfoinositol-3 quinase (IP-3K). Essas alterações causam aumento do cálcio citosólico e ativam as guanosinas trifosfatases (GTPases), favorecendo a apresentação de pseudópodes e o movimento leucocitário. Além da locomoção, os agentes quimiotáticos também induzem à ativação dos leucócitos com todas suas consequências: produção de metabólitos do ácido aracdônico; degranulação e secreção de enzimas lisossômicas; secreção de citocinas, assim como maior expressão de moléculas de adesão e maior exposição das integrinas (RRANCISCHETTI *et al.*, 2010).

Podemos então sugerir que o aumento da intensidade de interação entre os leucócitos e o endotélio (rolamento e adesão) em resposta a administração da fração PL, pode estar relacionado a sua capacidade de induzir a liberação de citocinas/quimiocinas, uma vez que estes mediadores atuam induzindo a expressão de moléculas de adesão, aumentando a avidéz de ligação entre estas moléculas de adesão, ativando neutrófilos e promovendo quimiotaxia.

O próximo passo foi a investigação deste efeito quimiotático da PL diretamente sobre neutrófilos cultivados *in vitro*. Os neutrófilos isolados (segundo metodologia descrita anteriormente) foram estimulados em microcâmara com PL, KC

(controle positivo de quimiotaxia) e RPMI (controle negativo). Os resultados indicaram que, além do efeito mediado por macrófagos residentes (demonstrado anteriormente), a fração PL interage diretamente com neutrófilos promovendo quimiotaxia.

Este dual efeito quimiotático para neutrófilos por mecanismos diretos e indiretos, explica a potente migração neutrofílica observada após o estímulo pela fração proteica PL. Resultados semelhantes foram observados em estudos com uma lectina (PaL) isolada das sementes da planta *Pisum arvense* (ALENCAR *et al.*, 2005b). Estudos *in vivo* demonstraram que a PaL foi capaz de induzir uma intensa migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de forma dose-dependente, e teve seu efeito potencializado após incremento na população de macrófagos residentes pelo tioglicolato. O efeito quimiotático indireto também foi demonstrado pela injeção na cavidade peritoneal do sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados pela PaL. A depleção dos mastócitos pelo tratamento subcrônico com o composto 48/80 também promoveu uma indução na quimiotaxia para neutrófilos, evidenciando mais uma vez o papel modulatório dos mastócitos sobre o recrutamento de células inflamatórias. Em continuidade nos estudos do efeito pró-inflamatório da PaL, Alencar *et al.* (2005b), demonstraram que esta lectina também era capaz de interagir diretamente com os neutrófilos, induzindo quimiotaxia *in vitro*.

Fatores quimiotáticos podem ser produzidos por uma ampla variedade de células, como as células endoteliais e epiteliais, macrófagos, monócitos, linfócitos e plaquetas, incluindo os próprios neutrófilos e células parenquimais (VICENTE-MANZANARES, 2004). Os neutrófilos podem ser induzidos para expressar uma série de genes, cujos produtos estão no cerne das respostas inflamatória e imunológica. Estes incluem não só receptores Fc, componentes do complemento, agentes antimicrobianos catiônicos e da proteína NADPH-oxidase, mas também os leucotrienos, prostaglandinas, NO e uma variedade de citocinas e quimiocinas. O fato da maioria desses atrativos serem principalmente quimiotático para neutrófilos, estes podem potencialmente desempenhar um papel no recrutamento sequencial de tipos distintos de células (monócitos, células dendríticas imaturas e subconjuntos dos linfócitos T), para os tecidos inflamados (SCAPINI *et al.*, 2000). Portanto, as células quimiotáticas parecem ser capazes de retransmitir o sinal quimiotático para as células circundantes, para espalhar a resposta quimiotática (BAGORDA *et al.*, 2006).

Considerando a importância do neutrófilos na resposta inicial dos processos inflamatórios, e diante do conhecido efeito da fração PL no recrutamento destas células, passamos a investigar o efeito da PL na indução de mediadores inflamatórios por neutrófilos *in vitro*. Entre os mediadores investigados temos o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> e NO.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina que possui múltiplas funções, incluindo participação na imunidade, indução de respostas inflamatórias e apoptose. É uma potente citocina, rapidamente produzida em grandes quantidades em resposta a estímulos inflamatórios e considerada uma citocina inflamatória primária, devido seu papel de iniciar a cascata de ativação de outras citocinas (SOMMER *et al.*, 2004).

TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são citocinas que, embora com diferenças estruturais, compartilham muitos efeitos biológicos. As atividades primordiais da IL-1 são proliferação e ativação de linfócitos B, neutrófilos, monócitos/macrófagos, aumentando as atividades quimiotáticas e fagocitárias. Estimula a adesão de leucócitos, aumenta a expressão das moléculas de adesão pelas células endoteliais, inibe a proliferação das células endoteliais, aumenta a atividade de coagulação, tendo participação na gênese da coagulação intravascular disseminada (AREND, 1991; DINARELLO, 1989).

Outras pesquisas demonstram o importante papel de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no processo de migração neutrofílica através do aumento da expressão das moléculas de adesão na superfície endotelial, sendo estas citocinas necessárias para o correto endereçamento dos neutrófilos (CANETTI *et al.*, 2001; HICKEY *et al.*, 1997; HWANG; KELLY; SAUNDERS *et al.*, 2005; KUBES, 2007). No entanto, neutrófilos ativados são essenciais para a liberação de grandes quantidades destas citocinas. Sendo este dado confirmado através do bloqueio da migração de neutrófilos por fucoidina, ferramenta farmacológica que bloqueia a interação entre selectinas do tipo E e P. A diminuição do influxo celular atenua fortemente as concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no local inflamado (SACHS *et al.*, 2011).

Os neutrófilos quando estimulados *in vitro* pelas proteínas do látex liberaram quantidades significativas dos mediadores TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NO e PGE<sub>2</sub>, quando comparado com o grupo controle (RPMI). A produção destas citocinas pelos neutrófilos após indução pela fração proteica, explica em parte, o efeito pró-inflamatório da PL, uma vez que a liberação destas citocinas desencadeiam importantes eventos para o desenvolvimento do processo inflamatório, tais como

ativação endotelial, aumento na expressão de moléculas de adesão e de seus receptores nos neutrófilos e endotélio (TNF- $\alpha$  e IL-1); vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e edema (NO e PGE<sub>2</sub>); rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio e quimiotaxia para o sítio inflamatório (IL-8), além do efeito de retroalimentação, estimulando a produção e liberação de outras citocinas inflamatórias por outras células, favorecendo assim o recrutamento de mais células inflamatórias.

Os neutrófilos constituem a defesa celular primária contra infecções bacterianas e fúngicas. Estas células ingerem micróbios por fagocitose, e os micro-organismos ingeridos são destruídos pela combinação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de componentes citotóxicos de grânulos (FAURSCHEU; BORREGAARD, 2003; NAUSEEF, 2007). Essa tarefa é facilitada pelo aumento no número de receptores na superfície das células, em resposta a estímulos pró-inflamatórios.

Do ponto de vista clínico, é bem conhecido que os neutrófilos estão presentes como células efetoras em doenças tais como as doenças infecciosas, sepse, doenças auto-imunes, cardiovasculares e tumorais (MAGRONE; JIRILLO, 2012). Embora os neutrófilos tenham sido considerados um dos principais contribuintes para iniciar a defesa contra micro-organismos invasores, podem também ocasionar danos em estados inflamatórios crônicos. Por exemplo, o estresse oxidativo dependente de neutrófilos está implicado na patogênese de muitas doenças inflamatórias, tais como aqueles do trato gastrointestinal (NAITO; YASHIKAWA, 2011). Considerando o papel fundamental desempenhado pelos neutrófilos na inflamação e o fato de várias proteínas vegetais serem potentes moduladores das funções efetoras em neutrófilos, é possível sugerir que a fração proteica (PL) do látex de *C. procera* possa ser utilizada como possível ferramenta não somente em estudos de esclarecimento das vias da resposta inflamatória, mas também como uma molécula com forte potencial de controle da resposta imune. Entretanto, para isso serão necessários estudos adicionais no sentido de melhor caracterizar o seu mecanismo de ação bem como seus mediadores envolvidos.

