

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E
FARMACOLOGIA

CID FREITAS CAVALCANTE

ESTUDO DO EFEITO DA FRAÇÃO NÃO
DIALISÁVEL DO LÁTEX DE *Calotropis procera* (Ait) R. Br
EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO, COM
ÊNFASE EM ARTRITE

FORTALEZA
2007

CID FREITAS CAVALCANTE

ESTUDO DO EFEITO DA FRAÇÃO NÃO
DIALISÁVEL DO LÁTEX DE *Calotropis procera* (Ait) R. Br
EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO, COM
ÊNFASE EM ARTRITE

Dissertação submetida à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia, da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Raimundo Vale

FORTALEZA
2007

C364e

Cavalcante, Cid Freitas

Estudo do efeito da fração não dialisável do látex de *Calotropis procera* (Ait) R. Br. em modelos experimentais de inflamação / Cid Freitas Cavalcante; orientador: Marcus Raimundo Vale . – Fortaleza, 2007.

89f. il.

Dissertação – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, 2007.

1. Artrite 2. Látex 3. *Calotropis* 4. Zimosan 5. Peritonite I. Vale, Marcus Raimundo (Orient.) II. Título

CDD: 616.722

CID FREITAS CAVALCANTE

ESTUDO DO EFEITO DA FRAÇÃO NÃO
DIALISÁVEL DO LÁTEX DE *Calotropis procera* (Ait) R. Br
EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO, COM
ÊNFASE EM ARTRITE

Dissertação submetida à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia, da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em 23/07/07

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcus Raimundo Vale (orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Marcio Viana Ramos
Universidade Federal do Ceará - UFC

A Deus, minha família,
amigos e todos aqueles
que acreditaram.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e meus irmãos, por tudo o que representam na minha vida e pelo apoio incondicional.

Ao meu orientador, Prof. Marcus Vale, por ter me iniciado na pesquisa científica e me acompanhado com toda a paciência ao longo desses anos.

À Profa. Nylane Nunes Alencar, exemplo de dedicação à pesquisa e aos seus estudantes.

À Priscila, pela ajuda incomensurável no sentido de tornar este trabalho realidade.

À Carla, Cibele, Mirela, Cíntia, Márcia, Elmadan, Ítalo e a todos que ajudaram a tocar este projeto pra frente.

Aos Colegas de pós, Flávio, Jozy, Ingrid, Carol, Michael e Mário por compartilharem os momentos difíceis dessa caminhada.

À Patrícia, pela amizade e conselhos valiosos.

Aos professores da pós-graduação, pelos conhecimentos transmitidos.

À Profa. Mariana Vale, pela grande colaboração e dedicação nos experimentos e conhecimentos repassados.

Ao Prof. Ronaldo Ribeiro e o LAFICA, que gentilmente cederam a estrutura física e boa parte dos equipamentos necessários aos experimentos.

Ao Prof. Márcio Viana e seus colaboradores pelo fornecimento do látex e pela ajuda científica.

À Profa. Gerly Anne, pela cordial cooperação em parte importante do trabalho.

Ao Ivan do Departamento de Morfologia pelos cortes histológicos.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia que direta ou indiretamente participaram dessa jornada.

RESUMO

Estudo do efeito da fração não dialisável do látex de *Calotropis procera* (Ait) R. Br em modelos experimentais de inflamação, com ênfase em artrite. CID FREITAS CAVALCANTE. Orientador: Marcus Raimundo Vale. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2007.

Tendo em vista a prevalência de doenças inflamatórias reumáticas tais como a artrite reumatóide em nosso meio e a necessidade constante de novas terapias alternativas às drogas esteróides e não esteroidais, que apresentam tantos efeitos nocivos em uso prolongado, decidimos investigar a ação do látex de *Calotropis procera* em modelos experimentais de inflamação, com foco na artrite. O látex dessa planta da família Asclepiadaceae, vastamente encontrada no Nordeste brasileiro, tem efeitos sabidamente antiinflamatórios em algumas situações, notadamente a sua fração protéica majoritária, não dialisável (FNDL), menos tóxica e desprovida de borracha. A fração foi obtida a partir de um protocolo estabelecido por nossos colaboradores, que, em suma envolve várias etapas de centrifugação e diálise até o produto final liofilizado. Utilizamos ratos Wistar machos com peso entre 230 e 280g e camundongos, Balb/c e Swiss, pesando entre 18 e 35g, em grupos de seis indivíduos nos quais um controle, outro *sham* em que foi induzido o evento inflamatório (artrite por Zy - AZy, artrite induzida por antígeno - AIA ou peritonite infecciosa - PI) e o experimental no qual foi tratado com FNDL. O grupo AZy foi submetido a teste de incapacitação articular pelo modelo de tempo de suspensão da pata (TSP) e, após sacrifício, à contagem de células total e diferencial no lavado articular, estudo histopatológico da articulação, avaliação de permeabilidade vascular, dosagem de ADA e TNF- α . Os resultados foram expressos em média \pm e.p.m. e comparados em testes estatísticos ANOVA/Bonferroni, admitindo-se $P < 0.05$ para significância. A FNDL inibiu o TSP na AZy com efeito máximo na dose de 3mg/kg no $t = 4$ h. Houve também redução significativa da permeabilidade vascular, nos níveis séricos de TNF- α e de ADA, e melhora no quadro histopatológico. Também reduziu o influxo celular sinovial na AZy e AIA, sobretudo de neutrófilos. Na PI, inibiu a migração celular e os níveis de ADA. Dessa forma, os resultados confirmaram o efeito antiinflamatório da FNDL nestes modelos de artrite e peritonite e sugeriram um possível mecanismo de ação relacionado a um aumento da adenosina, por conta da redução dos níveis de ADA, ou por inibição do TNF- α . Por fim procedemos a avaliação da toxicidade da droga em tratamento crônico, constatando que a dose de 10mg/Kg apresenta bons efeitos farmacológicos sem alterações significativas nos parâmetros selecionados.

ABSTRACT

Study of the effect of the non-dialyzable fraction of *Calotropis procera* (Ait) R. Br latex in experimental models of inflammation, with emphasis in arthritis. CID FREITAS CAVALCANTE. Promoter: Marcus Raimundo Vale. Master of Science Dissertation. Post-Graduation in Pharmacology of Federal University of Ceará. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2007.

The objective of this dissertation was to investigate the effect of the latex from *Calotropis procera* in experimental models of inflammation, with special focus on arthritis. The plant belongs to *Asclepiadaceae* family and is largely found in Northeast of Brazil. The plant latex presents clear anti-inflammatory effects, which is kept by its non-dialyzable protein fraction (NDPF), a less toxic and rubber free fraction. NDPF was obtained according to a procedure established by our group, which, in short, involves several steps of centrifugation and dialysis. Male Wistar rats (230 – 280g) and Balb/c and Swiss male mice (18 – 35g) were organized in groups of 6 animals: a control group (no treatment), a sham group, in which only the inflammatory event was induced (arthritis by zymosan – AZy), an antigen-induced arthritis group (AIA), an infectious peritonitis group (IP) and an experimental group, treated with NDPF. The AZy group was submitted to an articular incapacitation test to measure the paw elevation time (PET, in seconds) and, after sacrifice, total and differential cell count in the intra-articular fluid, histopathological study of the articulation, vascular permeabilization, ADA and TNF- α assays. The results were expressed in means \pm S.E.M. and significative differences were accepted if $p < 0.05$ (ANOVA/Bonferroni). NDPF inhibited PET in AZy with a maximum effect in the dose of 3mg/kg, at 4h after inflammation induction. There was also a significative reduction of vascular permeability, TNF- α and ADA serum levels and an improvement of the histopathological profile. NDPF also reduced the intra-articular influx of cells in AZy and AIA, especially of neutrophils. In IP, NDPF inhibited the cellular migration and the levels of ADA. So, the results confirmed the expected anti-inflammatory effect of NDPF in arthritis and peritonitis models and suggested a possible mechanism of action involving either an increase of adenosine concentration due to the reduction of ADA levels or an inhibition of TNF- α or both events. Finally, the NDPF chronic toxicity was evaluated confirming that the dose of 10mg/Kg presents well defined pharmacological effects without significant alterations on the animal parameters. The characteristics of NDPF open an interesting possibility for alternative therapy to substitute the toxic effects of steroidal and some non-steroidal drugs, used in rheumatoid diseases, so prevalent among our population.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Aspecto da planta *Calotropis procera*.

FIGURA 2 - Fotografia do sistema utilizado para o teste de incapacitação articular em ratos – gentilmente cedido pelo LAFICA – UFC.

FIGURA 3 - Esquema da desaminação da adenosina pela ADA

FIGURA 4- Efeito do tratamento com FNDL sobre o influxo de neutrófilos à cavidade articular de ratos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy).

FIGURA 5 - Efeito do tratamento com FNDL sobre o tempo de suspensão da pata (TSP) de ratos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy).

FIGURA 6 - Curso temporal do tratamento com FNDL sobre o tempo de suspensão da pata (TSP) de ratos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy).

FIGURA 7 - Efeito do tratamento com FNDL sobre a atividade da ADA na cavidade articular de ratos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy).

FIGURA 8 - Efeito do tratamento com FNDL sobre a permeabilidade vascular em ratos submetidos à indução de artrite por zymosan (AZy).

FIGURA 9 - Efeito do tratamento com FNDL sobre os níveis de TNF - α na cavidade articular de ratos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy).

FIGURA 10 - Efeito do tratamento com FNDL sobre o quadro histopatológico da articulação de ratos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy).

FIGURA 11 - Fotografias mostrando o aspecto da microscopia óptica do tecido sinovial comparando os grupos tratados com FNDL (10 e 30mg/kg) e o grupo não tratado (zymosan) (aumento de 40X)

FIGURA 12 - Efeito do tratamento com FNDL sobre o influxo de neutrófilos à cavidade articular de camundongos submetidos à indução da artrite por antígeno (mBSA).

FIGURA 13 - Efeito do tratamento via endovenosa com FNDL sobre o influxo de neutrófilos à cavidade peritoneal de camundongos submetidos à indução de peritonite infecciosa.

FIGURA 14 - Efeito do tratamento via endovenosa com FNDL sobre a atividade da ADA na cavidade peritoneal de camundongos submetidos à indução de peritonite infecciosa.

FIGURA 15 - Efeito da aplicação via endovenosa de FNDL por sete dias sobre a função renal.

FIGURA 16 - Efeito da aplicação via endovenosa de FNDL por sete dias sobre as transaminases hepáticas.

FIGURA 17 - Efeito da aplicação via endovenosa de FNDL por sete dias sobre o leucograma.

FIGURA 18 - Efeito da aplicação via endovenosa de FNDL por sete dias sobre o peso dos órgãos.

LISTA DE ABREVIATURAS

% - por cento

< menor

A₁ – receptor de adenosina tipo A₁

A_{2A} – receptor de adenosina tipo A_{2A}

A_{2B} – receptor de adenosina tipo A_{2B}

A₃ – receptor de adenosina tipo A₃

ACF – adjuvante completo de Freund

ADA - adenosina desaminase

ADA1 – adenosina desaminase isoenzima tipo 1

ADA2 – adenosina desaminase isoenzima tipo 2

AE – Azul de Evans

AIA – Artrite induzida por antígeno

AICAR – enzima 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide

AIF – adjuvante incompleto de Freund

AMPc - Adenosina Monofosfato Cíclico

APCs – células apresentadoras de antígenos

AR - Artrite Reumatóide

AZy – Artrite induzida por zymosan

C3a – terceiro componente do sistema complemento ativado

C5a – quinto componente do sistema complemento ativado

cm – centímetro (s)

COX - ciclooxigenase

Da – Dalton (s)

DAINES – drogas antiinflamatórias não esteroidais.

DMARD – drogas anti-reumáticas modificadoras da artrite reumatóide

DTH – reação de hipersensibilidade do tipo tardia

e.v.- Via endovenosa

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

epm – erro padrão da média

FDL – Fração dialisável do látex de *Calotropis procera*
FNDL – Fração não dialisável do látex de *Calotropis procera*
g – grama
h – hora (s)
i.a. - Via Intra-articular
i.p. - Via Intraperitoneal
IA - Incapacitação Articular
IASP – International association for the study of pain
IC - Influxo Celular
IFN- γ - Interferon γ
IL– Interleucina
kDa – kilodalton (s)
kg – kilograma
l – litro (s)
LPS - Lipopolissacarídeo de bactéria
LTB₄ - Leucotrieno B₄
mBSA – albumina bovina sérica metilada
mg – miligrama (s)
MHC – complexo de histocompatibilidade maior
min – minuto (s)
ml – mililitro (s)
mm – milímetro (s)
mM - milimolar
mm² – milímetro (s) quadrado (s)
mm³ – milímetro (s) cúbico (s)
MTX – metotrexate
nm – nanômetro (s)
NO - Óxido Nítrico
°C – graus Celsius
PAF - Fator de Ativação Plaquetária
PBS – salina fosfato tamponada

pg – picograma (s)
PI – Peritonite infecciosa por ligadura e punção cecal.
PMNs - Polimorfonucleares
q.s.p. – quantidade suficiente para
RL - Fração da borracha do látex de *Calotropis procera*
rpm – rotações por minuto
s – segundo (s)
s.c.- Via subcutânea
TGF- β - Fator de Transformação de Crescimento β
Th1 – linfócitos T helper 1
TLR-4 – Toll Like Receptor tipo 4
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α
TSP – tempo de suspensão da pata
U – unidade (s)
UFC – Universidade Federal do Ceará
v/v – volume por volume
x g – quantidade de vezes a força gravitacional da Terra
Zy – Zymosan
 μ g – micrograma (s)
 μ l – microlitro (s)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Fração não dialisável do látex de <i>Calotropis procera</i> (FNDL).....	16
1.2. Inflamação.....	22
1.3. Artrite reumatóide.....	28
1.4. Adenosina e adenosina desaminase (ADA).....	30
1.5. Modelos experimentais de artrite.....	31
1.6. Peritonite infecciosa.....	34
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
2.1. Animais.....	35
2.2. Aparelhos e instrumentos laboratoriais.....	35
2.3. Soluções, drogas e reagentes.....	36
2.4. Protocolo experimental.....	38
2.4.1. Modelo de artrite induzida por zymosan (AZy).....	38
2.4.2. Modelo de artrite induzida por antígeno mBSA (AIA).....	43
2.4.3. Modelo de peritonite infecciosa (PI).....	44
2.4.4. Teste de toxicidade da FNDL.....	45
2.5. Análise estatística.....	46
3. RESULTADOS.....	47
3.1. A FNDL reduz o influxo de neutrófilos na artrite induzida por Zy em ratos.....	47
3.2. A FNDL reduz o tempo de suspensão da pata na artrite induzida por Zy em ratos.....	48
3.3. A FNDL reduz a atividade da ADA na artrite induzida por Zy em ratos.....	50
3.4. A FNDL reduz a permeabilidade vascular na artrite induzida por Zy em ratos.....	51
3.5. A FNDL reduz o nível de TNF - α na artrite induzida por Zy em ratos.....	52

3.6. A FNDL melhora os escores da avaliação histopatológica na artrite por Zy em ratos.....	53
3.7. A FNDL reduz o influxo de neutrófilos na artrite induzida por antígeno mBSA (AIA) em camundongos pré-imunizados.....	55
3.8. A FNDL inibe a migração de neutrófilos na peritonite infecciosa em camundongos.....	56
3.9. A FNDL reduz a atividade da ADA no lavado peritoneal na peritonite infecciosa em camundongos.....	57
3.10. A FNDL não apresenta parâmetros laboratoriais de toxicidade na dose de 10 mg/kg.....	58
4. DISCUSSÃO.....	61
5. CONCLUSÕES.....	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fração não dialisável do látex de *Calotropis procera* (FN DL)

Látex

Na natureza o sucesso dos vegetais deve-se em grande parte pelos inúmeros mecanismos de defesa desenvolvidos, compensando a sua imobilidade e falta de um sistema imune circulatório. Dentre essas sofisticadas e, por vezes, inusitadas estratégias de proteção destaca-se a defesa mecânica e química contra a invasão de patógenos e insetos a partir de sistemas de canais que contêm várias secreções, tal como os laticíferos, resinas e mucilagens (Farrell et al, 1991). No caso de plantas que produzem látex, este sofre um processo de agregação progressiva que lembra o processo de coagulação sanguínea, no que concerne ao aspecto físico de aprisionamento de moléculas em uma malha formada progressivamente. Este processo é comum ocorrer após a planta sofrer algum dano mecânico, o que leva a liberação do fluido laticífero, impedindo que a área injuriada seja penetrada por patógenos. O látex também tem uma ação adesiva que pode imobilizar pequenos insetos ou mesmo uma lagarta (Moursy, 1997). Entretanto, além deste efeito mecânico, a composição química do látex parece também funcionar como uma ferramenta de defesa, neste caso agindo no combate a fungos e a vírus por meio de suas substâncias constituintes (Pereira et al., 1999). A presença de proteínas relacionadas à defesa contra patógenos, como glucanases e quitinases (Van Loon & Van Sttrien, 1999), proteinases (Dubey & Jaganadham, 2002; Abraham & Joshi, 1979; Glazer & Smith, 1971; Sgarbieri et al, 1964) e inibidores de proteinases (Sritanyarat et al., 2006; Monti et al., 2004) no látex de várias espécies sugere que essa secreção poderia agir como uma defesa da planta contra o ataque de insetos e patógenos.

Látex é um termo geralmente usado para descrever um líquido com aspecto leitoso que é exudado de plantas que sofreram algum dano mecânico. Naqueles já estudados, em geral, são compostos de um soro, que contém em solução ou suspensão uma variedade de substâncias e/ou componentes celulares, entre os

quais núcleos, mitocôndrias, ribossomos bem como ácidos nucléicos (Lynn & Clevette-Radford, 1986 b). A capacidade para formar látex é encontrada em plantas crescidas em diversos habitats e diferentes características morfológicas como ervas, arbustos e árvores. Cerca de 12.000-35.000 espécies, pertencentes a 900 gêneros de aproximadamente 12 famílias, maioria dicotiledônea, formam látex. Látex também pode ser produzido por fungos, como dos gêneros *Lactaria* e *Peziza*.

Embora o látex tenha na maioria das vezes um aspecto leitoso, como em *Hevea* e *Calotropis*, ele pode ser amarelo ou laranja, como em plantas da família Papaveraceae, marrom amarelado, em *Cannabis*, ou pode ser límpido como em *Morus* e *Nerium oleander* (Metcalf, 1967). O látex é um exudado citoplasmático de células especializadas, denominadas de laticíferos. Os laticíferos são classificados como articulados e não articulados. Os articulados consistem de cadeias longitudinais de muitas células em que as paredes celulares que separam as células individuais permanecem intactas, enquanto os laticíferos não articulados surgem de uma simples célula que cresce importunamente dentro dos espaços intracelulares, eventualmente ramificando-se nos tecidos das plantas de um modo similar as hifas de um fungo (Rudall, 1987).