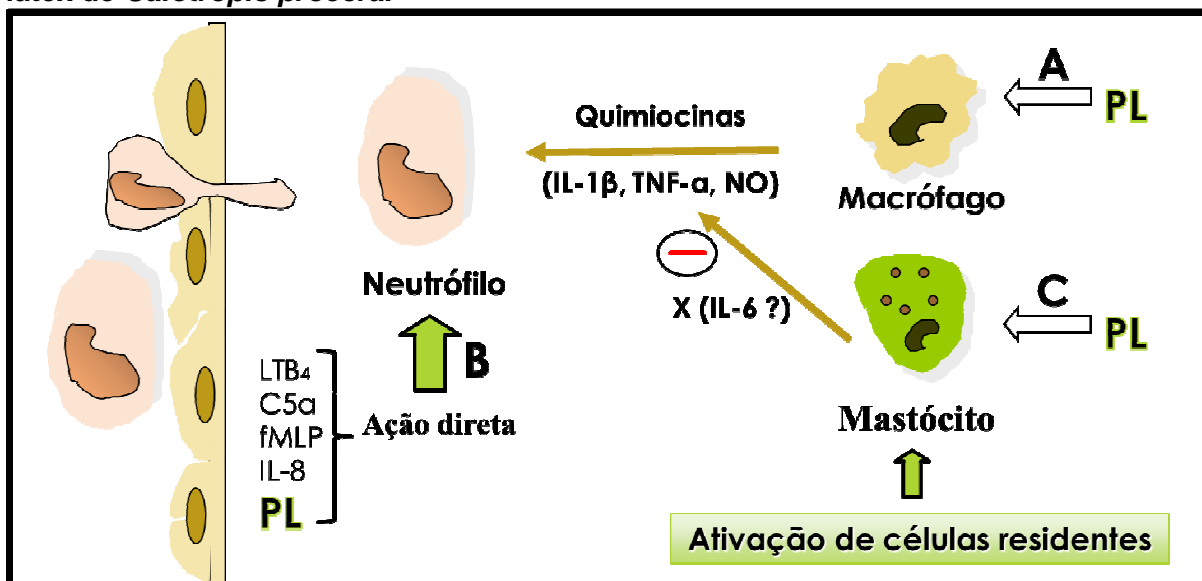
Em conclusão, a fração proteica PL tem mostrado exibir uma atividade pró-inflamatória *in vivo* e *in vitro*. O efeito *in vivo* parece ocorrer por um dual mecanismo que é independente, mas também dependente de células residentes. Os mastócitos estimulados parecem exercer uma modulação inibitória sobre a liberação

de mediadores quimiotáticos por macrófagos (ALENCAR *et al.*, 2005b; ASSREUY *et al.*, 2003; RODGERS; XIONG, 1996).

Está claro, na literatura, que mediadores como TNF- $\alpha$  e IL-1 tem papéis fundamentais na inflamação, e que outros mediadores, com ação anti-inflamatória (IL-4 e IL-10), estão presentes concomitantemente, modulando os efeitos e a liberação dos mediadores inflamatórios. A relação desses mediadores é fundamental para a evolução ou resolução do processo, portanto, a descoberta de moléculas bioativas com efeito modulatório sobre estes mediadores se reverte de grande importância para o controle de doenças inflamatórias.

Compreender a base molecular de interações ligante-receptor e os sinais intracelulares envolvidos na adesão, migração e ativação de neutrófilos é crucial para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas que aumentem os efeitos desejáveis ou inibam os efeitos deletérios da ativação de neutrófilos nos locais de lesão tecidual. Apesar de grandes avanços terem ocorrido para a compreensão dos mediadores endógenos e seus papéis na resposta inflamatória, um longo caminho ainda deve ser percorrido para que se entendam os complexos mecanismos fisiopatológicos dessa resposta.

**FIGURA 14 - Hipótese de mecanismo para o efeito da fração proteica (PL) isolada do látex de *Calotropis procera*.**



Fonte: Elaborada pela autora

PL é um agente quimiotático direto e indireto para neutrófilos. **(A)** PL interage com macrófagos, levando-o à ativação e à consequente liberação de mediadores quimiotáticos (TNF-α, IL-1β, NO). **(B)** PL interage diretamente com o neutrófilo, ativando-o. **(C)** PL interage também com mastócitos, ativando estas células a liberar uma substância X (IL-6?), que inibe a liberação dos mediadores quimiotáticos pelos macrófagos.

## 6 CONCLUSÃO

O conjunto de resultados aqui produzidos permite concluir que a fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL), quando administrada por via intraperitoneal, induz uma resposta inflamatória aguda, caracterizada pela migração de neutrófilos e aumento da permeabilidade vascular no local estimulado. Além disso, pode-se também referir que a resposta inflamatória induzida por PL ocorre de forma indireta, *via* macrófagos residentes, que possivelmente estão sendo estimulados por PL à liberação de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) e NO; e de forma direta, induzindo o neutrófilo à liberação dos mediadores, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> e NO (demonstrado em metodologia *in vitro*); como também, promovendo quimiotaxia para estas células, por meio de uma indução no rolamento e adesão ao endotélio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. **Imunologia Celular e Molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 267-302.

ABBAS, A.K.; JANEWAY, C.A., JR. Immunology: Improving on Nature in the Twenty-First Century. **Cell.**, v. 100, p. 129-138, 2000.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 6. ed. Philadelphia: Saunders, 2003.

AGGARWAL, B.B.; NATARAJAN, K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. **Eur. Cytokine Netw.**, v.7, p. 93-124, 1996.

AGRAWAL, A.A.; KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology and evolution plant defense against herbivory. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v.40, p. 311-331, 2009.

AJUEBOR, M. N.; DAS, A. M.; VIRAG, L.; FLOWER, R.J.; SZABO, C.; PERRETI, M. Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. **J. Immunol.**, v. 162, n. 3, p. 1685-1691, 1999.

AKIRA, S.; HIRANO, T.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). **FASEB J.**, v.4, p.2860-2867, 1990.

ALBUQUERQUE, T.M.; ALENCAR, N.M.N.; FIGUEIREDO, J.G.; FIGUEIREDO, I.S.T.; TEIXEIRA, C.M.; BITENCOURT, F.S.; SECCO, D.D.; ARAÚJO, E.S.; ANA MARIA LEÃO, C.A.; RAMOS, M.V. Vascular permeability, neutrophil migration and edematogenic effects induced by the latex of *Cryptostegia grandiflora*. **Toxicon**, v. 53, n.1, p.15-23, 2009.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure function and inhibition. **Biochem J.**, v. 357, p. 593-615, 2001.

ALENCAR, N.M.N. **Estudo do mecanismo e mediadores químicos envolvidos na atividade pró-inflamatória das lectinas de sementes de *Vatairea macrocarpa* e *Dioclea violácea***. 2001. Dissertação (Mestrado) Departamento de Bioquímica e Biologia molecular, Universidade Federal do Ceará, 2001.

ALENCAR, N.M.N.; CAVALCANTE, C.F.; VASCONCELOS, M.P.; LEITE, K.B.; ARAGÃO, K.S.; ASSREUY, A.M.S.; NOGUEIRA, N.A.P.; CAVADA, B.S.; VALE, M.R. Anti-inflammatory and anti-microbial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental model of infectious peritonitis. **J. of Pharm. and Pharmacol.**, Inglaterra, v. 57, n. 7, p. 919-922, 2005.

ALENCAR, N.M.N.; FIGUEIREDO, I.S.; VALE, M.R.; BITENCOURT, 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 Med.**, v.70, n. 12, p.1144-9, 2004.

ALENCAR, N.M.N.; OLIVEIRA, J.S.; MESQUITA, R.O.; LIMA, M.W.; VALE, M.R.; ETCHELLS, 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. **Inflamm. Res.**, v. 55, p. 559-564, 2006.

ALENCAR, V. B. M.; ASSREUY, A. M. S.; ALENCAR, N. M. N.; MEIRELES, A. V. P.; MOTA, M. R. L.; ARAGÃO, K. S.; CAJAZEIRAS, J. B.; NAGANO, C. S.; BRITO, G. A. C.; SILVA, L. I. M. M.; PINTO, V. P. T.; SAMPAIO, A. H.; DEBRAY, H., CAVADA, B. S.; RIBEIRO, R. A. Lectin of *Pisum arvense* seeds induces in-vivo and in-vitro neutrophil migration. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 375-38, 2005b.

AMURA, C. R.; CHEN, L.C.; HIROHASHI, N.; LEI, M.G.; MORRISON, D.C. Two functionally independent pathways for lipopolysaccharide-dependent activation of mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v.159, p.5079-5083, 1997.

ARCHER, B. An alkaline protease inhibitor from *Hevea brasiliensis* latex. **Phytochem**, v. 23, p. 633-639, 1983.

AREND, W. P. Interleukin- 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. **J. Clin. Invest.**, v. 88, p. 1445-1451, 1991.

AREND, W.P., GABAY, C. Physiologic role of interleukin-1 receptor antagonist. **Arthritis Res.**, v. 2, n. 4, p. 245-8, 2002.

ARYA, S.; KUMAR, V. L. Anti-inflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators Inflamm.**, v. 4, p. 228-232, 2005.

ARRUDA, V.A.; GUIMARAES, A.Q.; HYSLOPA, S.; ARAUJO, P.M.F.; BONC, C.; ARAUJO, A.L. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom stimulates leukocyte migration into the peritoneal cavity of mice. **Toxicol.**, v. 41, p. 99–107, 2003.

ASSREUY, A.M.S.; MARTINS, G.J.; MOREIRA, E.E.F.; BRITO, G.A.C.; CAVADA, B.S.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Prevention of Cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **J. Urol.**, v.161, p. 1988-93, 1999.

ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, N.M.N.; CAVADA, B.S.; ROCHA-FILHO, D.R.; FEITOSA, R.F.G.; CUNHA, F.Q.; CALVETE, J.J.; RIBEIRO, R.A. Porcine Spermadhesin PSP-I/PSP-II Stimulates Macrophages to Release a Neutrophil Chemotactic Substance: Modulation by Mast Cells. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1836-1841, 2003.

AUPHAN, N.; DIDONATO, J.A.; ROSETTE, C.; HELMBERG, A.; KARINS, M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NK- $\kappa$ B activity though induction of I $\kappa$ B sythesis. **Science**, v. 270, p. 286-289, 1995.

BAEZ, S. Simultaneous measurements of radii and wall thickness of microvessels in the anesthetized rat. **Circ. Res.**, v. 25, p. 315-329, 1969.

BAGORDA, A.; MIHAYLOV, V.A.; PARENT, C.A. Chemotaxis: moving forward and holding on to the past. **J. Thromb. Haemost.**, v. 95, n. 1, p. 12-21, 2006.

BARNES, P. J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacology Science**, v.12, n.12, p.436-441, 1993.

BARRINGTON, R.; ZHANG, M.; FISCHER, M.; CARROLL, M.C. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. **Immunol Rev.**, v. 180, p. 5-15, 2001.

BARTON, B.E.; SHORTALL, J.; JACKSON, J.V. Interleukins 6 and 11 protect mice from mortality in a staphylococcal enterotoxin induced toxic shock model. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 714-718, 1996.

BASU, A.; CHAUDHURI, A.K. Preliminary studies on the anti-inflammatory and analgesic activities of *Calotropis procera* root extract. **J. Ethnopharmacol.**, v.31, p.319-324, 1991.

BAUHMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, v.15, n. 2, p. 74-80, 1994.

BEUTLER, B.; KROCHIN, N.; MILSARK, I.W.; LUERDKE, C.; CERAMI, A. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis; mechanisms of endotoxin resistance. **Science**, v. 232, p. 977-980, 1986.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common Mediator. **Ann. Ver. Biochem.**, v. 57, p. 505-18, 1988.

BOYDEN, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. **J. Exp. Med.**, v. 115, p. 543-466, 1962.

BRAQUET, P.; TOUQUI, L.; SHEN, T.Y.; VARGAFTIG, B.B. Perspectives in platelet activating factors research. **Pharmacol. Rev.**, v.39, n.2, p.97-145, 1987.

BRIGHTLING, C. E.; BRADDING, P.; PAVORD, I.D.; WARDLAW, A.J. New insights into the role of the mast cell in asthma. **Clin. Exp. Allergy**, v.33, p.550-6, 2003.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D.S.; EINRAUCH, Y. W.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, p. 1477-8, 2004.

BROCKBANK, W.J.; LYNN, K.R. Purification and preliminary characterization of two asclepains from the latex of *Asclepias syriaca L.* (milkweed). **Biochim. Biophys. Acta**, v. 578, p.13-22, 1979.

BROIDE, D.H. Inflammation cells: Structure and Function. In: STITES, D.D.; TERR, A.I. **Basic and Clinical Immunology**. [S.l.]: Appletin and Lange, 1991. p. 141-183.

CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob ótica da Química Medicina Moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 77-99.

CAMERON, M. H. Fighting inflammation. **Rehab. Manag.**, v.18, n. 6, p. 26-28, 2005.

CANETTI, C. A.; LEUNG, B.P.; CULSHAW, S.; CUNHA, F.Q.; Liew. IL-18 enhances collagen-induced by recruiting neutrophils via TNF-alpha and leukotriene B4. **J. Immunol.**, v.171, p.1009-1015, 2003.

CARLOS, T. M.; HARLAN, J.M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, v. 84, p. 2068-210, 1994.

CARVALHO, J.T.C.; TEIXEIRA, J.R.M.; SOUZA, P.J.C.; BASTOS, J.K.; FILHO, D.S.; SARTI, S.J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **J. Ethnopharm.**, v. 53, p. 175-178, 1996.

CHEN, J.C.; CHEN, H.M.; SHYR, M.H.; FAN, L.L.; CHI, T.Y.; CHI, C.P.; CHEN, M.F. Selective inhibition of inducible nitric oxide in ischemia-reperfusion of rat small intestine. **J. Formos. Med. Assoc.**, v. 99, n.3, p. 213 - 218, 2000.

CHENG, A.; WAN, F.; JIN, Z.; WANG, J.; XU, X. Nitrite oxide and inducible nitric oxide synthase were regulated by polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. **J. Ethnopharmacol.**, v.118, p. 59—64, 2008.

CHEYE, M. L.; CHEUNG, K.Y. Beta-1, 3-glucanase is highly-expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis*. **Plant. Mol. Biol.**, v. 29, p.397-402, 1995.

CHOEDON, T.; MATHAN, G.; ARYA, S; KUMAR, V.L.; KUMAR, V. Anticancer and cytotoxic properties of latex of *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, p. 2517-2522, 2006.

CIRINO, G.; FIORUCCI, S.; SESSA, W.C.; Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 2, p. 91-94, 2003.

COSTA, J. J.; GALLI, S.J. Mast cells and basophils. In: RICH, R.; FLEISHER, T.A.; SCHWARTZ, B.D.; SHEARER, V.V.T.; SROBER, W. **Clinical Immunology: Principles and practice**. St Louis: Mosby-year book Inc, 1998. p. 408-430.

CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S.H. The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. **European Journal Pharmacology**, v.129, n.1-2, p.65-76, 1986.

CUNHA, F. Q., POOLE, S., LORENZETTI, B. B., VEIGA, F. H., FERREIRA, S. H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. **Br. J. Pharmacol.**, v. 126, p. 45-50, 1999.

CURFS, J.H.; MEIS, J.F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clin Microbiol Rev.**, v.10, p. 742-780, 1997.

CRONSTEIN, B. N.; WEISSMAN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis Rheum.**, v.136, p.147-157, 1993.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JUNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, E.C. Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Bras J Rheumatol**, v. 50, n. 4, p. 434-61, 2010.

CYSTER, J.G. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. **Science**, v. 286, p. 2098-102, 1999.

DELVES, P. J.; ROITT, D. The Immune System — First of two parts. **N Engl J Med.**, v. 343, p. 37-50, 2000.

DE MEJÍA, E. G.; PRISECARU, V. I. Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 6, p. 425-445, 2005.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carragenin and turpentine. **Journal Pathology**, v. 104, p. 15-29.

DIEYE, A.M.; TIDJANI, M.A.; DIOUF, A.; BASSENE, E.; FAYE, B. Senegalese pharmacopoeia: study of acute toxicity and antitussive activity of *Calotropis procera* AIT (Asclepiadaceae). **Dakar Med.**, v.38, p.69-72, 1993.

DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V. L. Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. **J Ethnopharmacol.**, v. 73, p. 307-311, 2000a.

DEWAN, S.; KUMAR, S.; KUMAR, V. L. Antipyretic effect of latex of *Calotropis procera*. **Ind J Pharmacol.**, v. 32, n. 3, p. 247-252, 2000b.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2095-2147, 1989.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1. In: THOMPSON, A.W. (Ed.). The cytokine handbook. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1994. chap.3, p.31-56.

\_\_\_\_\_. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503-508, 2000.

DOHERTY, G. M.; JENSEN, J. C.; ALEXANDER, H. R.; BUESH, C.M.; NORTON, J.A. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. **Surgery**, St. Louis, v. 110, n. 2, p.192-198, 1991.