Função Biológica dos Laticíferos

Várias funções têm sido atribuídas aos laticíferos. Uma delas é que eles formam um tecido de secreção, mas a vantagem para a planta de estocar látex ainda é duvidosa, pois a enorme quantidade de energia envolvida na síntese de borracha ou de outros componentes do látex não parece ser recuperável. Considerando que o látex foi encontrado em plantas do semi-árido, foi sugerido que os laticíferos podem ser uma reserva de água. Porém, nem todas as plantas que contêm látex estão restritas a regiões secas. Possivelmente, a justificativa mais aceita da presença de látex é seu envolvimento na defesa da planta (Rudall, 1987). Esse papel de defesa tem sido defendido através de estudos, principalmente, do látex de *Hevea brasiliensis*, em que foram encontradas várias proteínas relacionadas com a defesa da planta ou que em testes de atividade biológica tenha demonstrado toxicidade

contra patógenos como: a heveína (Lynn & Clevette-Radford, 1986b), as quitinases e as proteínas que se ligam à quitina (Jekel et. al.,1991).

Composição bioquímica do látex

Além de componentes celulares, essa secreção é composta por uma grande variedade de substâncias de baixa densidade, como proteínas, terpenos, carbonatos, alcalóides, vitaminas, carboidratos, lipídios e aminoácidos (Morcelle, et. al., 2004).

O látex possui uma grande diversidade de proteínas. Sendo especialmente rico em enzimas com atividades proteolíticas. Relata-se a ocorrência de inúmeras proteinases no látex de diversas espécies do gênero *Euphorbia*. Denominadas de euphorbainas, estas proteinases são classificadas como sendo do tipo serínicas (Lynn & Clevette-Radford, 1987b). No látex de *Hevea brasiliensis*, relata-se também a ocorrência de proteases similares que foram denominadas de heveminas (Lynn & Clevette-Radford, 1986b), o mesmo constata-se no látex de *Elaeophorbia drupifera* (Lynn & Clevette-Radford, 1985, 1987b) e de *Carica papaya*, também estudada pelo seu conteúdo de proteinases do tipo cisteínicas, tais como: papaína e quimopapaínas (McKee & Smith, 1986; Jacquet et al, 1989). Também têm sido estudadas no látex de plantas, especialmente em *H. brasiliensis*, outros tipos de proteínas, como: lectinas, quitinases (Jekel et. al.,1991), beta-1,3- glucanases (Chey & Cheung, 1995), lisozimas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), glicosidases (Giordani & Lafon, 1993), amilases (Lynn & Clevette-Radford, 1987a), inibidores de proteinases (Archer, 1983; Lin & Lu, 1994) dentre outros. O termo látex é frequentemente associado à borracha. Praticamente todos os produtos industrializados derivados da borracha são fabricados a partir de uma fração do látex extraído da planta *Hevea brasiliensis*, a seringueira. Isto inclui desde os pneus dos automóveis até a chupeta usada para crianças. A substância presente no látex que apresenta a característica de elasticidade da borracha é um polímero de isopreno. O poli – *cis*- isopreno é formado pela ação combinada de várias atividades enzimáticas presentes no fluido laticífero. Poliisoprenos constituem proporcionalmente a principal porção da maioria dos fluidos laticíferos e dão a estes a característica colante do

látex recém exsudado, assim como é a sua agregação em rede que promove o efeito tipo coagulante observado ocorrer progressivamente quando o látex é exsudado e entra em contato com o ar. Embora plantas laticíferas sejam um atraente modelo biológico para estudo, investigações sobre as propriedades bioquímicas e fisiológicas de látex são ainda limitadas em bases de dados bibliográficos. Em particular, a caracterização bioquímica, isolamento e purificação de proteínas, bem como de outros compostos presentes nesta secreção não são amplamente descritos na literatura. No que se refere à planta *C. procera*, esta caracterização foi alvo de estudo de nossos colaboradores (Freitas, 2006). No que diz respeito a suas propriedades medicinais, não são poucos os relatos de atividades farmacológicas detectadas em seu látex.

Investigar aspectos funcionais e farmacológicos do látex de *C. procera* é de cunho bastante relevante, principalmente considerando ser esta uma planta muito comum no Ceará.

Descrição e Características da Planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.

C. procera (Ait.) R. Br., pertencente à família Asclepiadaceae, é um arbusto perene, ereto, pouco ramificado podendo alcançar 3,5 metros de altura, mas geralmente ficando com menor porte quando ocorre em solo de baixa fertilidade. Ramos, folhas, pedúnculos e frutos são recobertos por cerosidade, mais intensa nas partes mais novas. Intensa presença de látex branco, que flui abundantemente quando se rompem os tecidos. Possui sistema radicular muito desenvolvido, com raiz principal pivotante. Folhas simples, sésseis, geralmente opostas, com limbo carnoso de formato ovalado ou oblongo, de ápice agudo, com 10 - 30 cm de comprimento por 7 - 15 cm de largura; nervuras bem desenvolvidas, sendo a central proeminente na face dorsal; superfícies lisas e glabras, de coloração verde-clara. As folhas estão presentes mais na parte elevada da planta, sendo que as inferiores se desprendem gradualmente. Inflorescências em pedúnculos carnosos e cilíndricos, terminais e axilares, em cuja extremidade encontram-se umbelas de flores pediceladas. As flores são actinormorfos e hermafroditas, cálice envolvente, com cinco lobos agudos, pouco perceptível por estar ajustado sobre a corola e

apresentar-se com a mesma textura e coloração. Os frutos são cápsulas infladas, globosas ou mangiformes, com até 12 cm de comprimento por 8 cm de largura, de parede externa carnosa, fina, com uma linha de sutura longitudinal; superfície lisa e glabra, de coloração verde, com depósito de cerosidade esbranquiçada. Sementes ovóides, com base arredondada e ápice agudo, achatadas, com 5 - 7 mm de comprimento por 3 - 4 mm de largura, com superfície pouco rugosa, de coloração castanha; no ápice um grande número de filamentos sedosos, prateados, com até 5 cm de comprimento. Embrião axial, espatulado grande. (Ferreira & Gomes, 1974) Multiplica-se apenas por sementes sendo disseminadas pelo vento (Lorenzi & Matos, 2002). O seu nome é derivado de Asclépios, Deus grego da medicina, do grego “kalos” = belo, “tropis” = barco e procera do latim “procerus” = alto, esbelto. Ela é provavelmente nativa da Índia, mas é encontrada em quase todas as regiões tropicais semiáridas da América, inclusive no Brasil, desde o Nordeste até o norte de Minas Gerais. A planta *C. procera* possui vários nomes populares de acordo com a região onde se encontra: algodão-de-seda e seda (PE), flor-de-seda, ciúme e hortência (CE), paininha-de-seda (SP) e leiteiro (SP, MG). (Figura 1)

Na medicina tradicional da Índia, a planta *C. procera* tem sido usada para combater várias doenças incluindo leprose, úlceras e tumores. Também tem sido usada como purgativo e anti-helmíntico (Kirtikar & Basu, 1935). Suas folhas e raízes são utilizadas para aliviar a dor em diferentes condições (The Wealth of India, 1992). Além disso, seu látex demonstrou diversas atividades biológicas como: hemólise de células sangüíneas e atividade anti-plasmodial (Sharma et al, 2001); atividade antidiarréica (Kumar et al., 2001); atividade antifertilidade em ratos (Kamath & Rana, 2002); atividade analgésica (Soares et al., 2005; Dewan et al., 2000); atividade esquistossomosicida (Sharma & Sharma, 2000); atividade antiinflamatória (Kumar & Basu, 1994; Alencar et al., 2004); pró-inflamatória (Singh et al., 2000) e antibacteriana (Larhsini et al., 1999).



Figura 1. Aspecto da planta *Calotropis procera*

Frações do Látex de *C procera*

Entre os componentes do látex de *C. procera*, o principal constituinte é a borracha, representando 85 % da matéria seca, enquanto as proteínas solúveis representam 10 %. Tendo em vista a toxicidade do componente poliisopreno, a borracha, surgiu o interesse de fracionar o látex. O protocolo de fracionamento do látex de *Calotropis procera* foi desenvolvido no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, pelo grupo do Prof.Márcio Viana, sendo esta parte constituinte de outro trabalho de dissertação. Este procedimento foi mostrado ser muito eficiente em separar as proteínas totais do látex de metabólitos de baixa massa molecular e principalmente da borracha.

A partir de procedimentos simples de centrifugação e diálise, dispomos de duas frações razoavelmente livres desse constituinte, as quais podemos denominar fração dialisável (FDL) e fração não dialisável (FNDL) (Alencar et al., 2006). A FNDL, obtida após diálise contra água e centrifugação, apresentou um valor médio de 8,18

mg/ml e após liofilização 71,33 % de proteínas solúveis. Essa fração é constituída de proteínas com diversas massas moleculares, variando de 10-95 kDa, prevalecendo as de aproximadamente 25-30 kDa. Esta riqueza protéica foi determinada a partir de eletroforese em gel de poliacrilamida e espectrometria de massa por nosso grupo (Alencar et al., 2006).

A FDL apresenta atividade inflamatória, como avaliada em recentes estudos (Alencar et al., 2006), induzindo peritonite em ratos, cuja migração celular de neutrófilos é revertida por corticóide, anti-histamínico e inibidores de TNF- α , mas não por inibidores da COX. A FNDL por sua vez, apresenta uma ação claramente antiinflamatória, como avaliada neste estudo, revertendo inclusive a ação da FDL na migração celular e em outros ensaios com edema de pata, cistite hemorrágica e peritonite induzida por carragenina (Alencar et al., 2004). A FNDL apresenta ainda efeitos antinociceptivos centrais e periféricos, independentes do sistema opióide (Soares et al., 2005) e provoca resposta alérgica quando injetado em camundongos por via subcutânea (Ramos et al, 2007).

1.2. Inflamação

Generalidades

A resposta inflamatória consiste numa série de eventos celulares e humorais desencadeados por um tecido vivo vascularizado, na tentativa de combater a agressão de um agente estranho, em geral exógeno ao organismo. Essa reação pode resultar em cura e eliminação do patógeno, com ou sem efeitos seqüelares, como cicatrização e fibrose, ou evoluir para um processo crônico, se a substância nociva persistir.

Em certas ocasiões, o agente desencadeador da inflamação pode ser endógeno, como no caso dos distúrbios auto-imunes, situação na qual a resposta inflamatória tende a ser prejudicial.

A grande maioria das patologias conhecidas envolve em menor ou maior grau respostas inflamatórias, desde infecções a neoplasias, com peculiaridades para cada tipo de agente agressor e local do evento. Este geralmente se inicia em um ambiente

restrito, como uma cavidade articular, a pele ou o cérebro, por exemplo, ou se dissemina por contigüidade, por brônquios, por vasos linfáticos e outros ou pela corrente sanguínea, situação na qual pode desencadear uma resposta inflamatória sistêmica grave. Dessa forma, reveste-se de fundamental importância a compreensão dos eventos inflamatórios para cada situação específica onde ocorrem, como exemplo da artrite aqui estudada, e como se desencadeia e evolui o processo, quais os mediadores implicados e assim de que forma intervir farmacologicamente.

Dentre os eventos inflamatórios gerais que podem ser facilmente avaliados em um modelo experimental, tendo em vista a caracterização de uma droga como pró-inflamatória ou antiinflamatória, destacam-se a migração celular, a dor inflamatória e a permeabilidade vascular. Os mecanismos e mediadores envolvidos nesses eventos variam, dependendo do local e da etiopatogenia de cada processo inflamatório particular. Assim, drogas que inibem a inflamação, no caso, por exemplo, de uma artrite, podem não fazê-lo plenamente ou parcialmente no caso de uma serosite, ou mesmo numa artrite desencadeada por um estímulo diferente. Por vezes, desempenha até um papel contrário, pró-inflamatório. Existem, obviamente, outros aspectos complexos quanto à ação das drogas, sobretudo no que diz respeito às vias de administração, sua biodisponibilidade, metabolismo e excreção. (Cotran et al., 2000; Rang & Dale, 2004; Gilman et al., 2004; Katzung, 2003)

Migração celular

A migração celular é um processo complexo dependente das populações celulares envolvidas e de seu estado de ativação, bem como da forma de interação celular com o endotélio, sendo essa última controlada pela expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas na superfície endotelial. Conforme Seely et. al. (2003), a migração de células ocorre através de uma seqüência de etapas, assim denominadas: marginação, rolagem e aderência; transmigração através do endotélio (diapedese) e migração nos tecidos intersticiais em direção a um estímulo quimiotático (quimiotaxia)

No fluxo sanguíneo normal, leucócitos encontram-se deslocados em direção ao endotélio devido à disposição dos eritrócitos numa coluna axial central

(Schmid-Schonbein et al., 1980). Esse deslocamento, associado a uma redução na velocidade do fluxo sanguíneo pelo aumento da permeabilidade vascular na fase inicial da inflamação, permite que um maior número de leucócitos assumam essa posição periférica, facilitando assim a marginação leucocitária. Posteriormente, leucócitos rolam lentamente sobre o endotélio, aí aderindo transitoriamente (rolagem) e, em seguida, aderem firmemente (aderência). Os leucócitos firmemente aderidos inserem pseudópodos entre as células endoteliais, transpondo as junções interendoteliais e a membrana basal, atingindo o espaço extravascular e dirigindo-se ao foco inflamatório (Seely et al., 2003). Além dessa migração através das junções endoteliais, leucócitos podem migrar para a área inflamada através de vacúolos endoteliais, em um processo ativo que ocorre em tecidos especializados como o cérebro e o timo, com crescentes evidências desse processo em outros tecidos.

Após o extravasamento, leucócitos são atraídos para o sítio inflamatório por um processo de quimiotaxia, definido como uma locomoção orientada ao longo de um gradiente químico. Através de quimiorreceptores localizados na membrana plasmática leucocitária, essas células respondem à quimiotaxia, migrando em direção ao local de maior concentração desses agentes quimiotáticos (Seely et al., 2003). Dentre as moléculas quimiotáticas primárias para neutrófilos, eosinófilos e monócitos, destacam-se: produtos bacterianos; componentes do sistema complemento (C5a e C3a); calicreína e ativador de plasminogênio; fibrinopeptídeos; produtos de degradação da fibrina; produtos da via da lipoxigenase, principalmente leucotrieno B₄ (LTB₄); fatores quimiotáticos de neutrófilos e eosinófilos liberados de mastócitos; fator quimiotático liberado de neutrófilo e, por último, citocinas, principalmente aquelas da família das quimiocinas. Embora não seja quimiotática “per se”, a histamina pode facilitar a quimiotaxia (McCance & Huether, 1998).

A eficácia das drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (DMARD) no tratamento da artrite reumatóide está, geralmente, associada a sua habilidade de diminuir o influxo de neutrófilos para as articulações inflamadas (Kraan et al., 2000). Assim, estratégias para limitar a migração e/ou ativação de neutrófilos têm recebido atenção como potenciais alternativos para o tratamento de artrites. Entretanto, tal como as drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINES), as DMARD apresentam efeitos colaterais com o uso em longo prazo.

Dor inflamatória

A dor constitui uma das principais estratégias de sobrevivência do ser vivo, alertando-o quanto a existência de um fator prejudicial à sua integridade física ou funcional, permitindo-lhe desencadear mecanismos de prevenção e defesa contra o agente agressor.

A dor pode ser mais bem entendida como sendo uma “experiência sensorial e emocional desagradável, que é associada ou descrita em termos de lesões teciduais. A dor é sempre subjetiva. Cada indivíduo utiliza a palavra dor de acordo com o aprendizado frente a suas experiências prévias. É uma sensação desagradável localizada em uma parte do corpo” (definição da International Association for the Study of Pain – IASP)

Dessa forma, a dor apresenta dois componentes principais: o afetivo que é comportamental e subjetivo e o nociceptivo, que é sensorial e discriminativo, e que por ter um substrato anátomo-fisiológico mais bem definido pode ser facilmente reproduzido e estudado experimentalmente.

A nocicepção (percepção do nocivo, do latim) refere-se à recepção de sinais pelo SNC evocados pela ativação de receptores sensoriais periféricos, que transmitem a informação a partir de potenciais de ação. Esses chamados nociceptores são suscetíveis a diversos estímulos, físicos ou químicos, podendo ser influenciados por mediadores provenientes da resposta inflamatória. Vale lembrar que a dor inflamatória pode ser nociceptiva, quando há integridade das vias sensitivas ou estar relacionada a outras modalidades de dor, como a dor neuropática, que ocorre quando há lesão neural central ou periférica devido ao estímulo inflamatório.

Dependendo da natureza do mediador, este poderá ativar o receptor ou sensibilizá-lo, ou seja, diminuir seu limiar de excitação, neste caso denominado mediador hiperalgésico ou ainda ambas as coisas. (Millan, 1999)

Dentre os mediadores hiperalgésicos as citocinas merecem destaque, a partir da sua liberação por macrófagos residentes, notadamente IL-1 e TNF - α (Ferreira et al., 1988, Cunha et al., 1992a), os quais agem indiretamente pelo estímulo a

liberação de eicosanóides e simpaticomiméticos. A ação do TNF - α foi comprovada pela inibição da nocicepção pela talidomida em diversos modelos experimentais, inclusive na artrite induzida por zymosan (Vale, 2003). O TNF - α é uma citocina singular, pois exerce um papel pivô ao desencadear uma cascata de citocinas, sendo um dos primeiros mediadores secretados em resposta a um estímulo nocivo (Fong & Lowry, 1990, Cunha et al., 1992a), e um dos principais responsáveis pela liberação de mediadores hiperalgésicos em eventos agudos, já que o aumento dos seus níveis é detectado 15 a 30 min após um estímulo inflamatório.

Diante dessa abrangência e da sua importância em eventos agudos, foi interessante para o presente estudo avaliar o comportamento do TNF - α no modelo de artrite induzida por zymosan sobre a influência farmacológica da FNDL.

Permeabilidade Vascular

A inflamação pode ser compreendida como eventos vasculares e celulares atuando concomitantemente. O aumento da permeabilidade vascular, como definiu Collins, é “o marco da inflamação aguda” (Cotran et al., 1999). Esse aumento ocorre a partir de alterações no calibre e fluxo dos vasos quando ocorre um estímulo lesivo, iniciando-se com vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo. Isto explica o calor e rubor da inflamação. Em seguida ocorre estase do fluxo, proporcionando a marginação leucocitária, ou seja, que os leucócitos migrem para próximo do endotélio, facilitando a interação entre eles. A partir daí, alterações no endotélio são decisivas para o aumento da permeabilidade. Vários mecanismos estão implicados, como o surgimento de lacunas, seja por contração endotelial ou por reorganização do citoesqueleto. Ambos estão implicados na inflamação e são responsivos a mediadores como a histamina e citocinas (TNF - α , IL-1) liberados por células. Outros mecanismos são o aumento da transcitose e lesão direta do endotélio.

O efeito final será um extravasamento de líquido rico em proteínas e células de defesa do sangue, formando um exsudato, que exerce uma pressão coloidosmótica importante no ambiente extravascular, promovendo maior acúmulo

de líquido neste espaço. Diferencia-se, portanto, do transudato, que é apenas efeito do desequilíbrio das pressões hidrostáticas entre os dois meios.