DOMSALLA, A.; MELZIG, M.F. Occurrence and properties of proteases in plant latices. **Planta Med.**, v.74, p.699-711, 2008.

DUBEY, V. K.; JAGANNADI-IAM, M. V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v.62, p.1057-1071, 2003.

DUTTA, R. C. Peptide immunomodulators versus infection: an analysis. **Immunology Letters**, v. 83, n. 3, p. 1-9, 2002.

EDWARDS, J.W.C.; SEDGEWICK, A. D.; WILLOUGHBY, D. A. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injections of air: an in vivo study tissue culture system. **Journal Pathology**, v.134, p. 147, 1981.

EL-BADWI; SAMIA, M. A.; ADAM, S. E.; SHIGIDI, M. T.; HAPKE, H. J. Studies on laticiferous plants: toxic effects in goats of *Calotropis procera* latex giving by different routs of administration. **Dtsch. Tierarztl. Wschr.**, v.105, p.425-427, 1998.

ENCICLOPÉDIA Delta Universal. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Delta, 1982.

ENDRESS, M.E.; BRUYNS, P.V. A Revised Classification of Apocynaceae s.l. **Bot. Rev.**, v. 66, p.1-56, 2000.

FACCIOLI, L.H.; SOUZA, G.E.P.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Recombinant interleukin-1 and tumour necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. **Agents Actions.**, v.30, p.344-349, 1990.

FAITH, M. *et al.* How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? **Clinica Chimica Acta**, v. 396, p. 23-25, 2008.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect.**, v. 5, n. 14, p. 1317-1327, 2003.

FIEDLER, K.; SINDRILARU, A.; TERSZOWSKI, G.; KOKAI, E.; FEYERABEND, T.B.; BULLINGER, L.; RODEWALD, H.R.; BRUNNER, C. Neutrophil development and function critically depend on Bruton tyrosine kinase in a mouse model of X-linked agammaglobulinemia. **Blood**, v.117, p.1329-1339, 2011.

FIGUEIREDO, I.S.T. **Modulação do processo cicatricial de feridas cutâneas experimentais por urna biomembrana de proteínas do látex de *Calotropis procera* (AIT.) R. Br.** 2011. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

FIGUEIREDO, J.G.; BITENCOURT, F.S.; MOTA, M.R.L.; SILVESTRE, P.P.; AGUIAR, C.N.; BENEVIDES, R.G.; NASCIMENTO, K.S.; MOURA, T.R.; DAL-SECCO, D.; ASSEREUY, A.M.S.; CUNHA, F.Q.; VALE, M.R.; CAVADA, B.S.; ALENCAR, N.M.N. Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by *D. rostrata* lectin: Involvement of cytokines and nitric oxide. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 736-744, 2009.

FIGUEIREDO, I.S.T.; RAMOS, M.V.; RICARDO, N.M.P.S.; 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, n. 3, p. 512-519, 2014.

FORTES, Z. B; FARSKY, S.P.; OLIVEIRA, M.A.; GARCIA-LEME, J. Direct vital microscopic study of defective leukocyte - endothelial interactions in diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 40, p. 1267-1273, 1991.

FREITAS, A.P.F.; BITENCOURT, F.S.; BRITO, G.A.C.; ALENCAR, N.M.N.; RIBEIRO, R.A.; LIMA-JUNIOR, R.C.P; RAMOS, M.V.; VALE, M.L. Protein fraction of *Calotropis procera* latex protects against 5-fluorouracil-induced oral mucositis associated with downregulation of pivotal pro-inflammatory mediators. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 385, n. 10, p. 981-990, 2012.

FREITAS, C.D.T.; NOGUEIRA, F.C.S.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A.; DOMONT, G.B.; RAMOS, M.V. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: Biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiol. Biochem.**, v.49, p.738-743, 2011.

FREITAS, C.D.T.; OLIVEIRA, J. S.; MIRANDA, M.R.A.; MACEDO N.M.R.; SALES M. P.; VILLAS-BOAS L. A.; RAMOS M. V. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiol. Biochem.**, v.45, p.781-789, 2007.

FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J.B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, W.B. Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v. 25, n. 4, p. 575-584, 2010.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 4, p. 281-8, 2005.

GADELHA, T.S.; GADELHA, C.A.; ARAGÃO, K.S.; OLIVEIRA, C.C.; MOTA, M.R.L.; GOMES, R.C.; DE FREITAS, P.A.; TOYAMA, M.H.; DE OLIVEIRA, T.D.; ALENCAR, N.M.N.; CRIDDLE, D.N.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, p. 1050-1055, 2006.

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

GALLIN, J.I.; SYNDERMAN, R.; FEARON, D.T.; HAYNES, B.F.; NATHAN, C. Inflammation: basic principles and clinical correlates. Lippincott Williams & Williams: Philadelphia, 1999.

GARCIA-LEME, J.; WILHELM, D.L. The effects of adrenalectomy and corticosterone on vascular permeability responses in the skin on the rat. **British journal Pathology**, v.56, p.402-407, 1975.

GEBHARD, F. *et al.* Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? **Arch Surg.**, v. 135, p. 291-295, 2000.

GIORDANI, R.; LAFON, L. Action of *Carica papaya* latex on cell wall glycosidases from *Lactuca sativa*. **Phytochemistry**, v. 34, p.1473-1475, 1993.

GOMES-LEAL, W. **Inflamação Aguda, Resposta Gial e Degeneração Axonal em um Modelo de Excitotoxicidade na Medula Espinhal.** 2002. 197 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2002.

GODSON, C. *et al.* Cutting edge: Lipoxins rapidly stimulate nonphagocytic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. **Journal immunology**, v. 164, p.1663-1667, 2000.

GOLIKOV, P. P.; NIKOLAEVAI N. I.; MARCHENKO, V. V. Nonsteroidal anti inflammatory agents as modulators of glucocorticoid function of receptors. **Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.**, n. 2, p. 47-52, 1994.

GORDON, S. Macrophage Function Disorders. In: **ENCYCLOPEDIA of Life Sciences**, v. 1, p. 1-11, 2001.

GRAHAME-SMITH, D.; ARONSON, J. **Tratado da farmacologia clínica e farmacoterapia.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 481.

GRANGER, D.N.; BENOIT, J.N.; SUZUKI M.; GRISHAM, M.B. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion, **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. 683-688, 1989.

GRANGER, D.N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **J. Leuk. Biol.**, v. 55, p. 662-675, 1994.

GUTIERREZ-REYES, G.; LOPEZ-ORTAL, P.; SIXTOS, S.; CRUZ, S.; RAMIREZ IGLESIAS, M. T.; GUTIERREZ-RUIZ, M. C.; SANCHEZ-AVILA, F.; ROLDAN, E.; VARGAS-VORACKOVA, F.; KERSHENOBICH, D. Effect of pentoxifylline on levels of pro-inflammatory cytokines during chronic hepatitis C. **Scand. J. Immunol.**, v. 63, n. 6, p. 461-467, 2006.

HAGEL, J.M.; YEUNG, E.C.; FACCHINI, P.J. Got milk? the secret life of laticifers. **Trends in Plant Sci.**, v.13, p.631-639, 2008.

HAMPTON, M.B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v.92, n.9, p. 3007-3017, 1998.

HANDA, F.; SADANA, J. K; SHARMA, P. K. Allergic contact dermatitis due to the plant *Calotropis procera* (Vem: AK): a case report. **Indian J Dermatol.**, v. 29, p. 27-29, 1984.

HEN-I, L.; SHI-JYE, C.; WANG, D.; NAN-HSIUNG, F. Pharmacological modulation of TNF production in macrophages. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 37, p. 8-15, 2004.

HENSON, P.M. Dampening inflammation. **Nature Immunology**, v.6, n.12, p.1179-1181, 2005.

HIRANO, T. Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 62, p. S60-5, 1992.

HIRSCHELMANN, R.; POCH, G.; RAFLER, I.; RICKINGER, O.; GIESSLER, J. Steroid-saving potency of nonsteroidal anti-inflammatory agents- a reevaluation with a new agent CGP28238 in rat inflammatory models. **Agents Actions Suppl.**, v. 32, p. 51-57, 1991.

HOFSTRA, C.L.; DESAI, P.J.; THURMOND, R.L.; FUNG-LEUNG, W.I. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 305, p. 1212-21, 2003.

HOGAN, S.P.; ROSENBERG, H.F.; MOQBEL, R.; PHIPPS, S.; FOSTER, P.S.; LACY, P.; KAY, A.B.; ROTHENBERG, M.E. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clin. Exp. Allergy**, v. 38, p. 709-50, 2008.