Nota-se assim, que o aumento da permeabilidade vascular é um dos primeiros e fundamentais eventos da inflamação e que está intimamente relacionado à migração celular, já que facilita a marginação leucocitária e, por conseguinte a interação com o endotélio e a diapedese. (Cotran et al., 1999)

Citocinas

Citocinas são glicopeptídeos produzidos e secretados por diferentes tipos celulares em virtude de variados estímulos. Exercem sua função ligando-se a receptores específicos de células alvo, em diversas situações críticas, como defesa, reparo e crescimento do organismo. As classes mais conhecidas incluem as interleucinas, os interferons, os fatores de necrose tumoral, os fatores estimulantes de colônia e fatores de crescimento (Hopkins, 1990). Dependendo do caráter do evento e da necessidade do organismo, determinada citocina pode ter uma função chave em uma situação e em outra ter pouca expressão. Dessa forma, uma citocina pode ser importante na fisiopatologia de uma inflamação em uma cavidade articular, mas ser apenas mera coadjuvante em uma peritonite, por exemplo. Essa variedade em parte explica a necessidade de se avaliar a efetividade de um fármaco em situações específicas.

Dentre as citocinas pró-inflamatórias, destacamos o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que apresenta papel chave em diversos processos, como a inflamação, imuno-modulação, crescimento, angiogênese, citotoxicidade e dor (Aggarwal & Natarajan, 1996; Taylor et al., 2004; Ferreira et al., 1988; Cunha et al., 1992a). Está bem descrito na literatura, a participação do TNF- α no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório (Canetti et al., 2001; Saunders et al., 2005). Embora, o TNF- α não seja considerado um fator quimiotático clássico, uma vez que não induz migração de neutrófilos *in vitro*, ele promove a síntese e liberação de fatores quimiotáticos, como as quimiocinas, tanto pelas células endoteliais quanto pelas células residentes (Faccioli et al., 1990).

Diversos estudos demonstraram a participação do TNF- α na migração de neutrófilos em diversos modelos de reação inflamatória, tais como a artrite reumatóide induzida por colágeno do tipo II e em doenças inflamatórias humanas, como a doença inflamatória intestinal e a artrite reumatóide (Beck & Wallace, 1997; Canetti et al., 2001). Deste modo, terapias com anticorpo neutralizante para o TNF- α e com receptores solúveis do TNF- α estão sendo utilizadas para reduzir a inflamação em pacientes com artrite reumatóide ou com doença inflamatória intestinal (Wooley et al., 1993; Reimold, 2002; Fleischmann & Shealy, 2003).

1.3. Artrite reumatóide

Definição

A artrite reumatóide (AR) constitui a mais freqüente das artropatias inflamatórias, depois da osteoartrite, com uma prevalência estimada em 1% da população mundial acometendo preferencialmente o sexo feminino (Hochberg & Spector, 1990; Markenson, 1991; Spector, 1990). É uma doença inflamatória crônica sistêmica que afeta principalmente as articulações, apresentando-se usualmente como uma poliartrite simétrica, sendo os sintomas iniciais a dor e rigidez articulares, progredindo para destruição e deformidade da articulação, e conseqüente incapacidade funcional.

Etiopatogenia

A AR é caracterizada por infiltrado de neutrófilos, células T, células B e macrófagos na sinóvia e fluido nos espaços peri-articulares (Harris Jr, 1990). Estudos têm sugerido a participação de fatores genéticos, ambientais e imunológicos no desenvolvimento da AR (Heliovaara et al., 1993; Karlson et al., 1999; Silman et al., 1996). Sua etiopatogenia é complexa, envolvendo a participação de uma resposta imuno-inflamatória, com a liberação de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas (TNF- α , IL-1, IL-2 e IL-6) e eicosanóides, que contribuem para a

perpetuação e progressão da sinovite. De fato, estudos mostraram aumento na produção de citocinas por sinoviócitos e células mononucleares do sangue periférico de pacientes com AR, espontaneamente ou após estímulo in vitro (Harris Jr, 1990; Brennan et al., 1992).

Além disso, estudos têm demonstrado que os neutrófilos desempenham um papel crucial na artrite, onde eles regulam e orquestram não apenas a resposta inflamatória aguda, mas também a inflamação crônica e regulação imune (Kasama et al., 2005).

Recentemente, estudos sobre o mecanismo de ação antiinflamatória do metotrexate revelaram uma importante ação da adenosina como modulador dos eventos inflamatórios na AR (Cronstein, 1997)

Dentre os vários aspectos envolvidos na AR, avaliamos o efeito da FNDL na migração celular, na dor inflamatória articular, na produção de TNF- α , na permeabilidade vascular e na atividade da adenosina desaminase, vislumbrando-se uma possível relação com a adenosina.

Drogas utilizadas na terapêutica da AR

O metotrexate constitui ainda hoje a droga de primeira linha no tratamento da AR e, portanto, principal droga antiinflamatória modificadora da AR (DMARD) em uso clínico. Inicialmente a droga foi desenvolvida como inibidor da enzima folato redutase, passo fundamental no processo de proliferação celular, detendo atividades anti-neoplásicas. Contudo, baixas doses da droga exibem diversos efeitos antiinflamatórios já bem caracterizados sobre neutrófilos e macrófagos, os quais se acredita desempenharem papel central na fisiopatologia da AR e sinovite inflamatória (Cronstein et al., 1991; Cronstein, 1997; Genestier et al., 1998; Hu et al., 1988) .

Uma das hipóteses mais aceitas sobre a ação antiinflamatória de baixas doses do MTX na AR é a de Chan & Cronstein, 2002. Segundo eles, o MTX aumenta a expressão da enzima AICAR transformilase, em um dos passos da sua ação sobre a síntese de purinas. Esta enzima, entre outras ações, reduz a atividade da ADA,

que desta forma promove o aumento da adenosina. Esta é disponibilizada extracelularmente e exerce seus efeitos via receptores ligados à proteína G.

No caso específico da adenosina liberada nestas situações, parece haver uma ação preferencial sobre os receptores A_2 , o qual aumenta o AMPc intracelular, que leva, entre outras ações, à inibição na secreção de TNF- α (Kreckler et al., 2006). A piora na resposta clínica de pacientes com AR em uso de cafeína, um antagonista não-seletivo dos receptores de adenosina, reforça esta hipótese (Silke et al., 2001). Em 1993, Cronstein et al. mostraram que um antagonista específico do receptor A_{2A} como também a administração de ADA revertia os efeitos antiinflamatórios do MTX em um modelo de inflamação induzido por carragenina.

1.4. Adenosina e adenosina desaminase (ADA)

A adenosina é um nucleosídeo purina que vem se estabelecendo como importante agente antiinflamatório, devido sua potente ação supressora em virtualmente todas as células do sistema imunológico (Hasko & Cronstein, 2004). Já está bem estudado, por exemplo, que a adenosina inibe a adesão de neutrófilos (Cronstein et al, 1986; Firenstein et al, 1995; Bouma et al., 1996), liberação de citocinas pró-inflamatórias (Bouma et al., 1996; Parmely et al, 1993), síntese de LTB4 (Krump et al, 1996) e liberação de histamina pelos basófilos (Marone et al, 1979). Possui quatro subtipos de receptores conhecidos, A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , todos ligados à proteína G, dos quais os subtipos A_2 são os mais implicados na modulação da inflamação, via AMPc, com um papel crítico na inibição da produção de ânion superóxido, desgranulação e adesão de neutrófilos (Hasko & Cronstein, 2004) e na inibição da liberação de TNF- α por macrófagos (Kreckler et al., 2006). Seus níveis intra e extra-celulares são modulados principalmente pela adenosina desaminase (ADA) (Cronstein et al., 1995).

A adenosina desaminase (ADA) que catalisa a desaminação da adenosina e 2'deoxi-adenosina tem um papel fundamental no desenvolvimento e funções do sistema imunológico, como por exemplo na maturação dos monócitos (Fischer, et al., 1976). Já está muito bem estabelecido, em número relevante de publicações, que a

ADA tem sua atividade aumentada em inúmeras doenças infecciosas tais como hepatite e tuberculose (Krawczynski et al., 1965; Raczynska et al., 1966; Goldberg et al., 1966; Nishikawa et al, 1986; Pushpakon, 1990) e alguns tipos de câncer (Durak et al., 1994a; Durak et al, 1994b; Namiot et al., 1994). A determinação dos níveis de ADA no líquido pleural ou ascítico é largamente utilizada para o diagnóstico da tuberculose. (Piras et al., 1978; Riquelme et al., 2006)

No Homem ADA é encontrada sob duas formas: uma tissular (ADA1) e outra sérica (ADA2) (Gakis et al., 1989; Van der Weyden & Kelley, 1976). Gakis et al. (1989), formularam a hipótese de que os altos níveis de ADA sérica poderiam ser o reflexo de sua liberação pelo sistema monocítico-macrofágico nas doenças causadas por microorganismos intracelulares, daí sua utilidade no diagnóstico da tuberculose.

Dentre outros estudos realizados em nosso laboratório, foi demonstrado o aumento dos seus níveis na Artrite Encefalite Caprina, virose muito comum que acomete os rebanhos brasileiros (Rodrigues, 2001) indicando uma possível utilização da ADA como ferramenta auxiliar de diagnóstico dessa doença.

1.5. Modelos experimentais de artrite

O fato da AR ter uma etiopatogenia complexa e não inteiramente entendida, limita a reprodução de um modelo experimental em animais que possibilite uma avaliação fidedigna de novas terapêuticas. Contudo, alguns modelos empregados são bastante semelhantes à doença humana, permitindo o estudo de eventos comuns, como a permeabilidade vascular, a migração celular, a dor e a hiperplasia sinovial (Harris Jr, 1990).

Dentre os vários modelos utilizados, destacam-se a artrite induzida por adjuvante, a artrite induzida por antígeno, a artrite induzida por colágeno, a artrite induzida por imunocomplexos e a artrite induzida por zymosan.

A artrite induzida por adjuvante ocorre a partir da injeção intradérmica de uma suspensão em óleo de *Mycobacterium tuberculosis* ou *butyricum* mortos pelo calor (Chang et al., 1980). Nesse modelo a reação inflamatória leva à formação do *pannus* e evolui com erosão da cartilagem e do osso subcondral. A impossibilidade de

determinação do início da inflamação, da sistematização das lesões, afetando inclusive cartilagem elástica, e a restrição a uma cepa de ratos são limitações desse modelo, quando comparado à AR em humanos.

A artrite induzida por colágeno é desencadeada pela injeção de colágeno tipo II emulsificado em adjuvante incompleto de Freund (Heymer et al, 1982). O início da artrite se dá em torno do 16º dia após a imunização, com desenvolvimento de anquilose (Brahm, 1991). As limitações principais são a especificidade ao antígeno de indução e a dificuldade em se estabelecer o início da lesão, o que limita a observação do efeito de intervenções farmacológicas.

Na artrite induzida por imunocomplexos, ratos são submetidos à injeção intra-articular de um anticorpo (p.ex. anti-soro albumina bovina) seguida da injeção sistêmica do respectivo antígeno (soro-albumina bovina). Ocorre, então, deposição de complexo antígeno-anticorpo na sinóvia, assim como presença de intenso infiltrado celular, liberação de eicosanóides e síntese de TNF- α no líquido sinovial (Rocha et al, 1997). O caráter auto-limitado da reação é o problema mais importante nesse modelo, ao lado da relativa benignidade da evolução, contrastando com a AR humana.

Artrite induzida por zymosan

O zymosan (Zy) é um polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae* que induz reação inflamatória quando injetado em tecidos, como na cavidade peritoneal (Doherty et al., 1985), na pele (Ridger et al., 1997; Greenacre et al., 2001) ou intra-articularmente (Gado & Gigler, 1991). Os mecanismos são múltiplos, incluindo ativação da via alternativa do sistema complemento, degranulação de mastócitos de aminas vasoativas como serotonina e histamina, geração de produtos do metabolismo do ácido araquidônico e estimulação de macrófagos e neutrófilos na liberação de mediadores inflamatórios (Tadimetri et al., 1994; Ajuebor et al., 1998; Coates & McColl, 2001; Kolaczowska et al., 2001).

A fase aguda da artrite induzida por zymosan (AZy) caracteriza-se pelo aumento da permeabilidade vascular, edema e intenso influxo celular (IC) de

neutrófilos na cavidade articular (Rocha et al., 1999), com posterior sinovite progressiva, infiltrado mononuclear e ativação de fibroblastos, assemelhando-se ao *pannus reumatóide* (Keystone et al 1977; Gegout et al., 1994). Outros estudos apontam a degradação da cartilagem articular e do osso subcondral na fase crônica da artrite por zymosan (Gegout et al., 1995; Bezerra et al., 2004) .

Em face a tais similaridades, associado ao seu baixo custo e praticidade, o modelo de artrite induzida por zymosan foi utilizado nesse trabalho para o estudo da FNDL sobre a migração celular aguda, permeabilidade vascular, dor inflamatória, níveis de TNF - α e adenosina desaminase e alterações histológicas locais.

Artrite induzida por antígeno (mBSA)

A artrite induzida por antígeno consiste na sensibilização prévia do animal a um antígeno, com posterior indução a partir da injeção intra-articular da substância antigênica (p.ex. soro-albumina bovina) (Dumonde & Glynn, 1962). Nesse caso, é possível determinar precisamente o início da artrite, demonstrando-se a expressão de anticorpos na membrana sinovial (Jasin & Ziff, 1969), presença do fator reumatóide (Heymer et al, 1982) e ainda a presença de depósitos de imunocomplexos e complemento nos tecidos avasculares, semelhante à AR humana.

Esse modelo tem muitas características histológicas da artrite reumatóide humana. É desenvolvido através da imunização e desafio com um antígeno conhecido como a albumina bovina sérica metilada (mBSA). Essa proteína, a mBSA, é comumente utilizada na forma de antígeno solúvel associado ao adjuvante de Freund, o qual é usado para dirigir a resposta imune para um padrão de resposta Th1. Ademais, o tipo de resposta observada em modelos de imunização e desafio com o antígeno é uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), iniciada após a apresentação do antígeno por células apresentadoras de antígenos (APCs), via MHC, a linfócitos T, desencadeando a resposta imune e a produção de citocinas (Gallin, 1993).

O modelo de imunização e desafio com mBSA permite a indução de uma DTH na articulação (Brackertz et al., 1977; de Hooge et al., 2001). Dessa forma, a articulação de camundongos, representa um local ideal para o estudo de reações inflamatórias, visto que na artrite reumatóide existe um grande infiltrado de neutrófilos e linfócitos T CD4⁺ para as articulações. Este modelo tem sido extensivamente usado para elucidar os mecanismos patogênicos importantes na artrite reumatóide, podendo levar a identificação de alvos para intervenção terapêutica.

1.6. Peritonite infecciosa

O processo de peritonite infecciosa induzida por ligadura e punção cecal desencadeia uma extensa ativação das células de defesa a nível focal e sistêmico. Esse modelo foi originalmente estabelecido por Wichterman (1980) e utilizado no presente trabalho.

Nosso grupo já demonstrou que o influxo celular para a cavidade peritoneal ocorre com pico às 12h após a indução e que há aumento nos níveis de atividade da adenosina desaminase (ADA) no lavado peritoneal. Este modelo já foi por nós utilizado com sucesso na avaliação antiinflamatória de outras drogas, como as lectinas (Alencar et al., 2005). Em outra dissertação de mestrado do nosso grupo definimos o perfil isoenzimático da ADA no líquido peritoneal, fígado e baço durante a evolução da infecção (Luna, 2001).

Os resultados obtidos até agora nos animaram a continuar o estudo de possíveis agentes antiinflamatórios em modelos de peritonite, desta feita verificando os efeitos da fração não dialisável do látex de *C procera*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 230 e 280 gramas (artrite por zymosan), camundongos Balb/c machos, pesando entre 18 e 22 gramas (artrite induzida por antígeno) e camundongos Swiss machos pesando 25 e 35 gramas (peritonite infecciosa), sempre em grupos de 6 animais. Os ratos e os camundongos Swiss foram fornecidos pelo biotério central do Campus do Pici-UFC e os camundongos Balb/c pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) e mantidos no biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC e Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, respectivamente, em condições controladas de temperatura (21°C), sob um ciclo de claro/escuro de 12/12 horas, com livre acesso à água e alimentação. Todos os procedimentos foram realizados seguindo as diretrizes preconizadas pelo Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 2003), com todo o esforço possível no sentido de minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados.

2.2. Aparelhos e instrumentos laboratoriais

- Aparelho para medir incapacitação articular (elaborado pelo prof. Marcus R Vale e cedido pelo LAFICA)
- Autoclave
- Balança para pesagem de animais
- Balança analítica
- Beckers
- Câmera digital (Coolpix 4500, Roper Scientific, Japão)
- Câmara de Neubauer 0.100/0.0025 mm²
- Centrífuga
- Espectrofotômetro
- Lâminas e lamínulas para microscopia

- Material cirúrgico (tesoura, pinças anatômica e dente de rato)
- Microscópio óptico binocular (Nikon)
- Micropipetas automáticas (GILSON)
- Ponteiras para pipetas automáticas (SIGMA)
- Tubos Eppendorf 1.5ml (GIBCO)
- Tubos de ensaio de vidro (PIREX)
- Tubos Falcon
- Ultracentrífuga (Amicon corporation)

2.3. Soluções, drogas e reagentes

Todos os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza e propriedades analíticas adequadas e as drogas utilizadas foram:

- Ácido tri-cloroacético (10%)
- Adenosina (Sigma, EUA)
- Adjuvante de Freund (Sigma, EUA)
- Albumina bovina sérica metilada (mBSA)(Sigma, St Louis, MO, EUA)
- Anticorpo monoclonal (mAb) anti-TNF- α (purificado do soro de carneiro; Peprotec)
- Azul de Evans 2,5% (Neo-química)
- Corante Panótico Rápido (LaborClin; Produtos para Laboratório Ltda, Pinhais, PR, Brasil)
- Éter etílico (Syth)
- Fenol/nitroprussiato de sódio (1% / 5mg%)
- Formamida
- Formol
- Heparina (Cristália- Brasil).
- Hidrato de cloral 10% (REAGEN - Brasil);
- Hipoclorito alcalino (0,08% em NaOH, 12,5mN)
- Peróxido de hidrogênio (Smith)

Salina heparinizada

Solução salina 0,9% estéril.....	100 mL
Heparina.....	100 mL

- Solução 1:5000 do conjugado avidina-horseradish peroxidase (DAKO A/S, Denmark)
- Solução de Turk
 - Ácido acético glacial (Reagen)20,0ml
 - Violeta genciana (Reagen)2,0ml
 - Água destilada.....1000,0ml
- Solução de Tampão Salina-fosfato (PBS):
 - Cloreto de Sódio (NaCl, Merck).....8,0 g
 - Cloreto de Potássio (KCl, Merck).....0,2 g
 - Fosfato de Sódio dibásico (Na₂HPO₄, Merck).....1,15 g
 - Fosfato de Potássio monobásico (KH₂PO₄, Merck).....0,2 g
 - Água deionizada Milli-Q q.s.p.....1L
- Solução de PBS-Tween (Merck)
- Solução de H₂SO₄ a 1M
- Solução salina 0,9% estéril (Cristália Brasil)
- Substrato dihidroclorido de 1,2-fenilenodiamina (ortofenileno diamina, OPD, Sigma)
- Tampão fosfato pH 7.2
- Zymosan A (from *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma Chemical Co., St Louis, USA), dissolvido em salina

2.4. Protocolo experimental

2.4.1. Modelo de artrite induzida por zymosan (AZy)

Indução

Sob leve anestesia com éter etílico, ratos Wistar foram submetidos à indução da AZy por meio da injeção intra-articular, no joelho direito, de 1mg de zymosan dissolvidos em 50 µL de solução salina estéril, apirogênica (Keystone et al.,1977). O grupo controle negativo foi submetido apenas à administração de salina no joelho direito.

Tratamento com a fração não dialisável do látex de *Calotropis procera* (FNDL)

A FNDL foi administrada nas doses de 3, 5, 10, 30 e 100mg/kg; e.v., em um volume de 500µL, diluída em salina – 30 min antes e 2h depois da aplicação do zymosan na articulação. Nos protocolos de avaliação da permeabilidade vascular e dosagem de citocinas, foi administrada a dose que apresentou melhor efeito no teste de incapacitação articular (3mg/Kg).

Teste de incapacitação articular

Para esta abordagem foi utilizado o modelo desenvolvido por Tonussi e Ferreira (1992), modificado posteriormente (Viana et al., 1998; Rocha et al., 1999) e adaptado para este estudo. O modelo consiste em fazer os ratos deambularem, após prévio treinamento de adaptação, em uma roda de piso metálico (cilindro de alumínio, 30cm de diâmetro por 50cm de largura) em movimento giratório a uma velocidade de 3 rpm. Sapatilhas metálicas eram colocadas 30 min antes em ambas as patas traseiras do animal, sendo a direita, local de injeção intra-articular do Zy, conectada à porta de dados de um microcomputador. Ao tocar a sapatilha no piso metálico, fecha-se um circuito, e ao final de 60 s, o computador registrava então o tempo de suspensão da pata (TSP), ou seja, o tempo em que o animal permaneceu com a pata levantada sem tocar o piso (Figura 2). O TSP é tomado antes da injeção do Zy e após, de hora em hora, até a quinta hora. O aumento do TSP é então interpretado como nocicepção, ou seja, incapacidade pela dor do animal deambular sobre a roda.



Figura 2. Fotografia do sistema utilizado para o teste de incapacitação articular em ratos – gentilmente cedido pelo LAFICA - UFC

Coleta do lavado articular

Após 6h da indução da AZy, os animais foram sacrificados, sob anestesia (hidrato de cloral 10% – 100uL/30g de animal; i.p.), por exsangüinação, com posterior lavagem da cavidade articular. Essa foi realizada através de duas injeções intra-articulares, seguidas de aspiração, de 200µL de salina heparinizada (100µL de salina estéril apirogênica/ 100µL de heparina). O fluído articular foi utilizado com as seguintes finalidades: contagem total e diferencial de leucócitos, determinação da atividade da ADA e dosagem de citocinas. Para as duas últimas a coleta foi realizada em banho de gelo, as amostras centrifugadas a 3000 xg, a 4°C, por 10 minutos e os sobrenadantes obtidos foram estocados a -20°C para posterior análise.

Avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade articular induzida por Zy

Amostras do lavado articular foram utilizadas para contagem total e diferencial dos leucócitos. Alíquotas de 20 μ L do lavado articular foram diluídas em líquido de Turk, na proporção de 1:2, sendo a contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 40x) e contador manual e expressa como número de leucócitos $\times 10^4$ /cavidade articular.

As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação de uma alíquota de 50 μ L do lavado articular e coradas pelo corante panótico rápido (LaborClin; Produtos para Laboratório Ltda, Pinhais, PR, Brasil). As células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 100 x), sendo contadas 100 células por lâmina. A quantificação dos neutrófilos presentes na cavidade articular foi calculada pela percentagem dessas células contadas nos esfregaços e pela quantidade de células totais obtidas na contagem total. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos $\times 10^4$ /cavidade.

Ensaio da ADA

Após centrifugação do lavado articular foram utilizados 20 μ L do sobrenadante como fonte da enzima para determinação da atividade da ADA através do método de Giusti (1974). Este ensaio é baseado na análise da amônia formada durante a desaminação da adenosina (21mM) pela ADA (Figura durante 60 minutos de incubação a 37°C em tampão fosfato 50mM, pH7,2. Para a quantificação da amônia foram adicionados 600 μ l de fenol/nitroprussiato de sódio (1% / 5mg%) e 600 μ l de hipoclorito alcalino (0,08% em NaOH, 12,5mN). Após 30 minutos adicionais de incubação a 37°C os tubos são analisados em espectrofotômetro sob 628nm. Os resultados foram expressos em unidades por litro (U/L) do sobrenadante.

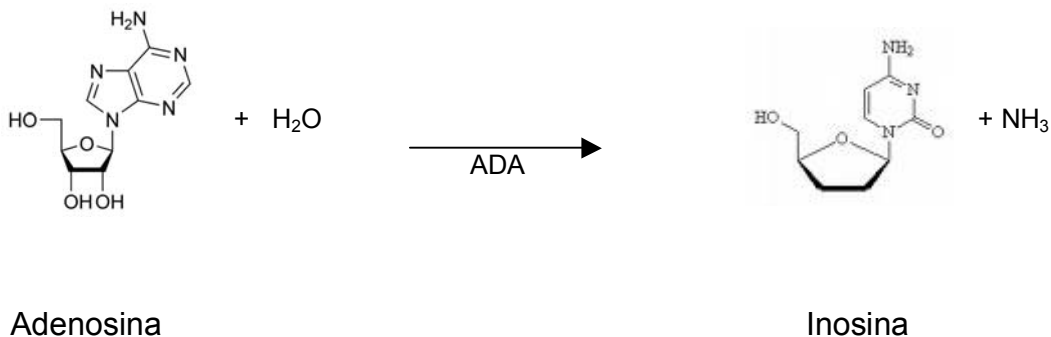


Figura 3 – Esquema da desaminação da adenosina pela ADA

Dosagem de citocinas (TNF- α)

O ensaio para determinação da concentração de TNF- α foi realizado baseado em protocolo já descrito (Taktak et al., 1991). Brevemente, placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50 μ L de “PBS coating buffer” contendo 2,0 μ g/mL do anticorpo monoclonal (mAb) anti-TNF- α (purificado do soro de carneiro; Peptotec). A placa foi incubada “overnight” 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 μ L/poço), e em seguida foram incubadas com 50 μ L de solução de bloqueio (1% de albumina bovina em “PBS coating buffer”) durante 2h em temperatura ambiente. A placa foi lavada conforme descrito acima e, em seguida adicionou-se (triplicata) dos fluídos articulares e TNF- α (Peptotec) em concentrações decrescentes diluídas em PBS-Tween (o primeiro ponto da curva-padrão de TNF- α foi de 2000pg/mL). A placa foi novamente coberta e mantida “overnight” a 4°C. No terceiro dia a placa foi lavada por três vezes e adicionada com anticorpo biotilado anti-TNF- α (1:1000 em solução de lavagem contendo 1% de soro de cabra, Peptotec).

Após 1 h de incubação à temperatura ambiente, a placa foi lavada e em seguida adicionou-se 50 μ 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 μ L do substrato dihidroclorido de 1,2-fenilenodiamina (ortofenileno diamina, OPD, Sigma) diluído em tampão e adicionado com 0,4 μ L de H₂O₂ 30% por mL.

Após o desenvolvimento da cor, a reação foi interrompida pela adição de 75 µL de solução “stop” (H₂SO₄ – 1M). A medida da absorbância foi determinada a 490 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL de TNF-α com base na curva padrão obtida.

Permeabilidade vascular

A avaliação da permeabilidade vascular foi feita através do método quantitativo de extravasamento do Azul de Evans (AE), que se baseia na capacidade deste corante em ligar-se à albumina sérica (Kwan et al., 1996). O corante é administrado e.v. pela veia peniana do rato na dose de 25mg/Kg, a 2,5%, 30 min antes do sacrifício. Em seguida a articulação do joelho no qual foi injetado Zy ou salina é retirada, pesada e imergida em 2ml de formamida, sendo incubada por 12h a 56°C. Após esse período as articulações são desprezadas e a quantidade de AE extravasado é determinada indiretamente na solução através da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (630nm). A relação das absorbâncias com as concentrações de AE extravasado é obtida através da utilização de uma curva padrão do corante. A quantidade de Azul de Evans foi expressa por mg AE/100mg de articulação.

Análise histopatológica

A região da articulação fêmur-tibial foi isolada e imersa em formol tamponado a 10%, para fixação durante 24 horas. Em seguida os tecidos foram descalcificados em ácido tri-cloroacético (10%) por aproximadamente 18 horas. Esses tecidos foram então desidratados e incluídos em blocos de parafina. Cortes de 6 µm de espessura foram dispostos em lâmina de microscopia. As lâminas foram coradas segundo a técnica de coloração com hematoxilina e eosina. Os cortes foram analisados em microscópio (Nikon, Japão) com aumento de 40x e 1000x, as imagens foram captadas por câmera digital (Coolpix 4500, Roper Scientific, Japão) armazenadas em computador e editadas utilizando o software Adobe Photo Shop 9.0.

A avaliação histopatológica da amostra de tecido sinovial foi realizada por um patologista e classificada segundo a metodologia descrita por Pothoulakis et al. (1994) seguindo a seguinte escala:

Escala de 0 a 3:

0 - ausência de edema/ destruição tecidual/ infiltrado inflamatório/ espessamento da membrana sinovial.

1- edema leve/ infiltrado inflamatório moderado misto (poucos neutrófilos)/ pouco espessamento da membrana sinovial/ arquitetura preservada.

2- edema moderado/ infiltrado celular inflamatório / adipócitos íntegros/ sem destruição da arquitetura.

3- presença de edema/ destruição tecidual/ infiltrado celular inflamatório misto (polimorfo e mononuclear)/ espessamento da membrana.

2.4.2. Modelo de artrite induzida por antígeno (AIA)

Procedimento de imunização e desafio com mBSA

Camundongos Balb/c foram imunizados, através de injeção subcutânea (s.c.), com uma emulsão contendo 200 μ L de volumes iguais de PBS e adjuvante completo de Freund (ACF), na qual estavam dissolvidos 500 μ g de mBSA. No 7^o e 14^o dia após a primeira imunização foram administrados (s.c.) reforços da emulsão com adjuvante incompleto de Freund (AIF). Os animais falso-imunizados receberam o mesmo tratamento aplicado aos demais, porém sem a administração de mBSA. No 21^o dia, os animais imunizados foram desafiados com mBSA (10 μ g/cavidade) através de injeção intra-articular (articulação fêmoro-tibial).

Tratamento com a fração não dialisável do látex de *Calotropis procera* (FNDL)

A FNDL foi administrada nas doses de 3, 10, 30mg/kg; e.v., em volume de 100uL, diluída em salina – 30 min antes e 6h depois do desafio com mBSA na articulação.

Coleta do lavado articular

Os camundongos foram sacrificados 24 horas após o desafio para a avaliação da migração de neutrófilos. Para tal, foi coletado o lavado intra-articular com 5 µl de PBS contendo EDTA (1 mM, duas vezes) e estes diluídos em 90 µL de PBS contendo EDTA (1 mM). A partir do lavado articular foram feitas a contagem total e diferencial dos leucócitos.

2.4.3. Modelo de Peritonite Infecciosa

Indução da peritonite infecciosa

O modelo de peritonite infecciosa foi baseado na ligadura e perfuração do ceco dos animais (Wichterman et al., 1980). A cirurgia foi realizada em camundongos Swiss, sob anestesia leve com éter. Após laparotomia mediana, as fezes são ordenhadas para o ceco seguido de ligadura do trato cecal, sem prejuízo para o trânsito intestinal. A bolsa assim formada foi perfurada em dois locais com agulha hipodérmica nº 21, para permitir o extravasamento de material fecal para a cavidade abdominal. O corte cirúrgico foi então suturado. A partir desse momento, o animal foi mantido com água “ad libitum”. As coletas de líquido peritoneal foram realizadas 12 horas após a indução da peritonite, período correspondente ao pico do processo inflamatório agudo (Alencar et al., 2005). Os animais controle sofreram os mesmos processos, exceto pela não perfuração do ceco.

Tratamento com a fração não dialisável do látex de *Calotropis procera* (FNDL)

A FNDL foi administrada na dose de 10 mg/Kg; i.v., em volume de 100uL, diluída em salina estéril, imediatamente após e 6h depois da cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.

Coleta do lavado peritoneal

Foi administrada à cavidade peritoneal 3 ml de salina heparinizada seguida de leve massagem. O lavado peritoneal foi coletado para posterior contagem total e diferencial de células e determinação da atividade da ADA seguindo a mesma metodologia descrita no modelo de artrite induzida por zymosan.

2.4.4. Teste de toxicidade

Ratos Wistar foram submetidos a aplicações diárias via endovenosa da FNDL na doses de 10 mg/Kg, correspondente a 3 vezes o valor da menor dose efetiva (3mg/kg), durante sete dias, em volume de 100 µL. O grupo controle recebeu aplicação diária de salina (100 µL) por sete dias.

Ao final do sétimo dia, os animais foram sacrificados e o sangue coletado para realização de testes laboratoriais padronizados. A função hepática dos animais foi avaliada através da dosagem da atividade sérica das aminotransferases (TGO e TGP). A função renal através das dosagens de creatinina e uréia. As dosagens foram realizadas por automação no laboratório de Bioquímica do Hospital Universitário Walter Cantídio, utilizando “kits” específicos para cada substância.

Além disso, no final do tratamento, órgãos vitais (fígado, baço, rim e coração) foram pesados e o resultado das massas expresso por / 100g de animal. Foi realizado também leucograma dos animais.

2.5. Análise estatística

Na comparação dos grupos foi utilizada análise de variância (ANOVA) complementada com teste t de Bonferroni (comparações múltiplas) ou teste t de Student (comparação entre duas amostras) para amostras não pareadas. Para avaliação dos escores histopatológicos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para comparação de medianas. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de $P < 0.05$.

3. RESULTADOS

3.1. A FNDL de *Calotropis procera* reduz o influxo de neutrófilos na artrite induzida por Zy em ratos

A figura 3 ilustra a ação da FNDL administrada e.v. 30 min e 2h após a indução da artrite por Zy na migração celular, analisada no fluido articular coletado após 6h de aplicação do Zy, com redução significativa e máxima já na dose de 3mg/Kg ($p < 0.05$) em comparação ao grupo que recebeu apenas salina endovenosa. O efeito persiste nas demais doses testadas, de 5 a 100mg/Kg.

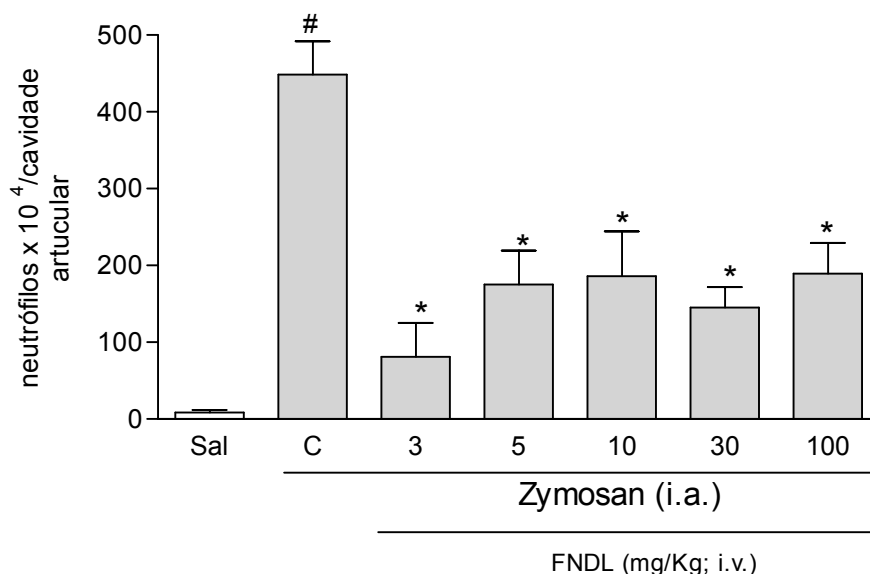


Figura 4 - Efeito do tratamento com FNDL sobre o influxo de neutrófilos à cavidade articular de ratos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy). Ratos Wistar receberam uma injeção intra-articular de zymosan (1mg) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após 6h da indução da AZy. FNDL (3, 5, 10, 30 e 100mg/Kg) foi administrada via endovenosa por veia peniana, em cada grupo de 6 animais, 30 minutos antes e 2h após a AZy. A contagem total e diferencial de células foi realizada no lavado articular. O grupo controle AZy (C) representa os animais que receberam Zy i.a. e salina e.v. e o grupo (Sal) os animais que receberam salina i.a. As barras representam a média \pm EPM do número de neutrófilos x 10⁴/cavidade de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ representa a significância estatística em relação ao grupo C e # $p < 0,05$ em relação ao sal. (ANOVA- Teste de Bonferroni)

3.2. A FNDL de *Calotropis procera* reduz o tempo de suspensão da pata na artrite induzida por Zy em ratos.

A FNDL, como ilustrado na figura 4, mostrou-se efetiva em reduzir significativamente ($p < 0.05$) o TSP no período de observação de 4h após a injeção intra-articular de Zy em todas as doses testadas.