HUBER, A.R.; KUNKEL, S. L.; TOOD, R.F.; WEISS, S.J. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. **Science**, v. 254, p. 99-102, 1991.

HUSSEIN AYOUB, S.M.; KINGSTON, D.G.I. Screening of plantas used in Sudam folk medicine for anticancer activity. **Fitoterapia**, v. 2, p. 281-284, 1981.

HUSSEIN, H.T.; KAMEL, A.; ABOUT-ZEID, M.; EL-SEBAE, A.K.H.; SALEH, M. A. Uscharin, the most potent molluscicidal compound tested against land snail. **J. Chem. Ecol.**, v. 20, p.135-140, 1994.

HUTTENLOCHER, A.; SANDBORG, R.R.; HORWITZ, A. F. Adhesion in cell migration. **Curr. Opin Cell. Biol.**, v.7, p. 697-706, 1995.

HSEU, Y.C.; WU, F.Y.; WU, J.J.; CHEN, J.Y.; CHANG, W.H.; LU, F.J.; LAI, Y.C.; YANG, H.L. Anti-inflammatory potential of *Antrodia Camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF-kappaB pathway. **Int. Immunopharmacol.**, v. 5, p. 1914-1925, 2005.

IQBAL, Z.; LATEEF, M.; JABBAR, A.; MUHAMMAD, G.; KHAN, M.N. Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. flowers in sheep. **J. Ethnopharmacol.**, v.102, p.256-261, 2005.

JANEWAY, C.A.; MEDZHITOV, R. Innate immunity recognition. **Annu Rev Immunol.**, v. 20, p. 197-216, 2002.

- JEKEL, P. A.; HARTMANN, B. H.; BEINTEMA, J. J. The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. **European J Biochem**, v. 200, p. 123-130, 1991.
- JI, Q.; ZHANG, L.; JIA, H.; XU, J. Pentoxifylline inhibits endotoxin-induced NF-kappa B activation and associated production of proinflammatory cytokines. **Ann. Clin. Lab.Sd.**, v. 34, n. 4, p. 427-436, 2004.
- JORENS, P.G.; MATTHYS, K.E.; BULT, H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. **Mediators Inflamm.**, v. 4, p. 75-89, 1995.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, C. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 223-37.
- KARTORI, M.; ODA, T.; NAGAI, K. A site of action for dexamethasone on leukocyte extravasation in microcirculation. **Agents Actions**, v. 290, p. 24-26, 1990.
- KEKWICK, R. G. O. Latex and Laticifers. In: **ENCYCLOPEDIA of Life Sciences**, p.1-6, 2001.
- KITAMURA, Y.; KANAKURA, Y.; FUJITA, J.; NAKANO, T. Differentiation and transdifferentiation of mast cells: a unique member of the hemopoietic cell family. **Int J Cell Cloning**, v. 3, p. 108-21, 1987.
- KLEINERT, H.; SCHWARZ, P.M.; FORSTERMANN, U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Biol Chem.**, v. 384, p. 1343-1364, 2003.
- 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, p. 370-378, 2004.
- KUMAR, V.L.; CHAUDHARY, P.; OLIVEIRA, R.M.; RAMOS, M.V. *Calotropis procera* latex proteins ameliorate functional limitations associated with adjuvant induced inflammation in rat. **Musculoskelet Biol.**, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7243/2054-720X-1-1>>. Acesso em: 2 maio, 2014.
- KUMAR, V. L.; SHARMA, A. Innate immunity in sepsis pathogenesis and its modulation: new immunomodulatory targets revealed. **Journal of Chemotherapy**, v. 20, n. 6, p. 672-83, 2008.
- KUMAR, V. L.; ROY, S. *Calotropis procera* latex extract affords protection against inflammation and oxidative stress in Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis in rats. **Mediators Inflamm.**, v. 1, p. 47523, 2007.
- KUMAR, V. L.; SHIVKAR, Y. M. Involvement of prostaglandins in inflammation induced by latex of *Calotropis procera*. **Mediators of Inflamm.**, v. 13, p. 151-155, 2004.
- KUMAR, H. S.; BASU, N. Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 44, n. 2, p. 123-125, 1994.

- KUMAR, V.L.; CHAUDHARY, P.; RAMOS, M.V.; MOHAN, M.; MATOS, M.P. Protective Effect of proteins derived from the latex *Calotropis procera* against inflammatory hyperalgesia in monoarthritic rats. **Phytother. Res.**, v. 25, p.1336-1341, 2011.
- KUMAR, S.; DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V.L. Anti-diarrheal activity of the latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p.115-118, 2001.
- KUNKEL, E.J.; BUTCHER, E.C. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. **Immunity**, v. 16, p. 1-4, 2002.
- LARHSINI, M.; BOUSAID, M.; LAZREK, H.B.; JANA, M.; AMAROUCH, H. Evaluation of antifungal and molluscicidal properties of extracts of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, v. 4, p.371-373, 1997.
- LARRICK, J.W.; KUNKEL, S.L The role of tumor necrosis factor and interleukin-1 in the immunoinflammatory response. **Pharmacol. Res.**, v. 5, n.3, p.129-139, 1988.
- LASKIN, D.L.; PENDINO, K. J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Ann. Rev. pharmacol. Toxicol.**, v. 35, p. 655-677, 1995.
- LEE, K.Y.; ICON, Y.I. Polysaccharide isolated from *Poria cocos sclerotium* induces NF-kappaB/Rel activation and iNOS expression in murine macrophages. **Int Immunopharmacol.**, v. 3, p. 1353-1362, 2003.
- LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 9, p. 678-689, 2007.
- LIMA, H. C. Fatos e mitos sobre imunomoduladores. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 3, 2007.
- LIMA-FILHO, J.V.M.; PATRIOTA, J.M.; SILVA, A.F.; FILHO, N.T.; OLIVEIRA, R.S.B.; ALENCAR, N.M.N.; RAMOS, M.V. Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enteric serovar Typhimurium*. **J. Ethnopharmacol.**, v.129, p.327-334, 2010.
- LIN, E.; CALVANO, S.E.; LOWRY, S.F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, p. 117-126, 2000.
- LORD, C.J.M.; LAMB, I.R. TH2 cells in allergic inflammation a target of immunotherapy **Clin. Exp. Allergy.**, v. 26, p. 756-765, 1996.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 315 p.

- LUSTER, A.D.; ALON, R.; VON ADRIAN, U.H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1190-1198, 2005.
- LYNN, K.R.; CLEVETTE-RADFORD, N.A. Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae. **Phytochemistry**, v. 26, p.939-944, 1987.
- MACMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol.**, v. 15, p. 323-350, 1997.
- MAGALHÃES, H.F.; FERREIRA, P.M.; MOURA, E.S.; TORRES, M.R.; ALVES, A.P.; PESSOA, O.D.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; PESSOA, C. Vitro and in vivo antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 82, p. 407-416, 2010.
- MAGRONE, T.; JIRILLO, E. Mechanisms of neutrophil-mediated disease: innovative therapeutic interventions. **Curr. Pharm. Des.**, v. 18, n. 12, p. 1609-1619, 2012.
- MALECH, H. L.; GALLIN, J. I. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. **N. Engl. J Med.**, v. 317, n. 11, p. 687-694, 1987.
- MALLE, E. *et al.* Myeloperoxidase: a target for new drug development? **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p. 838-854, 2007.
- MASCOLO, N.; SHARMA, R.; JAIN, S.C.; CAPASSO, F. Ethnopharmacology of *Calotropis procera* flowers. **J. Ethnopharmacol.**, v. 22, p. 211-221, 1988.
- MATHUR, R.; GUPTA, S.K.; MATHUR, S.R.; VELPADIAN, T. Anti-tumor studies with extracts of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. root employing Hep2 cells and their possible mechanism of action. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 47, p.343-348, 2009.
- MCEVER, R.P. Leukocyte interactions mediated by selectins. **Thromb. Haemost.**, v. 66, p. 80-87, 1991.
- \_\_\_\_\_. Leukocyte endothelial cell interactions. **Curr. Biology**, v. 4, p. 8840-849, 1992.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.Jr. Innate immunity. **N Engl J Med.**, v. 343, p. 338-44, 2000.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, p. 394-7, 1997.
- METCALFE, D. D. Mast cells and mastocytosis. **Blood**, v. 112, p. 946-56, 2008.
- MONTIL, R.; CONTIERO, J.; GOULART, A. J. Isolation of natural inhibitors of papain obtained from *Carica papaya* Latex. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 47, p. 747-754, 2004.