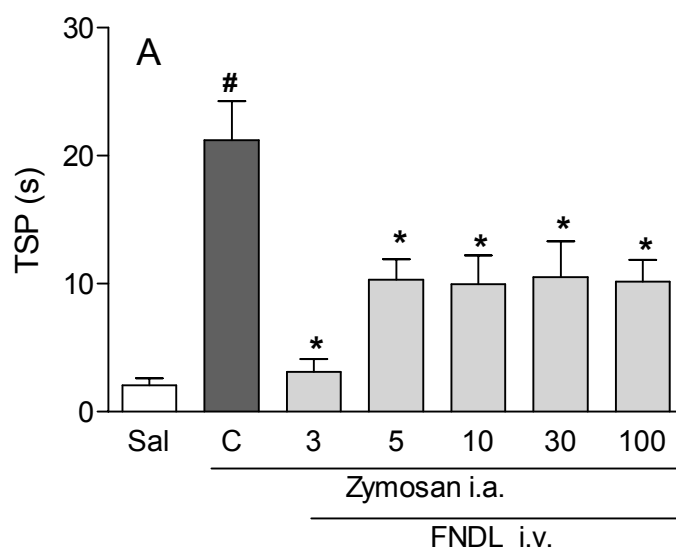


Figura 5 - Efeito do tratamento com FNDL sobre o tempo de suspensão da pata (TSP) de ratos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy). Ratos Wistar receberam uma injeção intra-articular de zymosan (1mg) no joelho direito, sendo submetidos a caminhar em uma roda de avaliação de incapacitação articular por 1 minuto, na quarta hora após a indução da AZy. FNDL (3, 5, 10,30 e 100mg/Kg) foi administrada via endovenosa por veia peniana, em cada grupo de 6 animais, 30 minutos antes e 2h após a AZy. O grupo controle AZy (C) representa os animais que receberam Zy i.a. e salina e.v. e o grupo (Sal) os animais que receberam salina i.a. As barras representam a média do TPS em segundos \pm EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ representa a significância estatística em relação ao grupo C e # $p < 0,05$ em relação ao sal. (ANOVA- Teste de Bonferroni)

Na dose de 3mg/Kg a FNDL reduziu significativamente o TSP em todos os períodos de observação, da segunda à quinta hora. (Figura 5)

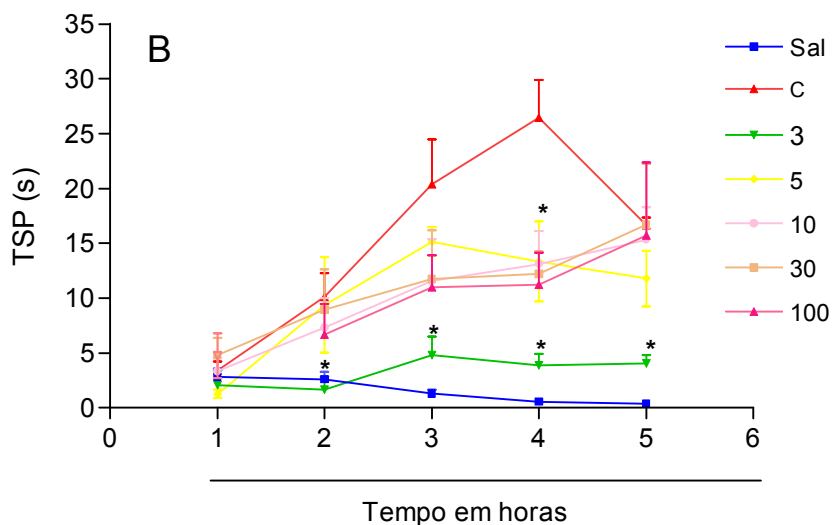


Figura 6 – Curso temporal do tratamento com FNDL sobre o tempo de suspensão da pata (TSP) de ratos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy). Ratos Wistar receberam uma injeção intra-articular de zymosan (1mg) no joelho direito, sendo submetidos a caminhar em uma roda de avaliação de incapacitação articular por 1 minuto, a cada hora, até a quinta hora após a indução da AZy. FNDL (3, 5, 10,30 e 100mg/Kg) foi administrada via endovenosa por veia peniana, em cada grupo de 6 animais, 30 minutos antes e 2h após a AZy. O grupo controle AZy (C) representa os animais que receberam Zy i.a. e salina e.v. e o grupo (Sal) os animais que receberam salina i.a. Os dados representam a média do TPS em segundos \pm EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ representa a significância estatística em relação ao grupo C. (ANOVA - Teste de Bonferroni)

3.3. A FNDL de *Calotropis procera* reduz a atividade da ADA na artrite induzida por Zy em ratos.

A figura 6 mostra o efeito da FNDL aplicada via endovenosa sobre a atividade da adenosina desaminase no fluido sinovial, após 6h da injeção intra-articular do Zy, observando-se uma redução significativa em todas as doses testadas ($p < 0.05$), quando comparado ao grupo tratado apenas com salina endovenosa.

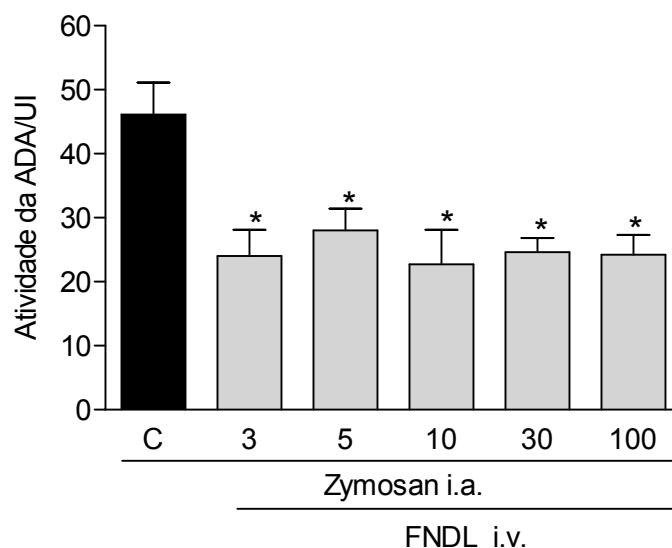


Figura 7 - Efeito do tratamento com FNDL sobre a atividade da ADA na cavidade articular de ratos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy). Ratos Wistar receberam uma injeção intra-articular de zymosan (1mg) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após 6h da indução da AZy. FNDL (3, 5, 10, 30 e 100mg/Kg) foi administrada via endovenosa por veia peniana, em cada grupo de 6 animais, 30 minutos antes e 2h após a AZy. O grupo controle AZy (C) representa os animais que receberam Zy i.a. e salina e.v. As barras representam a média \pm EPM da atividade da ADA no lavado articular em U/L de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ representa a significância estatística em relação ao grupo controle (ANOVA/Bonferroni).

3.4. A FNDL de *Calotropis procera* reduz a permeabilidade vascular na artrite induzida por Zy em ratos.

O extravasamento de Azul de Evans na cavidade articular induzido por zymosan foi inibido significativamente ($p < 0.05$) pela FNDL, na dose de 3mg/kg, como ilustrado na figura 7.

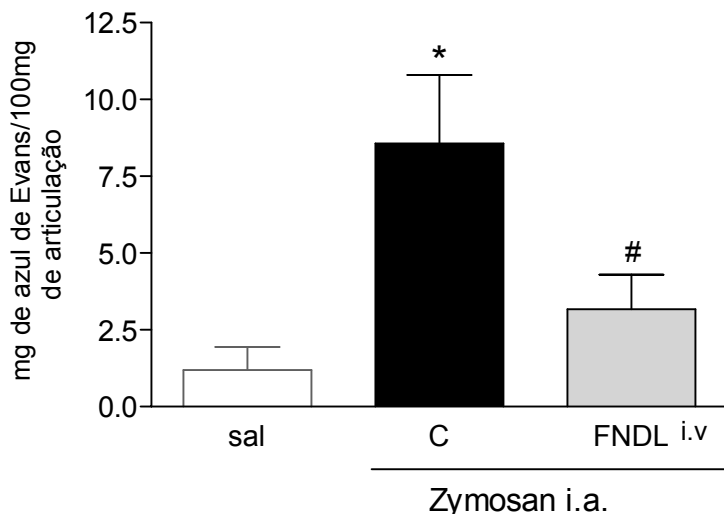


Figura 8 - Efeito do tratamento com FNDL sobre a permeabilidade vascular em ratos submetidos à indução de artrite por zymosan (AZy). Ratos Wistar receberam uma injeção intra-articular de zymosan (1mg) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após 6h da indução da AZy. FNDL (3 mg/kg) foi administrado via endovenosa por veia peniana, em um grupo de 6 animais, 30 minutos antes e 2h após a AZy. Azul de Evans (AE), 25mg/kg diluído em salina, foi administrado via endovenosa a todos os grupos 30 min antes do sacrifício. A articulação foi extraída e incubada em formamida por 12h/56°C. A absorbância do sobrenadante foi medida por espectrofotometria a 630nm e comparada a uma curva padrão de AE. O grupo controle AZy (C) representa os animais que receberam Zy i.a. e salina e.v. e o grupo (Sal) os animais que receberam salina i.a. As barras representam a média \pm EPM de AE extravasado em mg/100mg de articulação de 6 animais por grupo. # $p < 0,05$ representa a significância estatística em relação ao grupo C e * $p < 0,05$ em relação ao sal. (ANOVA - Teste de Bonferroni)

3.5. A FNDL de *Calotropis procera* reduz o nível de TNF - α na artrite induzida por Zy em ratos.

A FNDL, na dose antiinflamatória mais baixa efetiva, 3mg/Kg, reduziu significativamente ($p < 0.05$) os níveis de TNF - α no lavado articular dos animais com artrite induzida por Zy, após 6h da indução (Figura 8).

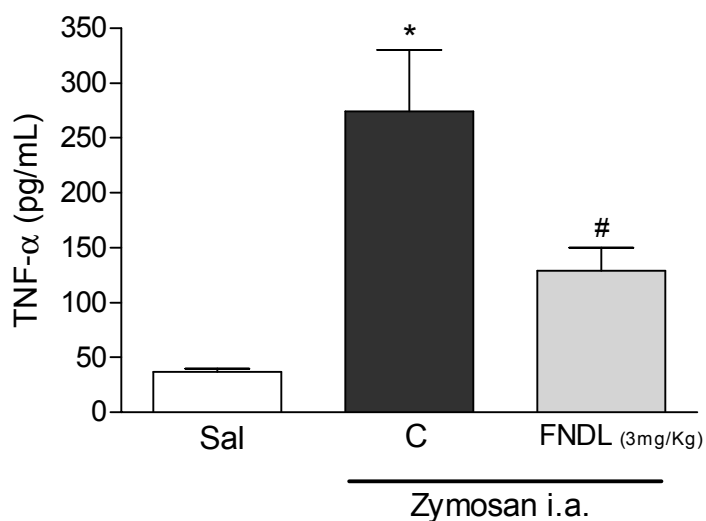


Figura 9 - Efeito do tratamento com FNDL sobre os níveis de TNF - α na cavidade articular de ratos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy). Ratos Wistar receberam uma injeção intra-articular de zymosan (1mg) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após 6h da indução da AZy. FNDL (3 mg/Kg) foi administrada via endovenosa por veia peniana, em um grupo de 6 animais, 30 minutos antes e 2h após a AZy. Os níveis de TNF - α no lavado articular foram expressos em pg/mL. O grupo controle AZy (C) representa os animais que receberam Zy i.a. e salina e.v. e o grupo (Sal) os animais que receberam salina i.a. As barras representam a média \pm EPM dos níveis de TNF - α em pg/mL no lavado articular de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ representa a significância estatística em relação ao grupo controle (ANOVA/Bonferroni).

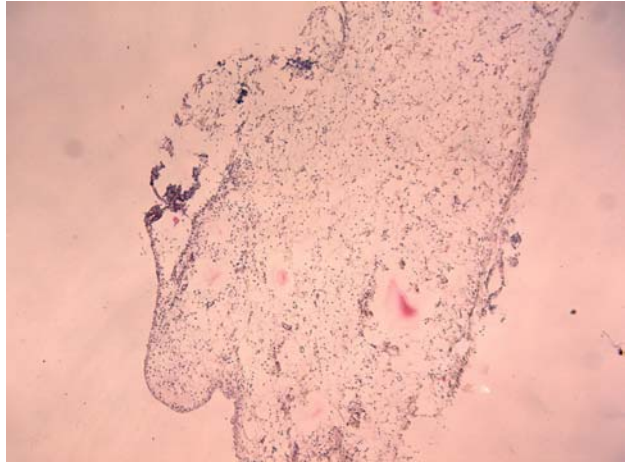
3.6. A FNDL de *Calotropis procera* melhora os escores da avaliação histopatológica na artrite por Zy em ratos.

A FNDL induziu uma redução do edema e do infiltrado inflamatório, diminuição do espessamento sinovial e preservação da arquitetura, como mostrado nas figuras 9 e 10.

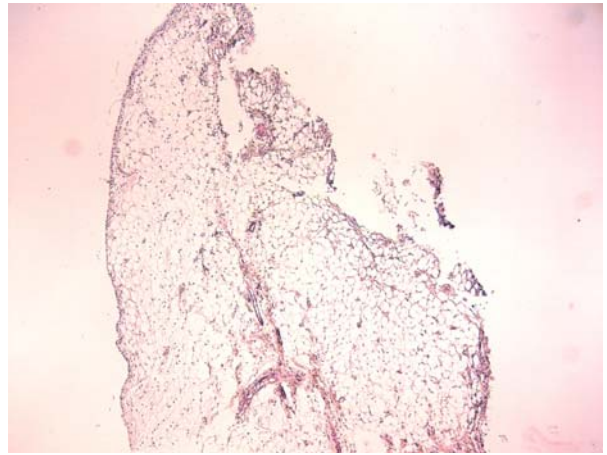
GRUPOS	Avaliação microscópica
salina	2,5 (3-1)
FNDL 10	*1 (2-1)
FNDL 30	*1 (1-1)
FNDL 100	*1 (2-1)

Figura 10 - Efeito do tratamento com FNDL sobre o quadro histopatológico da articulação de ratos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy). Ratos Wistar receberam uma injeção intra-articular de zymosan (1mg) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após 6h da indução da AZy. FNDL (10,30 e 100mg/Kg) foi administrado via endovenosa por veia peniana, em cada grupo de 6 animais, 30 minutos antes e 2h após a AZy. Uma amostra da articulação do joelho foi extraída, armazenada em formol 10% por 24 h e depois em álcool a 70% e preparada para análise histopatológica. O grupo salina representa animais que receberam salina e.v. Os dados representam a mediana dos escores de 6 animais por grupo. *p<0,05 quando comparado ao grupo não tratado (ANOVA/Kruskal-Wallis).

Zymosan



FNDL 10mg/kg



FNDL 30mg/kg

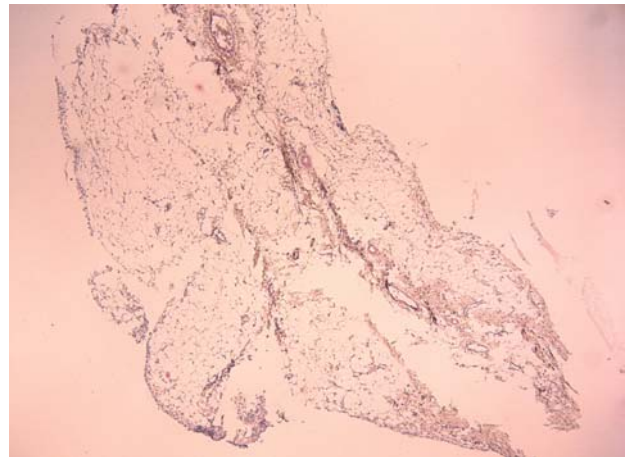


Figura 11 – Fotografias mostrando o aspecto da microscopia óptica em cortes histológicos corados pela técnica de hematoxilina-eosina do tecido sinovial comparando grupos tratados com FNDL (10 e 30mg/kg) e o grupo não tratado (zymosan) (aumento de 40X)

3.7. A FNDL de *Calotropis procera* reduz o influxo de neutrófilos na artrite induzida por mBSA em camundongos pré-imunizados.

Na artrite induzida por antígeno, a FNDL mostrou-se plenamente eficaz ($p < 0.05$) em inibir a migração de neutrófilos para a cavidade articular, após 24h do desafio com mBSA (Figura 11).

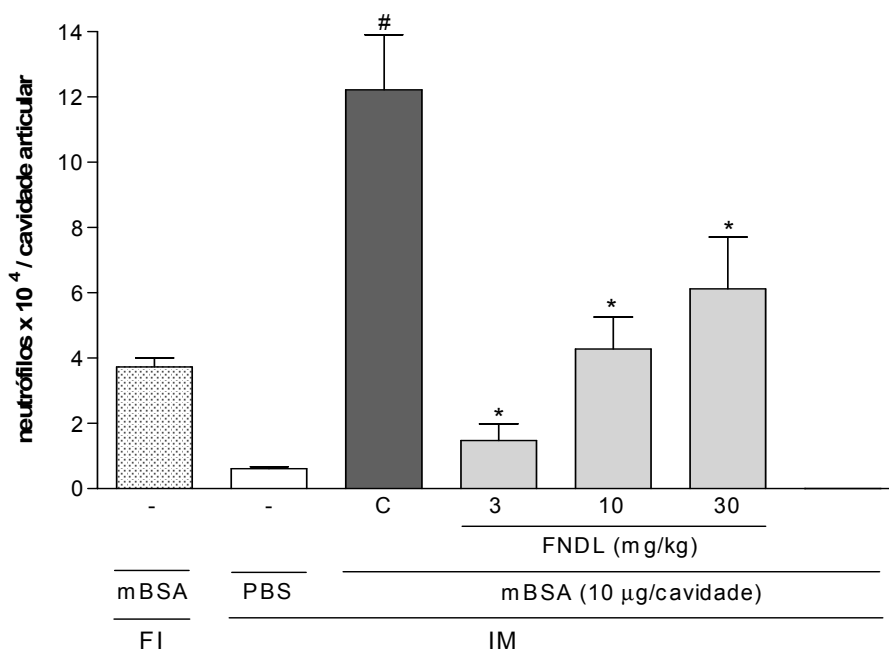


Figura 12 - Efeito do tratamento com FNDL sobre o influxo de neutrófilos à cavidade articular de camundongos submetidos à indução da artrite por antígeno (mBSA) - AIA. Camundongos Balb/c foram imunizados via s.c., com uma emulsão contendo 200 µL de volumes iguais de PBS e adjuvante completo de Freund (ACF), na qual estava dissolvida 500 µg de mBSA, com reforço no 7º e 14º dias, sendo desafiados no 21º dia com mBSA 10µg i.a. no joelho e sacrificados, sob anestesia, após 24h do desafio. FNDL (3, 10 e 30 mg/Kg) foi administrado via endovenosa, em cada grupo de 6 animais, 30 minutos antes e 6h após o desafio. A contagem total e diferencial de células foi realizada no lavado articular. O grupo FI corresponde aos animais falso-imunizados; o grupo PBS recebeu PBS i.a. no momento do desafio e o grupo C representa animais desafiados que receberam salina e.v. As barras representam a média ± EPM do número de neutrófilos x 10⁴/cavidade de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ representa a significância estatística em relação ao grupo C e # $p < 0,05$ em relação ao PBS. (ANOVA-Bonferroni)

3.8. A FNDL de *Calotropis procera* inibe a migração de neutrófilos na peritonite infecciosa em camundongos.

Na dose de 10 mg/kg, a FNDL inibiu significativamente ($p < 0.05$) o influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal em camundongos submetidos à peritonite por ligadura e punção cecal. (Figura 12)

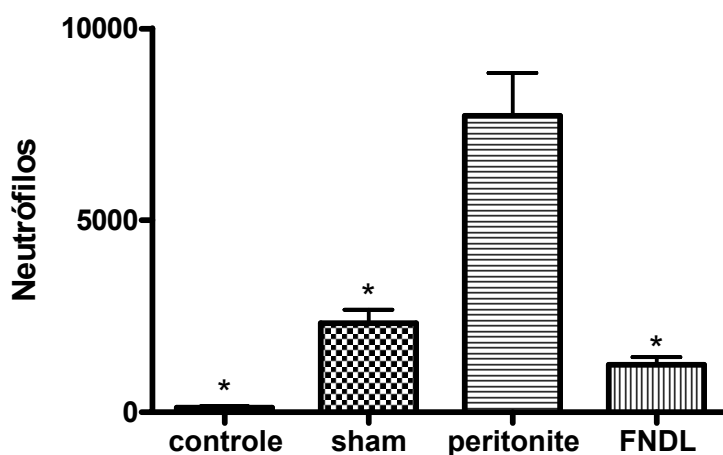


Figura 13 - Efeito do tratamento via endovenosa com FNDL sobre o influxo de neutrófilos à cavidade peritoneal de camundongos submetidos à indução de peritonite infecciosa. Camundongos Swiss foram submetidos a laparotomia exploradora com ligadura cecal e formação de bolsa de fezes, seguida de punção do ceco com agulha 21G, duas vezes. FNDL (10 mg/Kg) foi administrado via endovenosa, em cada grupo de 6 animais, logo após o término da cirurgia. A contagem total e diferencial de células foi realizada no lavado peritoneal. Os animais sham foram operados, mas sem ligadura e punção cecal. O grupo controle não sofreu qualquer intervenção cirúrgica. As barras representam a média ± EPM do número de células/mm³ de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não tratado (ANOVA/Bonferroni).

3.9. A FNDL de *Calotropis procera* reduz a atividade da ADA no lavado peritoneal na peritonite infecciosa em camundongos.

Na dose de 10 mg/kg, a FNDL reduziu significativamente ($p < 0.05$) a atividade da ADA no lavado peritoneal em camundongos submetidos à peritonite por ligadura e punção cecal. (Figura 13)

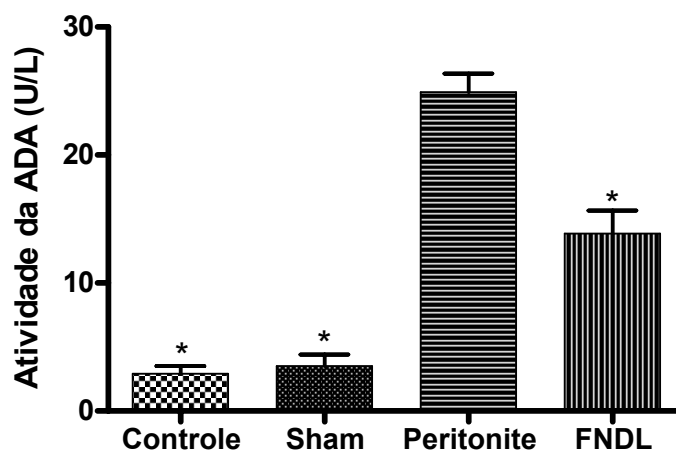


Figura 14 - Efeito do tratamento via endovenosa com FNDL sobre a atividade da ADA na cavidade peritoneal de camundongos submetidos à indução de peritonite infecciosa. Camundongos Swiss foram submetidos a laparotomia exploradora com ligadura cecal e formação de bolsa de fezes, seguida de punção do ceco com agulha 21G, duas vezes. FNDL (10 mg/Kg) foi administrado via endovenosa, em cada grupo de 6 animais, logo após o término da cirurgia. A dosagem de ADA foi expressa em U/L no lavado peritoneal. Os animais sham foram operados, mas sem ligadura e punção cecal. O grupo controle não sofreu qualquer intervenção cirúrgica. Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não tratado (ANOVA/Bonferroni).

3.10. A FNDL de *Calotropis procera* não apresenta parâmetros laboratoriais de toxicidade na dose de 10 mg/kg.

Na dose de 10mg/kg, a FNDL não altera significativamente os parâmetros de função renal (creatinina e uréia) e de integridade hepática, expressa pelas aminotransferases. Também não houve alteração importante no leucograma ou no peso de órgãos selecionados. (figuras 14, 15, 16 e 17)

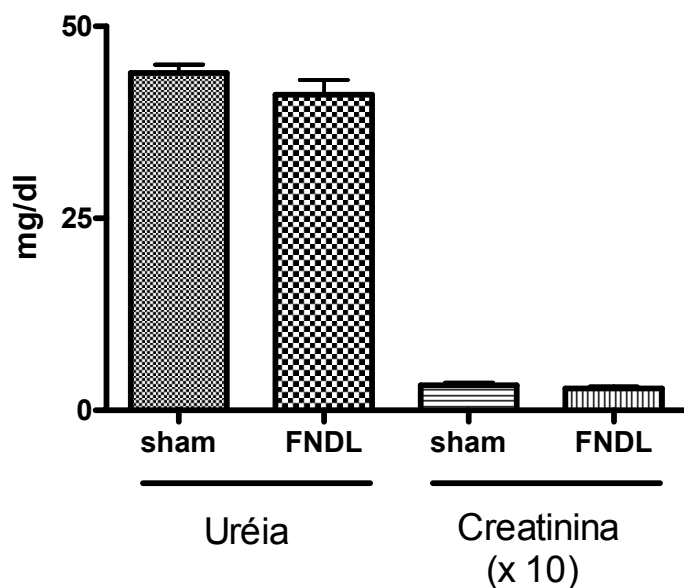


Figura 15 - Efeito da aplicação via endovenosa de FNDL por sete dias sobre a função renal. Ratos Wistar foram submetidos a aplicações diárias de FNDL e.v. via peniana (10mg/kg) em volume de 100 μ L., por sete dias. No sétimo dia os animais foram sacrificados e o sangue colhido para dosagem padronizada de uréia e creatinina. Os valores foram expressos em mg/dL para a uréia e mg/dL X 10 para creatinina. O grupo sham recebeu apenas 100 μ L de salina e.v. diariamente por sete dias. Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não tratado (ANOVA/Bonferroni).

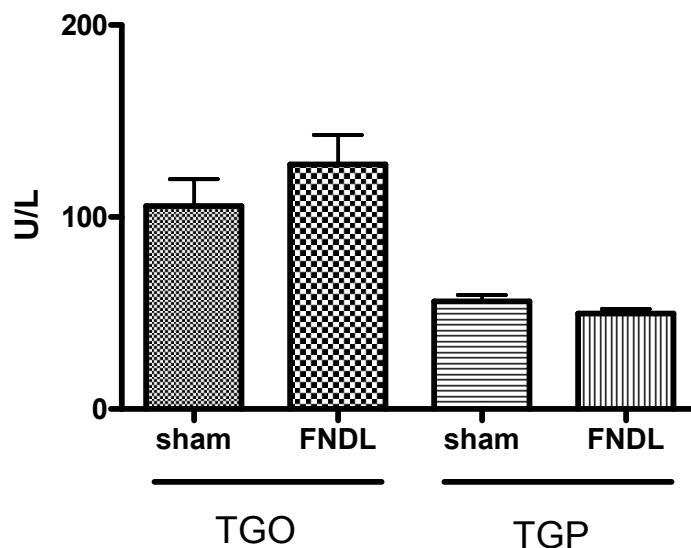


Figura 16 - Efeito da aplicação via endovenosa de FNDL por sete dias sobre as transaminases hepáticas. Ratos Wistar foram submetidos a aplicações diárias de FNDL e.v. via peniana (10mg/kg) em volume de 100 μ L., por sete dias. No sétimo dia os animais foram sacrificados e o sangue colhido para dosagem padronizada de TGO e TGP. Os valores foram expressos em U/L. O grupo sham recebeu apenas 100 μ L de salina e.v. diariamente por sete dias. Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não tratado (ANOVA/Bonferroni).

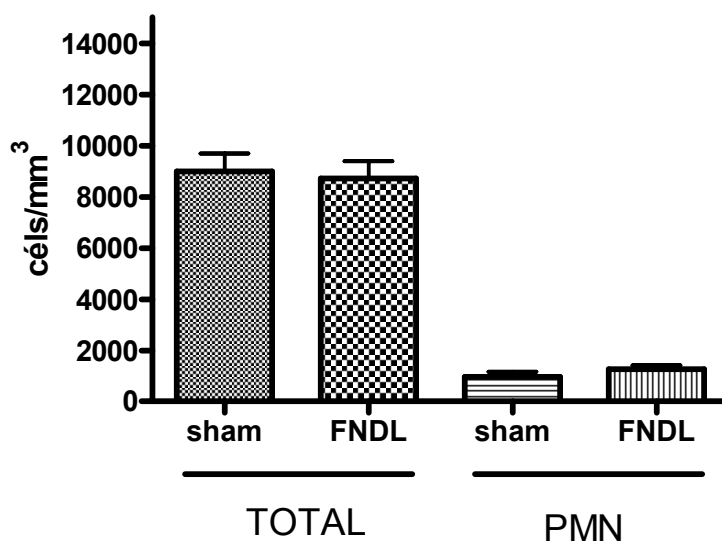


Figura 17 - Efeito da aplicação via endovenosa de FNDL por sete dias sobre o leucograma. Ratos Wistar foram submetidos a aplicações diárias de FNDL e.v. via peniana (10mg/kg) em volume de 100 μ L., por sete dias. No sétimo dia os animais foram sacrificados e o sangue colhido para contagem total e diferencial de células. Os valores foram expressos em células/mm³. O grupo sham recebeu apenas 100 μ L de salina e.v. diariamente por sete dias. Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não tratado (ANOVA/Bonferroni).

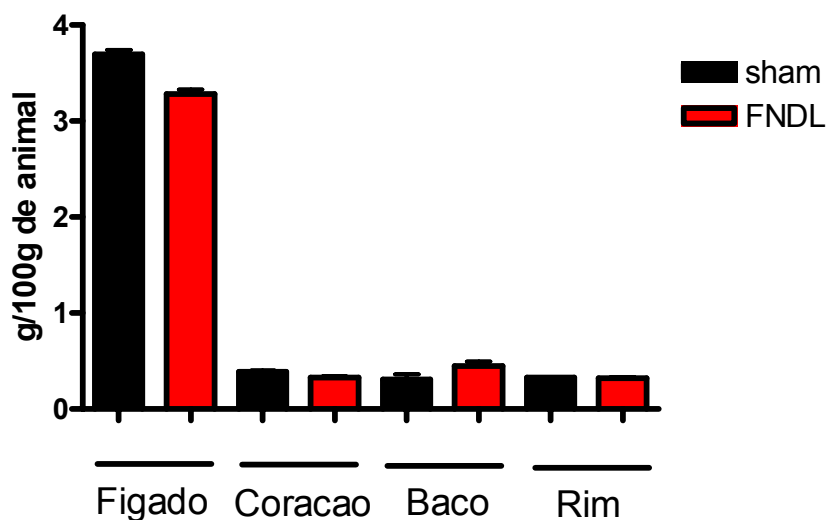


Figura 18 - Efeito da aplicação via endovenosa de FNDL por sete dias sobre o peso fresco dos órgãos. Ratos Wistar foram submetidos a aplicações diárias de FNDL e.v. via peniana (10mg/kg) em volume de 100 μ L., por sete dias. No sétimo dia os animais foram sacrificados e extraídos fígado, baço, rins e coração para pesagem. Os valores foram expressos g/100g de peso do animal. O grupo sham recebeu apenas 100 μ L de salina e.v. diariamente por sete dias. Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não tratado (ANOVA/Bonferroni).

4. DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido com o intuito de investigar a ação de uma fração não dialisável do látex de *Calotropis procera* sobre modelos de artrite experimental e peritonite infecciosa. Tal iniciativa partiu do conhecimento prévio da efetividade dessa fração em outros modelos experimentais de inflamação (Alencar et al., 2004 e 2006) e do interesse de buscar alternativas terapêuticas para enfermidades que envolvem a resposta inflamatória, particularmente a artrite reumatóide. É importante ressaltar que a planta *Calotropis procera* é comum e disponível na flora brasileira, sobretudo nordestina.

De fato, a artrite reumatóide é uma das doenças reumáticas mais comuns e das que mais acarreta morbidade e incapacidade funcional, por conta da sua cronicidade e difícil tratamento. Hoje, o arsenal de drogas empregado em sua terapêutica baseia-se em antiinflamatórios gerais, como os DAINES e corticóides, principalmente para alívio dos sintomas e as chamadas drogas anti-reumáticas modificadoras da AR (DARMD), que realmente causam algum impacto sobre a evolução da doença. Dentre estas destacam-se o metotrexate, um fármaco cuja atividade antiinflamatória e imunomoduladora deve-se sobretudo a sua ação sobre a maior disponibilização de adenosina (Chan & Cronstein, 2002), e os inibidores do TNF - α , como o infliximab e o etanercept. (Maini et al., 1999; Weinblatt et al., 1999), extremamente caros. Contudo, nenhuma delas está isenta de efeitos colaterais, que contribuem para a morbidade da doença. Também não representam ainda uma solução definitiva, tendo em vista a etiopatogenia complexa da AR.

Dessa forma, é interessante a perspectiva de novos agentes menos dispendiosos e tóxicos no tratamento da AR, nos despertando para o látex de *C. procera*, cuja fração não dialisável (FNDL), isolada por nossos colaboradores, apresenta propriedades antiinflamatórias já constatadas pelo nosso grupo (Alencar et al., 2004).

O isolamento dessa fração mostrou ser fundamental, tendo em vista a toxicidade do componente poliisopreno, a borracha, do látex seco. Além disso,

facilita a busca específica por moléculas constituintes que sejam responsáveis pela atividade biológica encontrada.

A partir de procedimentos simples de centrifugação e diálise, dispomos de duas frações razoavelmente livres desse constituinte, as quais denominamos fração dialisável (FDL) e fração não dialisável (FNDL), além da fração da borracha (RL) (Alencar et al., 2006; Freitas, 2006).

A FNDL, obtida após diálise contra água e centrifugação é constituída de proteínas com diversas massas moleculares, variando de 10-95 kDa, prevalecendo as de aproximadamente 25-30 kDa, com um teor médio de 8,18 mg/ml e após liofilização 71,33 % de proteínas solúveis. Esta riqueza protéica foi determinada a partir de eletroforese em gel de poliacrilamida e espectrometria de massa por nossos colaboradores (Alencar et al., 2006), além da comprovação de diversas atividades enzimáticas (Freitas, 2006).

Os modelos utilizados são provavelmente os que melhor mimetizam experimentalmente o eventos característicos da AR, sendo de fácil reprodutibilidade, aspectos inflamatórios importantes envolvidos, como a migração celular, permeabilidade vascular e dor inflamatória.

Com efeito, demonstramos inequivocamente que a FNDL foi capaz de inibir a migração celular, notadamente de neutrófilos, que são as principais células recrutadas para o sítio inflamatório nessa fase aguda, após 6 horas de indução da artrite por zymosan em todas as doses utilizadas e na artrite por mBSA, após 24h de indução, na dose de 3mg/kg.

A importância desse resultado nos remete ao fato de que nos estágios iniciais de diversos processos inflamatórios, a célula predominante e primeiramente recrutada ao foco inflamatório é o neutrófilo (Kubes, 1993; Rossi & Hellewell; 1994). A migração dos neutrófilos das vênulas pós-capilares até a área lesada é um processo multimediado, resultante da liberação por células residentes de fatores quimiotáticos, tais como TNF- α , IL-1- β , PAF, LTB₄ e diversas quimiocinas (Munder et al., 1993; Binder et al., 1999; Lee et al., 2002). A liberação destes fatores leva a um aumento nas interações entre os neutrófilos e as células endoteliais com conseqüente recrutamento destes leucócitos. Este leucócito polimorfonuclear é

responsável pela liberação de metabólitos tóxicos do oxigênio, nitrogênio, proteases e óxido nítrico, os quais, além de serem essenciais para a defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores, também podem causar danos ao próprio tecido do hospedeiro, adjacente ao local inflamado. Neste sentido, a artrite reumatóide, uma doença inflamatória de origem imune, é caracterizada pela presença excessiva de neutrófilos no fluido sinovial das articulações afetadas (Harris, 1990; Firestein, 2003), sugerindo que parte do dano tecidual observado seja consequência da liberação de substâncias tóxicas por neutrófilos emigrados. Ademais, durante recidivas da artrite reumatóide ocorre um novo influxo de neutrófilos. O recrutamento de neutrófilos para o fluido sinovial ocorre como resultado da produção de mediadores quimiotáticos por macrófagos ativados, fibroblastos sinoviais e outras células na articulação inflamada (ver adiante).

Em recente estudo (Soares et al., 2005), a FNDL inibiu, de maneira dose dependente, as contorções abdominais em camundongos induzidas por ácido acético e principalmente a segunda fase do teste da formalina, sugerindo que a sua atividade antinociceptiva é essencialmente de caráter antiinflamatório. Além disso, observou que a fração atua independente do sistema opióide, já que o naloxone não reverteu o efeito.

No presente estudo, evidenciamos também o efeito protetor da FNDL sobre a dor inflamatória, expresso pela redução da incapacidade articular no tempo de suspensão da pata, com pico de ação às 4h após a indução da artrite por Zy. Curiosamente, em baixas doses (3mg/kg), a FNDL reduziu significativamente o TSP em todos os períodos de observação. Esses dados corroboram a atividade antinociceptiva da FNDL

A FNDL também inibiu significativamente o extravasamento de Azul de Evans para a cavidade articular na artrite induzida por zymosan, na dose de 3mg/kg. Em 2004, Alencar et al. mostraram que a FNDL inibia o edema de pata induzido por carragenina, mas não o por dextran. Ou seja, a FNDL deve inibir o aumento da permeabilidade vascular mediada por células, já que o edema da carragenina é dependente das células que migram para o sítio inflamatório, diferentemente do dextran.

Esses eventos são considerados gerais, sendo decorrentes de diversos mecanismos e mediadores inflamatórios, sendo difícil especificar por qual deles estaria atuando a FNDL neste caso. Contudo, são reconhecidos alguns mediadores comumente envolvidos em todas estas situações, destacando-se os produtos da degradação do ácido araquidônico e as citocinas. Frequentemente, as cascatas enzimáticas, produção e desgranulação e outros processos que disponibilizam estes mediadores são intercambiáveis e se retroalimentam. Por exemplo, um estímulo pode desencadear a liberação de histamina e em seguida envolver prostaglandinas ou aumento de citocinas. (Rang & Dale, 2003)

Dentre as citocinas mais implicadas e considerada peça chave no desencadeamento de eventos inflamatórios destaca-se o TNF - α , como descrito anteriormente (Aggarwal e Natarajan, 1996; Taylor e cols., 2004). Vale relembrar sua importância na fisiopatogenia da AR, sendo crítico seu papel no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório (Canetti et al., 2001; Saunders et al., 2005), tanto que as drogas neutralizadoras do TNF - α são a última geração de fármacos em desenvolvimento para o tratamento da doença. (Maini et al., 1999; Fleischmann e Shealy, 2003).

O TNF - α também é mediador na disfunção da barreira endotelial e, portanto no aumento da permeabilidade vascular (Neumann et al., 2005).