MOON, V.H.; TERSHAKOVIC, G.A. Influence of cortisone upon acute inflammation. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, USA, v.79, p. 63-69, 1953.

MORALE, A.; CONIGLIO, L.; ANGELINE, C.; CIMOLI, G.; BOLLA, A.; ALLETEIO, D.; RUSSO, P.; FALLUGI, C. Biological effects of a neurotoxic pesticide at low concentrations on sea urchin early development. Aterathogenic assay. **Chemosphere**, v. 37, p. 3001, 1998.

MORCELLE, S.R.; CAFFINI, N.O.; PRIOLO, N. Isolation of natural inhibitors of papain obtained from *Carica papaya* Latex. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 47, p. 747-754, 2004.

MOREIRA, A.C.J. **O envolvimento do óxido nítrico na hipertensão portal: ação da quercetina.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

MOREIRA, A.L.; SAMPAIO, E.P.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P.; KENDALL, A.; KARPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor  $\alpha$  enhancing mRNA degradation. **Journal Experimental Medicine**, v.177, p.1675-1680, 1993.

MOREIRA, L.; CARVALHO, E. C. Q.; CALDAS-BUSSIÈRE, M. C. Concentração de nitrito endometrial e a ocorrência de patologias uterinas em vacas. **Bras. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 45, n. 3, p. 206-210, 2008.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 958-69, 2008.

MOTA, M.R.L.; CRIDDLE, D.N.; ALENCAR, N.M.N.; GOMES, R.C.; MEIRELES, A.V.P.; GADELHA, T.S.; GADELHA, C.A.; OLIVEIRA, C.C.; BEN EVIDES, R.G.; CAVADA, B.S.; ASSREUY, A.M.S. Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 374, p. 1-10, 2006.

MOURA, H.V.; POMERANTZEFF, P.M.A.; GOMES, W.J. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v. 16, n. 4, p. 376-87, 2001.

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, p. 556-570, 2001.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Neutrophil-Dependent Oxidative Stress in Inflammatory Gastrointestinal Diseases. *Frontiers of Gastrointestinal Research*. In: NAITO, Y.; SUEMATSU, M.; YOSHIKAWA, T. (Edts.). **Free Radical Biology in Digestive Diseases**, v. 29, p. 35-54, 2011.

NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated review. **ImmunoL Rev.**, v. 219, p. 88-102, 2007.

NEUNER, P. *et al.* Pentoxifylline in vivo down regulates the release of IL1, IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$  by human peripheral blood mononuclear cells. **Immunol.**, v. 83, p. 262, 1994.

NOLI, C.; MIOLO, A. The mast cell in wound healing. **Vet. Dermatol.**, v.12, p. 303 - 313, 2001.

ODA, T.; KARTORI, M. Inhibition site of dexamethasone on extravasation of polymorphonuclear leukocytes in the hamster cheek pouch microcirculation. **Journal Leukocyte Biology**, v.52, p.1337-1342, 1992.

OGLE, C.K.; WU, J.Z.; MAO, X.; SZCZUR, K.; ALEXANDER, J.W.; OGLE, J.W. Heterogeneity of kupffer cells and splenic, alveolar, and peritoneal macrophages for the production of TNF, IL-1, and IL-6. **Inflammation**, v. 18, p. 511-523, 1994.

OLD, L.J. Tumor necrosis factor (TNF). **Science**, v. 30, p. 630, 1985.

OLIVEIRA, R.S.B.; FIGUEIREDO, I.S.T.; FREITAS, L.B.N.; PINHEIRO, R.S.P.; BRITO, G.A.C.; ALENCAR, N.M.N.; RAMOS, M.V.; RALPH, M.T.; LIMA-FILHO, J.V. Inflammation induced by phytochemical proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against Salmonella infection in a murine model of typhoid fever. **Intflamm. Res.**, v. 61, p.689-698, 2012.

OLIVEIRA, J.S.; BEZERRA, D.P.; FREITAS, T.C.D.; MARINHO-FILHO, J.D.; 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. **Toxicol. In Vitro**, v. 21, p.1563-1573, 2007.

OLIVEIRA, J.S.; COSTA-LOTUFO, L.V.; BEZERRA, D.P.; ALENCAR, N.M.; MARINHO-FILHO, J.D.; FIGUEIREDO, I.S.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; ALVES, A.P.; RAMOS, M.V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 382, p.139-149, 2010.

O'SHEA, J.J.; MA, A.; LIPSKY, P. Cytokines and autoimmunity. **Nature Rev. Immunology**, v. 2, p.37-45, 2002.

OSWALD, W.; GUIMARAES, S. **Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas**. 4. ed. Porto: Porto Editora, 2001. p. 716-718.

PADHY, M.; KUMAR, V. L. Inhibition of *Calotropis procera* latex-induced inflammatory hyperalgesia by oxytocin and melatonin. **Mediators Inflamm.**, v. 6, p. 360-65, 2005.

PALMER, R. M.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 16, p. 664-666, 1988.

PANÉS, J.; PERRY, M.; GRANGER, N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **Br. Journal Pharmacology**, v.126, p.537-550, 1999.

PARIHAR, G.; SHARMA, A.; GHULE, S.; SHARMA, P.; DESHMUKH, P.; SRIVASTAVA, D.N. Anti inflammatory effect of *Calotropis procera* root bark extract. Asian Journal of Pharmacy. **Life Sci.**, v.1, p. 29-44, 2011.

PARKIN, I.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**, v. 357, p. 1777-89, 2001.

PEREIRA, L.S.; GOMES, M.V.; FERNANDES, K.V.S.; SALES, M.P.; XAVIER FILHO, J. Insecticidal and antifungal proteins of the latex from *Manihot glaziovii* Muell. **Arg. Rev. Bras. Bot.**, v. 22, p.1-8, 1999.

PEREIRA, M.C.M.; PINHO, C.B.; MEDRADO, A.R.P.; ANDRADE, Z.A.; REIS, S.R.A. Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology.**, v. 98, p.188-192, 2010.

PEREIRA-DA-SILVA, G.; CARVALHO, F.C.; ROQUE-BARREIRA, C. Neutrophil Activation Induced by Plant lectins: Modulation of Inflammatory Processes. **Inflammation&Allergy – Drug targets**, v. 11, p. 433-441, 2012.

PETRI, B.; BIXEL, M.G. Molecular events during leukocyte diapedesis. **FEBS J.** v. 273, p. 4399-07, 2006.

PHILLIP, R.; EPSTEIN, L.B. Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin 1. **Nature**, v. 323, p. 86, 1986.

PICKARD, W. F. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. **New Phytol.**, v. 177, p.877-888, 2008.

PLIYEV, B. K. Chemotactically active proteins of neutrophils. **Biochemistry**, v. 73, p. 970- 984, 2008.

RAEBURN, C.D. *et al.* Cytokines for surgeons. **Am. J. Surg.**, v. 183, p. 268-273, 2002.

RAMACHANDRA, S.S.; AHMED, A.Q.; VISWANATH, A.H.M.S.; PATIL, T.; PRAKASH, T.; PRABHU, K.; VEERAN, A.G. Hepatoprotective activity of *Calotropis procera* flowers against paracetamol-induced hepatic injury in rats. **Fitoterapia**, v. 78, p. 451-454, 2007.

RAMOS, M. V.; AGUIAR, V. C.; SILVA-XAVIER, A. A.; LIMA, M. W.; BANDEIRA, G.P.; TCHELLS, J. P.; NOGUEIRA, N. A. P.; 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, n. 4, p. 251-256, 2006.