Além disso, sua ação como mediador hiperalgésico merece destaque, a partir da sua liberação por macrófagos residentes (Ferreira et al., 1988, Cunha et al., 1992), agindo indiretamente pelo estímulo a liberação de eicosanóides e simpaticomiméticos. A ação do TNF - α foi comprovada pela inibição da nocicepção pela talidomida em diversos modelos experimentais, inclusive na artrite induzida por zymosan (Vale, 2003).

Dessa forma, observamos ainda que a FNDL reduziu significativamente os níveis de TNF - α no lavado articular da AZy. Essa ação, se diretamente relacionada, poderia explicar todas as outras, já que a redução do TNF - α acarretaria também em inibição da migração celular, da permeabilidade vascular e da dor inflamatória.

Outra ação interessante da FNDL neste estudo foi a redução nos níveis de adenosina desaminase no fluido sinovial da artrite induzida por zymosan. A redução da atividade da ADA proporciona uma maior disponibilidade de adenosina, o seu principal substrato (Cronstein et al., 1995).

A adenosina, como já descrito, é importante agente antiinflamatório, devido sua potente ação supressora em virtualmente todas as células do sistema imunológico (Hasko & Cronstein, 2004). Atua em quatro receptores ligados a proteína G reconhecidos até o momento, sendo os subtipos A_2 os mais implicados na modulação da inflamação. Já foi estabelecido que a adenosina inibe a produção de ânion superóxido, desgranulação e adesão de neutrófilos (Firestein et al, 1995; Bouma et al., 1996; Hasko & Cronstein, 2004), liberação de citocinas pró inflamatórias (Bouma et al., 1996; Parmely et al, 1993), síntese de LTB₄ (Krump et al, 1996), liberação de histamina pelos basófilos (Marone et al, 1979) e na inibição da liberação de TNF – α por macrófagos (Kreckler et al., 2006).

Curiosamente, o metotrexate, principal droga antiinflamatória modificadora da doença (DMARD) utilizada no tratamento da AR, desempenha sua função justamente pela ação da adenosina, por conta de uma inibição indireta da ADA (Chan & Cronstein, 2002). O MTX foi desenvolvido inicialmente como antagonista específico do folato, detendo assim características anti-proliferativas, de inibição da síntese de purinas e pirimidinas, que poderiam ser aproveitadas na AR, passando a ser administrado em baixas doses com excelentes efeitos antiinflamatórios já bem caracterizados sobre neutrófilos e macrófagos, os quais se acredita desempenharem papel central na fisiopatologia da AR e sinovite inflamatória (Cronstein et al., 1991; Cronstein, 1997; Genestier et al., 1998; Hu et al., 1988). Contudo a reposição de ácido fólico melhora os efeitos colaterais sem interferir na ação do MTX, indicando, portanto, que a sua atividade antiinflamatória não está relacionada à sua característica anti-proliferativa primordial (Ortiz et al., 2000, Shiroky, 1997).

A hipótese mais investigada e aceita até o momento é que o MTX em baixas doses é capaz ainda de aumentar a expressão da enzima AICAR, passo importante no ciclo do folato, a qual reduz a atividade da ADA, o que promove o aumento da adenosina (Chan & Cronstein, 2002). A piora na resposta clínica de pacientes com

AR em uso de cafeína, um antagonista não-seletivo dos receptores de adenosina, reforça esta hipótese (Silke et al., 2001). Em 1993, Cronstein et al. mostraram que um antagonista específico do receptor A_{2A} , como também a administração de ADA, revertia os efeitos antiinflamatórios do MTX em um modelo de inflamação induzido por carragenina.

A semelhança entre a FNDL e o MTX não consiste apenas na redução dos níveis de ADA, mas também é notável que ambas atuem com grande efetividade em baixas doses. De fato, a dose mais baixa utilizada de FNDL, 3mg/kg foi a única capaz de reduzir o TSP da segunda à quinta hora na AZy, enquanto as outras doses só o fizeram na quarta hora. No IC houve a mesma tendência, apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa entre as doses, na AZy. Tanto foi a sua eficácia que a dose de 3mg/kg foi escolhida como inicial na avaliação da permeabilidade vascular e no impacto sobre o quadro histopatológico na AZy, como também no estudo do IC na AIA, mostrando-se mais uma vez efetiva.

É importante ressaltar que uma das ações mais importantes da adenosina é inibição na secreção de TNF- α (Kreckler et al., 2006), a partir de uma ação preferencial sobre os receptores A_2 , o qual aumenta o AMPc intracelular.

Ora, é inevitável então correlacionar a ação da FNDL com uma inibição da ADA e conseqüentemente aumento da adenosina, já que isto explicaria todos os resultados encontrados até então comentados. Porém, essa relação seria direta, como no caso do MTX?

O mecanismo de ação da FNDL ainda não foi elucidado. Contudo algumas hipóteses já foram lançadas.

Em recente estudo de 2006, Alencar et al. testaram o efeito da fração dialisável (FDL) e não dialisável (FNDL) do látex de *C. procera*, constatando que a FDL apresentava uma ação pró-inflamatória ao induzir migração celular para cavidade peritoneal após injeção i.p. Essa atividade era revertida pela talidomida (inibidor de TNF - α), meclizina (antagonista específico da histamina) e por glicocorticóides (dexametasona), como também pela FNDL, mas não por inibidores da COX (indometacina e celecoxib). Dessa forma, foi proposto que a atividade inflamatória da FDL poderia estar relacionada a um aumento na produção de

histamina, como já havia sido suscitado por Shivkar e Kumar (2003), de TNF – α , ou de produtos da degradação do ácido araquidônico não relativos à via da cicloxigenase. Por conseqüência, é de se esperar que a ação antiinflamatória da FNDL esteja também relacionada a algum desses mecanismos ou outros que ainda não tinham sido avaliados.

Pelo que foi exposto acima, os resultados nos encorajam a sugerir e prosseguir investigação quanto a um possível mecanismo de ação da FNDL relacionado a uma inibição da síntese de TNF – α , direta ou indiretamente, como já havia sido suscitado, ou por meio de um mecanismo originalmente aqui proposto, por meio de inibição da ADA e liberação de adenosina, cuja via mais conhecida até o momento é aquela associada ao MTX.

De qualquer forma, o simples fato da FNDL inibir os principais eventos inflamatórios da AR e o principal mediador implicado, o TNF – α , além de reduzir a atividade da ADA, à semelhança do MTX, tornam a droga especialmente interessante como ferramenta terapêutica no manejo da AR, demandando novos experimentos relacionados à artrite.

Outro resultado importante da FNDL digno de nota foi a melhora no quadro histopatológico na sinovite por zymosan, expresso por menor infiltrado inflamatório e edema, redução do espessamento sinovial, preservando a arquitetura do tecido. Esta ação demonstra um caráter protetor da articulação, contudo podendo ser explicado simplesmente pela inibição da inflamação. Seria interessante avaliar, a posteriori, se a FNDL desempenharia um papel protetor a longo prazo, em um experimento crônico, o que melhor a caracterizaria como uma droga modificadora da evolução da sinovite.

A FNDL mostrou-se efetiva também em reduzir o influxo de neutrófilos para cavidade abdominal na peritonite infecciosa em camundongos, bem como os níveis de ADA no fluido peritoneal, mais uma vez comprovando seu efeito antiinflamatório em outro modelo experimental.

No caso da peritonite infecciosa por ligadura e punção cecal, outra via de estímulo inflamatório que deve ser lembrada é a do LPS, tendo em vista tratar-se de

uma infecção polimicrobiana com envolvimento de bactérias Gram negativas que liberam LPS. Este ativa macrófagos, neutrófilos e células endoteliais através do receptor TLR-4 (Ingalls et al., 1999), favorecendo a produção de citocinas como o TNF – α e IL-1 β . Novamente, como na artrite, as citocinas, notadamente o TNF – α , orquestram os demais eventos inflamatórios, como a migração celular, a dor inflamatória e o aumento da permeabilidade vascular.

Infelizmente este modelo de peritonite não pôde ser plenamente aproveitado até agora, tendo em vista a dificuldade de técnica do modelo em camundongos, principalmente no que diz respeito ao procedimento anestésico durante o ato cirúrgico. Dessa forma, obtivemos poucos resultados fidedignos, apenas com a dose de 10mg/kg.

A maioria dos estudos de inflamação com látex de outras plantas na literatura geralmente mostram atividade pró-inflamatória (Gupta et al., 1994), sendo poucos os relatos de ação antiinflamatória, constituindo outro aspecto relevante deste trabalho.

Diante da comprovação do efeito antiinflamatório da FNDL nestes modelos de artrite e peritonite infecciosa, por mecanismos que precisam ainda ser mais profundamente investigados, resta também saber qual componente desta fração seria o responsável por essa atividade.

Considerando que a FNDL é rica em proteínas solúveis e desprovida de borracha e pequenos metabólitos, é sugestivo que as moléculas envolvidas sejam de natureza protéica. Essa hipótese já havia sido suscitada por Alencar et al. (2004), já que a atividade antiinflamatória sobre a cistite hemorrágica, edema de pata e peritonite induzidas por carragenina foi abolida pelo aquecimento da amostra.

O fato de aparentemente ser mais efetiva em baixas doses é intrigante e consiste em outro indicador favorável a uma proteína. Para exercer uma atividade biológica, a partir de uma ligação a um alvo, como um receptor celular, as proteínas necessitam atuar em estado solúvel. Sendo assim, como a quantidade de volume administrado de FNDL diluído em salina neste estudo foi constante, doses mais baixas proporcionam boa solubilidade enquanto doses maiores acarretam em saturação da solução.

Novos procedimentos de fracionamento, como a cromatografia, nos proporcionarão a possibilidade de limitar e caracterizar melhor a molécula responsável pelo efeito antiinflamatório da FNDL

Por fim, observamos ainda que na dose de 10 mg/kg, administrada diariamente por uma semana, a FNDL não incitou alterações significativas no leucograma, na função renal, na integridade hepática e no peso de órgãos selecionados. Isso sugere que, nesta dose, a FNDL é uma droga segura, não apresentando parâmetros de toxicidade. Isto vem a fortalecer a idéia de que a toxicidade do látex de *Calotropis procera* está relacionada à borracha ou a moléculas de baixo peso molecular, como aventado em estudo de 2007 (Ramos et al).

5. CONCLUSÕES

- A Fração Não-Dialisável do Látex de *Calotropis procera* (FNDL) inibiu a migração celular nos modelos experimentais de artrite (AZy e AIA) e peritonite infecciosa;
- A FNDL apresenta atividade antinociceptiva no modelo de artrite por zymosan;
- A FNDL inibiu o aumento da permeabilidade vascular na AZy;
- A FNDL reduziu os níveis de TNF α na AZy;
- A FNDL reduziu os níveis de ADA na AZy e PI;
- A FNDL induziu melhora no quadro histopatológico da AZy;
- A FNDL apresenta atividade antiinflamatória nos modelos AZy, AIA e PI;
- Essa atividade está relacionada, direta ou indiretamente, a um antagonismo ao TNF α e, possivelmente, a um aumento dos níveis de adenosina no sítio inflamatório;
- O componente da FNDL responsável pelos seus efeitos antiinflamatórios é de provável natureza protéica;
- Em doses farmacológicas em ratos, a FNDL não apresentou sinais de toxicidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, K.I. & JOSHI, P.N. Studies on proteinases from *Calotropis gigantean* latex. Purification and some properties of two proteinases containing carbohydrates.

Biochim.Biophys. Acta, **568**: 111-119, 1979.

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

AJUEBOR, M.N.; FLOWER, R.J.; HANNON, R.. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. **J. Leukoc. Biol.**, **63**: 108-116, 1998a.

AJUEBOR, M.N.; VIRAG, L.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M.; SZABO, C. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. **Immunology**, **95**: 625-630, 1998b.

ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; VALE, M. R.; BITENCURT, 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.**, **70**: 1144-1149, 2004.

ALENCAR, N.M.; CAVALCANTE, C.F.; VASCONCELOS, M.P.; LEITE, K.B.; ARAGAO, K.S.; ASSREUY, A.M.; NOGUEIRA, N.A.; CAVADA, B.S.; VALE, M.R. Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. **J Pharm Pharmacol**, **Jul;57(7)**:919-22, 2005.

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. **Inflammation Research**, **55(12)**: 559-64, 2006.

ARCHER, B. Lan alkaline protease inhibitor from *Hevea brasiliensis* latex. **Phytochemistry**. **23**: 633-639. 1983.

BECK, P.L. & WALLACE, J.L. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Mediat. Inflamm**, v. 6, p. 95-103, 1997.

BEZERRA, M.M.; BRAIN, S.D.; GREENACRE, S.; JERÔNIMO S.M.B.; MELO L.B.D, KEEBLE, J.; ROCHA, F.A.C. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. **British Journal of Pharmacology**, **141**: 172-182, 2004.

BINDER, R.; KRESS, A.; KIRSCHFINK, M. Modulation of C5a-mediated effector functions of human polymorphonuclear leukocytes by tumor necrosis factor alpha and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **Exp Clin Immunogenet**, **16**: 212-225, 1999.

BOUMA, M.G.; VAN DEN WILDENBERG, F.A.J.M.; BUURMAN, W.A. Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. **Am. J. Physiol.**, **270**:C522-C529, 1996.

BRACKERTZ, D.; MITCHELL, G. F.; MACKAY, I. R. Antigen-induced arthritis in mice. **Arthritis Rheum**, v. 20, p. 841-849, 1977.

BRAHN, E. Animals models of rheumatoid arthritis: clues of etiology and treatment. **Clin Orthop**, **265**: 42-53, 1991.

BRENNAN, F.M., MAINI, R.N.; FELDMANN, M. TNF- α – a pivotal role in rheumatoid arthritis? **Br. J. Rheumatol.**, **31**: 293-298, 1992.

CANETTI, C. A.; SILVA, J. S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **Br J Pharmacol**, v. 134, p. 1619-1628, 2001.

CHAN, E.S.L.; CRONSTEIN, B.N. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. **Arthritis Research**, **4(4)** : 2002.

CHANG, Y.H.; PEARSON, C.M.; ABE, C. Adjuvant polyarthritis IV: induction by a synthetic adjuvant: immunologic, histopathologic and other studies. **Arthritis Rheum**, **23**: 62-71, 1980.

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

COATES, N.J.; McCOLL, S.R. Production of chemokines in vivo in response to microbial stimulation. **J. Immunol.**, **166**: 5176-5182, 2001.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CRONSTEIN, B.N. The mechanism of action of methotrexate. **Rheum Dis Clin North Am**, **23**:739–55,1997.

CRONSTEIN, B.N.; EBERLE, M.A.; GRUBER, H.E.; LEVIN, R.I. Methotrexate inhibits neutrophil function by stimulating adenosine release from connective tissue cells. **Proc Natl Acad Sci USA**,**88**:2441–5,1991.

CRONSTEIN, B.N.; NAIME, D.; FIRESTEIN, G. The anti-inflammatory effect of an adenosine kinase inhibitor are mediated by adenosine. **Arthritis Rheum.** **38**:1040-1045., 1995.

CRONSTEIN BN, NAIME D, OSTAD E: The antiinflammatory mechanism of methotrexate: increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. **J Clin Invest**, **92**:2675-2682, 1993.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.** **107**: 660, 1992a.

DE HOOGE, A.S.; VAN DE LOO, F.A.; ARNTZ, O.J.; VAN DEN BERG, W.B. Involvement of IL-6, apart from its role in immunity, in mediating a chronic response during experimental arthritis. **Am J Pathol**, **Apr**; **158(4)**:1545, 2001

DEWAN, S.; SANGRAULA, H. & KUMAR, V.L. Preliminary studies on the anagelsic activity of latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacology** **73**: 307-311. 2000.

DOHERTY, N.S.; POUBELLE, P.; BORGHEAT, P.; BEAVER, T.H.; WESTRICH, G.L.; SCHRADER, N.L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, **30(5)** : 769-789, 1985.

DUBEY, V. K. & JAGANNADHAM, M.V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**. **62**: 1057-1071, 2002.

DUMONDE, D.C.; GLYNN, L.E. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. **Br J Exp Pathol**, **43**: 373-382, 1962.

DURAK, I.; CETIN, R.; CAMBOLAT, O. Adenosine deaminase, 5'nucleotidase, guanase and citidine deaminase activities in gastric tissues from patients with gastric cancer. **Cancer Lett.** **84**:199-202,1994a.

DURAK, I.; PERK, H.; KAVUTCU, M. Adenosine deaminase, 5' nucleotidase, xanthine oxidase superoxide dismutase and catalase activities in cancerous and non-cancerous human bladder tissues. **Free Radical Biology and Medicine**, **16**:825-831, 1994b.

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

FARREL, B. D.; DUSSOURD, D.E. & MITTER, C. Escalation of Plant Defense: Do Látex and Resin Canals Spur Plant Diversification? **The American Naturalist**, **138 (4)**: 881-900,1991.

FERREIRA, M B; GOMES, V, Calotropis procera (Ait) R. Br. **Oreades UFV**,**5**: 68-74, 1974

FERREIRA, S.H; LORENZETTI, B.B.; BRISTOW, A.F.; POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by tripeptide analogue. **Nature** **334**: 698-700, 1988.

FIRESTEIN, G.S.; BULLOUGH, D.A.; ERION, M.D.; JIMENEZ, R.; RAMIREZ-WEINHOUSE, M.; BARANKIEWICZ, J.; SMITH, C.W.; GRUBER, H.E.; MULLANE, K.M. Inhibition of neutrophil adhesion by adenosine and an adenosine kinase inhibitor. **J. Immunol.**, **154**:326-334, 1995.

FISCHER, D.; VAN DER WEYDEN M.B.; SNYDERMAN, R. - A role for adenosine deaminase in monocyte maturation. **J. Clin. Invest.** **58**:399-407, 1976.

FLEISCHMANN, R.; SHEALY, D. Developing a new generation of TNF alpha antagonists for the treatment of rheumatoid arthritis. **Mol Interv**, v.3, p.310-318, 2003.

FLEISCHMANN, R.; SHEALY, D. Developing a new generation of TNFalpha antagonists for the treatment of rheumatoid arthritis. **Mol Interv**, **3**: 310-318, 2003.

FONG, Y.; LOWRY, S.F. Tumour necrosis factor in the pathophysiology of infection and sepsis. **Clin Immunol Immunopathol.** **May; 55(2)**: 157-70, 1990.

FREITAS, C.D.T. Proteínas do látex de *Calotropis procera* (ait.) R. Br. e seus efeitos sobre pragas agrícolas. **Dissertação de Mestrado apresentada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.** 2006.

GADO, K.I.; GIGLER, G. Zymosan inflammation: a new method suitable for evaluating new inflammatory drugs. **Agents Actions**, **32**: 119-121, 1991.

GAKIS, C.; CALIA, G.; NAITANA, A.; PIRINO, D.; SERRU, G. Serum adenosine deaminase activity in HIV positive subjects. A hypothesis on the significance of ADA2. **Pan. Medica**, **31**:107-113, 1989.