- RAMOS, M. V.; AGUIAR, V. C.; MELO, V. M. M.; MESQUITA, R. O.; SILVESTRE, P.P.; OLIVEIRA, J. S.; OLIVEIRA, R. S. B.; MACEDO, N. M. R.; ALENCAR, N. M. N. Immunological and allergenic responses induced by latex fractions of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. **Plant Sci.**, v. 173, n. 3, p. 349-357, 2007a.
- RAMOS, M. V.; FREITAS, C. D. T., STANISÇUASKI, F.; FIACEDO, L. L. P.; SALES, M. P.; SOUZA, 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 Sci.**, Limerick, v. 173, p. 349-357, 2007b.
- RAMOS, M. V.; OLIVEIRA, J. S.; FIGUEIREDO, J. G.; FIGUEIREDO, I. S. T.; KUMAR, V. L.; BITENCURT, F. S.; CUNHA, F. Q.; OLIVEIRA, R. S. B.; BOMFIM, L. R.; LIMA-FILHO, J. V.; ALENCAR, N. M. Involvement of NO in the inhibitory effect of *Calotropis procera* latex protein fractions on leukocyte rolling, adhesion and infiltration in rat peritonitis model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 1-10, 2009a.
- RAMOS, M.V.; VIANA, C.A.; SILVA, A.F.; FREITAS, C.D.; FIGUEIREDO, I.S.; OLIVEIRA, R.S.; ALENCAR, N.M.; LIMA-FILHO, J.V.; KUMAR, V.L. Proteins derived from latex of *Calotropis procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin-and plasmin-like activities. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 385, p.455-463, 2012.
- RAMOS, M.V.; GRANGEIRO, T.B.; FREIRE, E.A.; SALES, M.P.; SOUZA, D.P.; ARAÚJO, E.S.; FREITAS, C.D.T. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. **Arthropod Plant Interact.**, v. 4, p. 57-67, 2010.
- RAMOS, M. V.; PEREIRA, D. A.; SOUZA, D. P.; ARAUJO, E. S.; FREITAS, C. D. T.; CAVALHEIRO, M. G.; MATOS, M. P. V.; CARVALHO, A. F. F. U. Potential of laticifer fluids for inhibiting larvae development of *Stegomyia (Aedes) aegypti*: Evidences for the involvement of proteolytic activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 6, p. 805-812, 2009b.
- RANKIN, J.A. Biological mediators of acute inflammation. **AACN clin. issues.**, v. 15, p. 3-17, 2004.
- RASIK, A. M.; RAGHUBIR, R.; GUPTA, A.; SHUKLA, A.; DUBEY, MP.; SRIVASTAVA, S.; JAIN, H.K.; KULSHRESTHA, D.K. Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. **Journal of Ethnopharmacol.**, v. 68, p. 261-266, 1999.
- REBAR, A.H.; MACWILLIAMS, P.S.; FELDMAN, B.F.; METZGER, F.L.; POLLOCK, R.V.H.; ROCHE, J. Neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos. In: \_\_\_\_\_. Guia de Hematologia para cães e gatos. São Paulo: Roca, 2003. p. 37-115.
- RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology**, v. 73, p. 472-477, 1991.
- RIBEIRO, R.A.; SOUZA-FILHO, M.V.P.; SOUZA, M.H.L.P.; OLIVEIRA, S.H.P.; COSTA, C.H.S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.P. Role of resident mast cells and

macrophages in the neutrophil migration induced by LTB<sub>4</sub>, fMLP and C5a des arg. **Inst. Arch. Allergy. Immunol.**, v.112, p. 27-35, 1997.

RIENECK, K.; DIAMANT, M.; HAAHR, P.M.; SCHONHARTING, M.; BENDTZEN, K. In vivo immunomodulatory effects of pentoxifylline. **Immunol. Lett.**, v. 37, p. 131,1993.

RODGERS, K.; XIONG, S. Contribution of mast cell mediators to alterations macrophage function after malathion administration. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 33, 100-108, 1996.

ROBBINS, S. *et al.* **Patologia Estrutural e Funcional**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 44-77.

ROCHA, M.F.G.; MAIA, M.E.T.; BEZERRA, R.P.S.; LYERLY, D.M.; GUERRANT, R.L.; RIBEIRO, R.A.; LIMA, A. A. M. *Clostridium difficile* toxin A induces the release of neutrophil chemotactic factors from rat peritoneal macrophages: role of interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor alpha, and leukotrienes. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 7, p. 2740-2746, 1997.

RUDDLE, N.H. Tumor necrosis factor Beta/lymphotoxin-Alpha. In: THOMPSON, A.W. **The cytokine handbook**. 2. ed. San Diego: Academic press, 1994. p. 303-318.

SANGRAULA, H.; DEWANS, S.; KUMAR, V. L. Evaluation of Antiinflammatory activity of the latex of *Calotropis procera* in different models of inflammation. **Inflammopharmacol.**, v. 9, p. 257-264, 2002.

SAVILL, J. Apoptosis in resolution of inflammation. **Journal leukocytes Biology**, v. 61, p. 375-380, 1997.

SCAPINI, P.; LAPINET-VERA, J.A.; GASPERINI, S.; CALZETTI, F.; BAZZONI, F.; CASSATELLA, M. A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunol. Rev.**, v. 177, p.195-203, 2000.

SCHENKEL, P. C. **Influência do óxido nítrico na resposta à isquemia-reperfusão em ratos sob distintas concentrações estrogênicas**. 2006. Tese (Doutorado em bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SCHMIDT, H.R.; WALTER, U. NO at work. **Cell.**, v. 78, p. 919-925, 1994.

SEHGAL, R.; ARYA, S.; KUMAR, V.L. Inhibitory effect of extracts of latex of *Calotropis procera* against *Candida albicans*: A preliminary study. **Indian J.Pharmacol.**, v. 37, p. 334-335, 2005.

SEIBER, J.N.; NELSON, C.J.; MARK LEE, S. Cardenolides in the latex leaves of seven *Asclepias* species and *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2343-2348, 1982.

SEITZ, M.; LOETSCHER, P.; DEWALD, B.; TOWBIN, H.; CESKA, M.; BAGGIOLINI, M. Production of interleukin-1 receptor antagonist, inflammatory chemotactic

proteins, and prostaglandin E by rheumatoid and osteoarthritic synoviocytes-regulation by IFN- $\gamma$  and IL-4. **J. Immunol.**, v. 152, p. 2060-2065, 1994.

SEN, T.; BASU, A.; CHAUDURI, A.K. Studies on the possible mechanism of the gastric mucosal protection by *Calotropis procera* involvement of 5-lipoxygenase pathway. **Fundam. Clin. Pharm.**, v.12, p.82-87, 1998.

SERHAN, C.N. *et al.* Novel functional sets of lipid-derived mediators with anti-inflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal anti-inflammatory drugs and transcellular processing. **Journal Experimental Medicine**, v.192, p.1197-1204, 2000.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1199-1205, 2005.

SHARMA, P.; SHARMA, J.D. In-vitro schizonticidal screening of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, v. 71, p.77-79, 2000.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Articles**, v.13, p. 272-233, 1989.

SHIVKAR, Y. M.; KUMAR, V. L. Histamine mediates the pro-inflammatory effect of latex of *Calotropis procera* in rats. **Mediators Inflamm.**, v. 12, p.299-302, 2003.

SHUKLA, O.P.; MURTI, C.R.K. Properties & partial purification of a bacteriolytic enzyme from the latex of *Calotropis procera* (Madar). **J. Sci. Ind. Res.**, v. 20, p.109-112, 1961.

SILVA, J.C.R.; ROCHA, M.F.G.; LIMA, A.A.M.; BRITO, G.A.C.; MENEZES, D.B.; RAO, V.S.N. Effects of pentoxifylline and nabumetone on the serum levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in rats with adjuvant arthritis. **Inflamm. Res.**, v.49, p. 14-9, 2000.

SINGH, A.N.; SHUKLA, A.K.; JAGANNADHAMB, M.V.; DUBEY, V.K. Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to procerain. **Process Biochem.**, v.45, p.399-406, 2010.

SMIT, H.F.; WOERDENBAG, H.J.; SINGH, R.H.; MEULENBELD, G.L.; LABADIE, R.P.; ZWAVING, J.H. Ayurvedic herbal drugs with possible cytoatatic activity. **J. Ethnopharmacol.**, v.47, p.75-84, 1995.

SMITH, C.W. Adhesion molecules and receptors. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 121, p. 375-9, 2008.

SOARES, P. M.; LIMA S. R.; MATOS, S. G.; ANDRADE, M. M.; PATROCÍNIO, M. C. A.; FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V.; CRIDDLE, D. N.; CARDI B. A.; CARVALHO, K. M.; ASSREUY, A. M. S.; VASCONCELOS S. M. M. Anti-nociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 99, p.125-129, 2005.

SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, Chemokines, and Pain. In: BEAULIEU, P. *et al.* **Pharmacology of Pain**. Seattle: IASP Press, 2010. p. 279-302.

SON, C.G.; SHIN, J.W.; CHO, J.H.; CHO, C.K.; YUN, C.H.; CHUNG, W.; HAN, S.H. Macrophage activation and nitric oxide production by water soluble components of *Hericium erinaceum*. **Int Immunopharmacol.**, v. 6, p. 1363-1369, 2006.

SOUZA, G.E.P.; CUNHA, F.Q.; MELLO, R.; FERREIRA, S.H. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions**, v.24, n. 3-4, p.377-380, 1988.

SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, v. 17, n. 1, p. 97-103, 1985.

SOUZA, M.H.L.P.; MELO-FILHO, A.A.; ROCHA, M.F.G.; LYERLY, D.M.; CUNHA, F.Q.; LIMA, A.A.M.; RIBEIRO, R.A. The involvement of macrophage-derived tumor necrosis factor and lipoxygenase products on the neutrophil recruitment induced by *Clostridium difficile* toxin B. **Immunology**, v. 91, p.281-288, 1997.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v.76, p.301-314, 1994.

SRITANYARAT, W.; PEARCE G.; SIEMS, W. F.; RYAN, C. A.; WITITSLJWANNAKUL, 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, p.1644-1650, 2006.

STEWART, R.; BILL, R.; ULLAH, R.; MC CONAGHY, P.; HALL, S. J. Dexamethasone reduces pain after tonsillectomy in adults. **Clin. Otolaryngol. Allied Sci.**, v. 27, n. 5, p. 321-326, 2002.

STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARLOW, T.G. **Medical Immunology**. 9. ed. Stamford: Appleton & Lange, 1997. p. 900.

STOOLMAN, L.M.; ROSEN, S.D. A possible role for a cell surface carbohydrate binding molecule in lymphocyte recirculation. **J. Cell Biol.**, v. 96, p. 722, 1983.

SULLIVAN, G. W.; CARPER, H. T.; NOVICK, W. J. JR.; MANDELL, G. L. Inhibition of the inflammatory action of interleukin-1 and tumor necrosis factor (alpha) on neutrophil function by pentoxifylline. **Infect. Immun.**, v. 56, n. 7, p. 1722-1729, 1988.

SUSSMAN, G. L.; BEEZHOLDB, D. H.; LISSC, G. Latex allergy: historical perspective. **Methods**, v.27, p.3-9, 2002.

SZTRYMF, B.; RABILLER, A.; NUNES, H.; SAVALE, L.; LEBREC, D.; LEPAPE, A.; DE MONTPREVILLE, V.; MAZMANIAN, M.; HUMBERT, M.; HERVE, P. Prevention of hepatopulmonary syndrome by pentoxifylline in cirrhotic rats. **Eur Respir J.**, v. 23, p. 752-758, 2004.

TAGER, A.M.; LUSTER, A.D. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 69, n. 2-3, p. 123-134, 2003.

TANG, L.; JENNINGS, T.A.; EATON, J.W. Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p.8841-8846, 1998.

TAKTAK, Y.S.; SELKIRK, S.; BRISTOW, A.F.; CARPENTER, A.; BALL, C.; RAFFERTY, B.; POOLE, S. Assay of pyrogens by interleukin-6 release from monocytic cell lines. **J. Pharmacol.**, v.43, p. 578-582, 1991.

TASAKA, A.C. Antiinflamatórios não-esteroidais. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006. p.256-285.

TATAKIS, L.M. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. **J. periodontol.**, v.64, n.5, p.416-431, 1993.

TE VELDE, A. A. *et al.* Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1b, tumor necrosis factor a, and human IL-6 by human monocytes. **Blood**, v. 76, p. 1392-1397, 1990.

TEDGUI, M.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circul. Res.**, v.88, p. 877-887, 2001.

TOI, M.; HARRIS, A.L.; BICKNELL, R. Interleukin-4 is a potent mitogen for capillary endothelium. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 174, p. 1287-1293, 1991.

TOI, M.; BICKNELL, R.; HARRIS, A.L. Inhibition of colon and breast carcinoma cell growth by interleukin-4. **Cancer Res.**, v. 52, p. 275-279, 1992.

TOUR, N.; TALELE, G. Anti-inflammatory and gastromucosal protective effects of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) stem bark. **J. Nat. Med.**, v.65, p.598-605, 2011.

TUNON DE LARA, J.M., OKAYAMA, Y., MCEUEN, A.R., HEUSSER, C.H.; CHURCH, M.K.; WALLS, A.F. Release and inactivation of interleukin-4 by mast cells. In: CHIGNARD, M.; PRETOLANI, M.; RENESTO, P.; VARGAFTIG, B.B. (eds.) Cells and cytokines in lung intimation. **Ann. N. Y. Acad Sci.**, v. 25, p. 50-58, 1994.

TSELEPIS, A.D.; CHAPMAN, M.J. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. **Atheroscler Suppl.**, v. 3, p. 57-68, 2002.

VADIEI, K.; TUCKER, S.D.; LOPEZBERESTEIN, G.; WASAN, K.M. Nephroprotective mechanism(s) of pentoxifylline-reduction of erythrocyte-mediated vascular congestion and inhibition of nitric oxide release. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 78, p. 174,1996.

VASQUES, M.A.A. **Óxido nítrico e isquemia cerebral, estudo experimental em roedores**. 2002. 94 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

VERRI, W.A.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.; Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology Therapeutics**, v.112, p.116-138, 2006.

VINCENT, J.L.; SAKR, Y.; SPRUNG, C.L.; RANIERI, V.M.; REINHART, K.; GERLACH, H.; MORENO, R.; CARLET, J.; LE GALL, J.R.; PAYEN, D. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. **CRIT Care Med.**, v. 34, n. 2, p. 344-353, 2006.

VICELK, J.; LEE, J. Immunology of cytokines: an introduction. In: THOMPSON, A. (Ed). **The cytokine handbook**. San Diego: Academic Press, 1994. p.1-9.

VILCEK, J. The cytokines: an overview. In: THOMPSON, A. W.; LOTZE, M. T. (Ed.). **The cytokines handbook**. 4. ed. London: Academic Press, 2003. v.1, p.3-18.

WAGNER, J.G.; ROTH, R.A.; Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol. Rev.** v. 52, p. 349-374, 2000.

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, p. 85-97, 1999.

VAN QUAQUEBEKE, E.; SIMON, G.; DEWELLE, A.J.; YAZIDI, M.E.; BRUYNAEEL, F.; TUTI, J.; NACOULMA, O.; GUISSOU, P.; DECAESTECKER, B.J.C.; KISS, R.F. Identification of a novel cardenolide (200 -Oxovoroscharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent in vitro antitumor activities and high in vivo tolerance: structure-activity relationship analyses. **J. Med. Chem.**, v.48, p.849-856, 2005.

WARRIER, P. K.; NAMBIAR, V. P. K.; RAMANHUTTY, C. *Calotropis gigantea*. **Indian Medicinal Plants**, v.1, p. 341-345, 1994.

WEBER, C.; FRAEMOHS, L.; DEJANA, E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 467-77, 2007.

WILCKENES, T.; RIJK, R. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. **Immunology Today**, v. 18, p.418-423, 1997.

WOODFIN, A.; VOISIN, M.B.; IMHOF, B. A.; DEJANA, E.; ENGELHARDT, B.; NOURSHARGH, S. Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. **Blood**, v. 113, n. 24, p. 6246-6257, 2009.

XING, Z.; GAULDIE, J.; COX, G. BAUMANN, H.; JORDANA, M.; LEI, X. F.; ACHONG, M. K. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 311-320, 1998.

YAMASHIRO, S.; KAMOHARA, H.; WANG, J. M.; YANG, D.; GONG, W. H., YOSHIMURA, T. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils:

Inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. **J. Leukoc Biol.**, v. 69, p. 698-704, 2001.

YAN, S. R.; JOSEPH, R. R.; WANG, J.; STADNYK, A. W. Differential Pattern of Inflammatory Molecule Regulation in Intestinal Epithelial Cells Stimulated with IL-1. **J. Immunol.**, v. 177, p. 5604—5611, 2006.

YEANG, H. Y.; ARIF, S. A. M.; YUSOF, F.; SUNDERASAN, E. Allergenic proteins of natural rubber latex. **Methods**, v.27, p. 32-45, 2002.

YOUNGMAN, K. R.; SIMON, P. L.; WEST, G. A.; COMINELLI, F.; RACHMILEWITZ, D. J.; LEIN, S.; FIOCCHI, C. Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. **Gastroenterology**, v. 104, p. 749-758, 1993.

YOKOYAMA, C.; TANABE, T. Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxidase synthase and primary structure of enzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 1665, p. 3746-3752, 1989.

ZHANG, J.M.; AN J — Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin.**, v. 45, p. 27-37, 2007.

ZHANG, W.X.; LIU, Q.; WANG, Y.; THORLACIUS, H. CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration in vivo. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, p. 413 – 421, 2001.

ZIGMOND, S.H.; HIRSCH, J.G. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemiotactic factor. **J. Exp. Med.**, v. 137, p. 387-410, 1973.