GALLIN, J. Fundamental Immunology. In: W. E. Paul (Ed.). **Inflammation**. New York: Raven Press Ltd, Fundamental Immunology, p.1015-1032, 1993.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; CHEVRIER, D. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life Sci.**, **55(17)**: 321-326, 1994.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; TERLAIN, B.; NETTER. Zymosan-induced arthritis in rats. II. Effects of anti-inflammatory drugs **Life Sci.**, **56(17)**: 389-394, 1995.

GENESTIER, L.; PAILLOT, R.; FOURNEL, S.; FERRARO, C.; MIOSSEC, P.; REVILLARD, J.P. Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis clonal deletion of activated peripheral T cells. **J Clin Invest**, **15**:322–8,1998.

GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 ed. McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2004.

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

GIUSTI, G. Adenosine deaminase. In: **Methods of Enzymatic Analysis**, Ed. Hans Ulrich Bergmeyer, Academic Press, Inc., New York, 1974.

GLAZER, A. N. & SMITH, E. L. Papain and other plant sulfhydryl proteolytic enzymes. In: Boyer, P.D. (Ed.). **The Enzymes**. Academic Press, New York, 501-546, 1971.

GOLDBERG, D.M.; FLETCHER, M.J.; WATTS, C. Serum adenosine deaminase activity in hepatic disease: A comparative enzymological evaluation. **Clin. Chim. Acta**, **14**:720-728, 1966.

GREENACRE, S.; BEZERRA, M.M.; ROCHA, F.A.C.; BRAIN, S. Correlation between neutrophil accumulation and protein nitration in zymosan-induced inflammation in the rat. **J. Physiol., Scientific Meeting, King's College London**, 2000.

GUPTA, O.P.; SHARMA, N.; CHAND, D. Application of papaya latex-induced rat paw inflammation: model for evaluation of slowly acting antiarthritic drugs. **J Pharmacol Toxicol Methods**. **Apr**;31(2):95-8, 1994.

HARRIS Jr, E.D. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. **New Engl Journ of Med**, **322(18)**:1277-1289, 1990.

HASKO, G.; CRONSTEIN, B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends Immunol. Jan**;25(1):33-9, 2004.

HELIOVAARA, M., AHO, K., AROMAA, A., KNEKT, P. and REUNANEN, A. Smoking and risk of rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, **20**: 1830-1835, 1993.

HEYMER, B.; SPANEL, R.; HFERKAMP, O. Experimental models of arthritis. **Curr Top Pathol**, **71**: 123-152, 1982.

HOCHBERG, M.C.; SPECTOR, T.D. Epidemiology of rheumatoid arthritis: update. **Epidemiol. Rev.**, **12**: 247-252, 1990.

HOPKINS, S.J. Cytokines and eicosanoids in rheumatic diseases. **Ann Rheum Dis**, **49(4)**: 207, 1990.

HU, S.H.K.; MITCHO, Y.L.; ORONSKY, A.L.; KEWAR, S.S. Studies on the effect of methotrexate on macrophage function. **J Rheumatol**,**15**:206–9,1988.

INGALLS, R.R.; HEINE, H.; LIEN, E. Lipopolysaccharide recognition, CD14, and lipopolysaccharide receptors. **Infect Dis Clin North Am**,**13**:341–53 1999.

JACQUET, A.; KLEINSCHMIDT, T.; SCHNER, A. G.; LOOZE, Y.; BRAUNITZER, G. The thiol proteinases from the latex of *Carica papaya L.* III- The primary structure of chymopapain. **Biol. Chem. Hoppe seyler**, **370(5)**: 450-434, 1989.

JASIN, H.E.; ZIFF, M. Immunoglobulin and specific antibody synthesis in a chronic inflammatory focus: antigen-induced synovitis. **J Immunol**, **102**: 366-367, 1969.

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

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

KARLSON, E.W., LEE, I. M., COOK, N.R., MANSON, J.E., et al. A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals. **Arthritis Rheum.**, **42**: 910-917, 1999.

KASAMA, T.; MIWA Y.; ISOZAKI, T.; ODAI, T.; ADACHI, M.; KUNKEL, S.L. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 4, p. 273-279, 2005.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica & Clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003

KEYSTONE, E.C.; SCHORLEMMER, H.U.; POPE, C.; ALLISON, A.C. Zymosan-induced arthritis : a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis Rheum**, **20** : 1396-1401, 1989.

KIRTIKAR, K.R.; BASU, B.D. In: Indian Medicinal Plants. **Lolit Mohan Basu, Allahabad**. 1606 p. 1935.

KOLACZKWSKA, E.; SELJELID, R.; PLYTYCZ, B. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. **J. Leukoc. Biol.**, **69**: 33-42, 2001.

KRAAN, M.C.; de KOSTER, B.M.; ELFERINK, J.G.; POST, W.J.; BREEDVELD, F.C.; TAK, P.P. Inhibition of neutrophil migration soon after initiation of treatment with leflunomide or methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: findings in a prospective, randomized, double-blind clinical trial in fifteen patients. **Arthritis Rheum. Jul;43(7):1488-95, 2000.**

KRAWCZYNSKI, J.; RACZYNSKA J.; JONAS, S. The activity of adenosine deaminase in the blood serum of viral hepatitis patients. **Clin. Chim. Acta, 11:227-232, 1965.**

KRECKLER, L.M.; WAN, T.C.; GE, Z.; AUCHAMPACH, J.A. Adenosine inhibits TNF – α release from mouse peritoneal macrophages via A_{2A} and A_{2B} , but not the A_3 adenosine receptor. **J Pharmacol Exp Ther. April ; 317(1): 172–180, 2006.**

KRUMP, E.; LEMAY, G.; BERGEAT, P. Adenosine A_2 receptor-induced inhibition of leukotriene B₄ synthesis in whole blood ex-vivo. **Br.J.Pharmacol., 117:1639-1644, 1996.**

KUBES, P. Polymorphonuclear leukocyte-endothelium interactions: a role for pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules. **Can J Physiol Pharmacol, 7: 88-97, 1993.**

KUMAR, H.S.; BASU, N. Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacology, 44(2): 123-125, 1994.**

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

KWAN, C.L.; HU, J.W.; SESSLE, B.J. Neuroplastic effects of neonatal capsaicin on neurons in adult rat trigeminal nucleus principalis and subnucleus oralis. **J Neurophysiol**, Jan;75(1):298-310, 1996.

LARHSINI, M.; OUMOULID, L.; LAZREK, H.B.; WATALEB, C.S.; BOUSAID, M.; BEKKOUCHE, K.; MARKOUK, M. & JANA, M.. Screening of antibacterial and antiparasitic activities of six Moroccan medicinal plants. **Therapie**, 54(6): 763-765, 1999.

LEE, S. W.; HONG, Y. S.; CHUN, C. M.; MOON, J. D.; KIM, S. J.; JUNG, I. C.; YOON, Y. H.; LEE, B. A.; MOON, S. W.; CHOI, S. H. & MOON, C. K. Anti-inflammatory effects of IL-4 and IL-10 on human polymorphonuclear leukocytes. **J Korean Med Sci**, 17: 7-14, 2002.

LIN, Y.H. & LU, C.L. Latex trypsin inhibitors of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). **Bot. Bull. Acad. Sin.** 35: 153-159, 1994.

LUNA, N.M.M. Expressão das isoenzimas da adenosine desaminase (ADA) em modelo experimental de peritonite infecciosa. **Dissertação de Mestrado apresentada no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará**, 2001.

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

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

LYNN, K.R. & CLEVETTE-RADFORD, N.A. Hevamins: serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, 25(10): 2279-2282, 1986b.

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

MAINI, R.N.; TAYLOR, P.C.; PALEOLOG, E.; CHARLES, P.; BALLARA, S.; BRENNAN, F.M.; FELDMANN, M. Anti-tumour necrosis factor specific antibody (infliximab) treatment provides insights into the pathophysiology of rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, **58**: (Suppl I) 156-160, 1999.

MARKENSON, J.A. Worldwide trends in the socioeconomic impact in the long-term prognosis of rheumatoid arthritis. **Semin. Arthritis Rheum.**, **21**:4-12, 1991.

MARONE, G.; FINDLEY, S.R.; LICHTENSTEIN, L.M. - Adenosine receptor of human basophils: modulation of histamine release. **J. Immunol.**, **123**:1473, 1979.

McCANCE, K.L. and HUETHER, S.E. **Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children**. 3 ed. Mosby, St. Louis, 1998.

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

METCALFE, C.R. Distribution of latex in the plant kingdom. **Economic Botany** **21**: 115- 127, 1967.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol. Jan**; **57(1)**: 1-164, 1999.

MONTI, R.; CONTIERO, J & GOULART, A.J. Isolation of natural inhibitors of papain obtained from carica papaya Latex. **Brazilian Archives of biology and technology** **47(5)**: 747-754, 2004.

MORCELLE, S.R.; CAFFINI, N.O. & PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex. **Fitoterapia**, **75**: 480-493, 2004.

MOURS L. E. Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flesh fly,

MUNDER, K.; COLDITZ, I.G. Migratory responses of ovine neutrophils to inflammatory mediators *in vitro* and *in vivo*. **J Leukoc Biol**, **53**: 273-278, 1993.

NAMIOT, Z.; KEMONA, A.; STASIEWICZ, J. Adenosine deaminase activity in gastric cancer. **Cancer Lett.** **82**:95-98, 1994.

NEUMANN, P.; GERTZBERG, N.; VAUGHAN, E.; WEISBROT, J.; WOODBURN, R.; LAMBERT, W.; JOHNSON, A. Peroxynitrite mediates TNF- α -induced endothelial barrier dysfunction and nitration of actin. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** **290**: L674–L684, 2006.

NISHIKAWA, Y.; FUKUMOTO, K.; WATANABE, F. Liver disease diagnosis based on serum adenosine deaminase activity. **Jpn. J. Clin. Chem.** **15**:259-263, 1986.

ORTIZ Z, SHEA B, SUAREZ-ALMAZOR M, MOHER D, WELLS G, TUGWELL P: Folic acid and folinic acid for reducing side effects in patients receiving methotrexate for rheumatoid arthritis. **Cochrane Database Syst Rev** **2**, 2000.

PARMELY, M.J.; ZHOU, W.; EDWARDS III, C.K.; BORCHEDING, D.R.; SILVERSTEIN, R.; MORRISON, D.C. Adenosine and a related carbocyclic nucleosid analogue selectived inhibit tumor necrosis factor- α production and protect mice against endotoxin challenger. **J.Immunol.** , **151**:389-396,1993

PEREIRA, L. S.; GOMES, M. V.; FERNANDES, K.V.S.; SALES, M.P. & XAVIER-FILHO, J. Insecticidal and antifungic proteins of the latex from *Manihot glaziovii* Muell. Arg. Ver. **Bras. Bot.** **22(1)**: 1-8, 1999.

PIRAS, M.A.; GAKIS, C.; BUDRONI, M.; ANDREONI, G. Adenosine deaminase activity in pleural effusions: an aid to differential diagnosis. **Br Med J. Dec 23; 2(6154)**: 1751-1752. 1978

POTHOULAKIS, C., I. CASTAGLIUOLO, J. T. LAMONT, A. JAFFER, J. C. O'KEANE, R. M. SNIDER, AND S. E. LEEMAN. CP-96,345, a substance P antagonist, inhibits rat intestinal responses to *Clostridium difficile* toxin A but not cholera toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91**:947–951. 1994.

PUSHPAKON, R.; ONG-AJYOOOTH, S.; BOVORNKITTI, S. The association of adenosine deaminase activity with T-lymphocytes and subsets in pulmonary tuberculosis and bronchogenic carcinoma. **J. Med. Assoc. Thai, 73**:244-248, 1990.

RACZYNSKA, J.; JONAS, S.; KRAWCZYNSKI, J. Diagnostic value of adenosine deaminase in some liver disease. **Clin. Chim. Acta, 13**:151-154, 1966.

RAMOS, M.V.; AGUIAR, V.C.; DA SILVA XAVIER, A.A.; LIMA, M.W.; BANDEIRA, G.P.; ETCHELLS, J.P.; NOGUEIRA, N.A.; ALENCAR, N.M. Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested upon in vitro enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material. **Fitoterapia. Jun;77(4)**:251-6, 2006.

RAMOS, M.V.; AGUIAR, V.C.; MELO, V.M.; MESQUITA, R.O.; SILVESTRE, P.P.; OLIVEIRA, J.S; OLIVEIRA R.S.; MACEDO, N.M.; ALENCAR, N.M. Immunological and allergenic responses induced by latex fractions of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. **J Ethnopharmacol. Apr 20;111(1)**:115-22, 2007.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

REIMOLD, A. M. TNF alpha as therapeutic target: new drugs, more applications. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 1, p. 377-392, 2002.

RIDGER, V.C.; GREENACRE, S.A.B.; HANDY, R.L.C.; HALLIWELL, B.; MOORE, P.K.; WHITE-MAN, M.; BRAIN, S.D. Effect of peroxynitrite on plasma extravasation, microvascular blood flow and nociception in the rat. **Br J Pharmacol**, **122**: 1083- 1088, 1997.

RIQUELME, A.; CALVO, M.; SALECH, F.; VALDERRAMA, S.; PATTILLO, A.; ARELLANO, M.; ARRESE, M.; SOZA, A.; VIVIANE, P.; LETELIER, LM. Value of adenosine deaminase (ADA) in ascitic fluid for the diagnosis of tuberculous peritonitis: a meta-analysis. **J Clin Gastroenterol. Sep;40(8)**:705-10. 2006.

ROCHA, F.A.C.; ANDRADE, L.E.; RUSSO, M.; JANCAR, S. PAF modulates eicosanoid and TNF release in immune-complex arthritis in rats. **J Lipid Mediat Cell Signal**, **16**: 1-10, 1997.

ROCHA, F.A.C.; ARAGÃO Jr, A.G.M.; OLIVEIRA, R.C.; POMPEU, M.M.L.; VALE, M.R.; RIBEIRO, R.A. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflamm. Res.**, **48**: 485-490, 1999.

ROCHA, F.A.C.; ARAGÃO Jr, A.G.M.; OLIVEIRA, R.C.; POMPEU, M.M.L.; VALE, M.R.; RIBEIRO, R.A. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflamm. Res.**, **48**: 485-490, 1999.

RODRIGUES, L.F.S. Caracterização da adenosina desaminase (ADA) e suas isoenzimas em tecido caprino: um modelo para o estudo da artrite encefalite caprina (CAE). **Tese de Doutorado apresentada no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará**, 2001.

ROSSI, A.G.; HELLEWELL, P.G. Mechanisms of neutrophil accumulation in tissues. In: HELLEWELL, P.G.; WILLIAMS, T.J. (Eds.). **Immunopharmacology of neutrophils: the handbook of immunopharmacology**. Academic Press, cap. 10, p. 223, 1994.

RUDALL, P.J. Lacticifers in Euphorbiaceae a conspectus. **Botanical Journal of the Linnean Society**, **94**: 143-163, 1987.

Sarcophaga hemorrhoidalis fallen. **J. Egypt Soc. Parasitol.** **27(2)**: 505-514, 1997.

SAUNDERS, B. M.; TRAN S.; RUULS, S.; SEDGWICK, J.D.; BRISCOE, H.; BRITTON, W.J. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of Mycobacterium tuberculosis infection. **J Immunol**, v. 174, p. 4852-4859, 2005.

SCHMID-SCHONBEIN, G.W., USAMI, S., SKALAK, R., CHIEN, S. The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and post-capillary vessels. **Microvasc Res**, **19**: 45-70, 1980.

SEELY, A.J.E., PASCUAL, J.L.; CHRISTOU, N.V. Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. **Critical Care**, **7**: 291-307, 2003.

SGARBIERI, V.C.; GUPTA, S. M.; KRAMER, D.E. AND WHITAKER, J.R. Ficus enzymes: Separation of proteolytic enzymes of *Ficus glabrata* and *Ficus carica*. **J Chem**, **239**: 2170-2177, 1964.

SHARMA, P.; DEVI, J. & SHARMA, J. D. In vitro hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. **J. Ethnopharmacology**, **74**: 239-243, 2001.

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

SHIROKY JB: The use of folates concomitantly with low-dose pulse methotrexate. **Rheum Dis Clin North Am**, **23**:969-980, 1997.

SHIVKAR, Y.M.; KUMAR, V.L. Histamine mediates the pro-inflammatory effect of latex of *Calotropis procera* in rats. **Mediators of Inflammation**, **12(5)**: 299- 302, 2003.

SILKE C, MURPHY MS, BUCKLEY T, BUSTEED S, MOLLOY MG, PHELAN M: The effects of caffeine ingestion on the efficacy of methotrexate. **Rheumatology [Oxford]**, **40(suppl1)**:S34, 2001.

SILMAN, A.J., NEWMAN, J.; MacGREGOR, A.J. Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from nationwide study of disease-discordant twins. **Arthritis Rheum.**, **39**: 732-735, 1996.

SINGH, H.; KUMAR, S.; DEWAN, S. & KUMAR, V.L. Inflammation induced by latex of *Calotropis procera* – a new model to evaluate anti-inflammatory drugs. **J Pharmacol and Toxicol, Methods**, **43**: 219-224, 2000.

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. Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice . **Journal of Ethnopharmacology**, **99 (1)**: 125-129, 2005.

SPECTOR, T.D. Rheumatoid Arthritis. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, **16**: 513-537, 1990.

SRITANYARAT, W.; PEARCE G.; SIEMS, W. F.; RYAN, C. A.; WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D. Isolation and characterization of iso inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, 2006.

TADIMETI, S.R.; CURRIE, J.L.; SHAFFER, A.F.; ISAKSON, P.C. In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. **J Pharmacol Exp Ther**, **269**:917-925, 1994.

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**, **43**: 578–582, 1991.

TAYLOR, P. C.; WILLIAMS R. O.; FELDMAN, M. Tumour necrosis factor alpha as a therapeutic target for immune-mediated inflammatory diseases. **Curr Opin Biotechnol**, v. 15, p. 557-563, 2004.

TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain, Mar**; **48(3)**: 421-7, 1992.

VALE, M. L. Avaliação da atividade antinociceptiva da talidomida, pentoxifilina e clorpromazina em modelos experimentais em modelos experimentais. **Tese de doutorado apresentada no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará**, 2003.

VAN DER WEYDEN, M.B.; KELLEY, W.N. Human adenosine deaminase (distribution and properties). **J. Biol. Chem.**, **251**:5448-5456, 1976.

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.**, **55**:85–97, 1999.

VIANA, C.F.G.; ARAGÃO, JR, A.G.M.; RIBEIRO, R.A.; MAGALHAES, J.F.G.; VALE, M.R. Effect of *Ageratum conyzoides* in nociception and inflammatory response induced by zymosan. **Fitoterapia**, **LXIX (4)** : 349-354, 1998.

WEINBLATT, M.E.; KREMER, J.M.; BANKHURST, A.D.. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. **N Engl Jour Med**; **340**:253-9. 1999

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

WOOLEY, P. H.; DUTCHER J.; *et al.* Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor FC fusion protein on type II collagen-induced arthritis in mice. **J Immunol**, v.151, p. 6602-6607, 1993.