



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

CAMILA FREITAS BEZERRA

PROPRIEDADES TOXICOLÓGICAS E IMUNOMODULADORAS DE PROTEÍNAS
LATICÍFERAS DE *CALOTROPIS PROCERA*

FORTALEZA

2017

CAMILA FREITAS BEZERRA

PROPRIEDADES TOXICOLÓGICAS E IMUNOMODULADORAS DE PROTEÍNAS
LATICÍFERAS DE *CALOTROPIS PROCERA*

Tese submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B469p Bezerra, Camila Freitas.
Propriedades toxicológicas e imunomoduladoras de proteínas laticíferas de *Calotropis procera* / Camila Freitas Bezerra. – 2017.
143 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.
1. Anafilaxia. 2. Proteínas do látex. 3. Tolerância oral. I. Título.

CDD 572

CAMILA FREITAS BEZERRA

PROPRIEDADES TOXICOLÓGICAS E IMUNOMODULADORAS DE PROTEÍNAS
LATICÍFERAS DE *CALOTROPIS PROCERA*

Tese submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em: 31 / 03 / 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos (Orientador)
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular – UFC

Prof^a. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão
Depto. de Morfologia - UFC

Prof^a. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal
Depto. de Farmácia - UFC

Prof. Dr. Diego Demarco
Depto. de Botânica do Instituto de Biociências -USP

Prof^a. Dra. Carla Freire Celedônio Fernandes
Fundação Oswaldo Cruz - Rondônia

Dedico este trabalho ao meu esposo,
Leandro Bezerra de Oliveira e aos meus
pais, Carlos Alberto e Francisca Ivonete.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, por me conceder privilégio de realizar este trabalho. Por me dar forças para vencer as minhas dificuldades, sabedoria para enfrentar os momentos difíceis e esperança.

À Universidade Federal do Ceará - UFC, pela estrutura disponibilizada para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo, como aos demais órgãos e agências de fomento (CAPES e FUNCAP) pelo suporte financeiro.

Ao Professor Dr. Márcio Viana Ramos por possibilitar meu crescimento científico e me orientar na realização deste trabalho. Obrigada pela confiança em mim depositada, pelas cobranças, pelos conselhos e pela paciência frente às minhas dificuldades.

À professora Dra. Érika Freitas Mota, não só pelo suporte no desenvolvimento deste trabalho, mas pelo apoio constante, pelas palavras certas no momento certo, incentivo, pelo exemplo de integridade, humildade, humanidade e sabedoria e acima de tudo pela agradável amizade.

À professora Dra. Ana Claudia Marinho da Silva, por todos os ensinamentos, pela indispensável ajuda nas etapas mais laboriosas deste trabalho, pelos incentivos e amizade de sempre, por ser um exemplo a ser seguido. Obrigada por transformar em alegria os momentos difíceis.

À professora Dra. Adriana da Rocha Tomé, por toda atenção nas inúmeras etapas de análises histológicas, por todo conhecimento transferido, por toda paciência frente minhas limitações, por todo incentivo e amizade e por aceitar participar da banca examinadora. Muito obrigada por tornar meus dias mais leves.

À professora Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar por ter prontamente disponibilizado seu laboratório para realização das análises de citocinas e pela preciosa ajuda de suas alunas Ingrid Figueiredo, Luana David e Tamires de Fátima.

Ao professor Dr. José Hélio Costa, por ter disponibilizado seu laboratório inúmeras vezes para o desenvolvimento deste trabalho, pelo conhecimento transferido, pelo apoio e amizade.

À professora Dra. Dirce Fernandes Melo, pela contribuição marcante na minha trajetória profissional. Pela confiança, conselhos, incentivos, por sempre enxergar as possibilidades e torná-las reais. E principalmente, por ser meu referencial e uma grande amiga.

Ao professor Dr. Davi Farias pelas sugestões no desenvolvimento do trabalho, pelo apoio e prontidão em ajudar.

A todos os membros da banca examinadora, Profa. Dra. Renata de Carvalho Leitão, Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal, Prof. Dr. Diego Demarco e Profa. Dra. Carla Freire Celedônio Fernandes, por terem aceitado o convite e por ajudarem nas melhorias deste trabalho com contribuições valiosas.

A todos os amigos do Laboratório de Bioenergética do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, por toda ajuda, principalmente de Tayna, Thaís, Renata, Joana e Janaína nos experimentos laboriosos e em especial a Beatriz Lima, Kátia Daniella, Clesivan Pereira e Edson Oliveira pela ajuda, apoio nos momentos mais difíceis, pelos momentos de descontração e amizade verdadeira.

A todos os amigos do Laboratório de Plantas Laticíferas que me acolheram tão bem, me proporcionando sempre momentos agradáveis, não só na realização dos experimentos, mas principalmente pela amizade e momentos de descontração. Agradeço em especial Júnior, Ayrles, Bárbara, Julianny, Beatriz, Jackson, João Pedro e Eilton pela ajuda nos experimentos, às amigas Maria Zelândia e Carolina Viana pelas valiosas contribuições na finalização da tese e minha amiga Mirele Vasconcelos pelo apoio, ajuda, incentivo, momentos de descontração, amizade verdadeira e exemplo de superação.

Ao meu amigo Pedro Abílio Júnior que foi meu braço direito em todas as etapas deste trabalho, muito obrigada pela dedicação, atenção e amizade.

À minha amiga Joana Freitas pelo apoio fundamental nos experimentos e pela amizade de sempre.

À minha amiga Beatriz Lima que me acompanha desde a graduação, mestrado e doutorado e compartilha comigo momentos de superações, alegrias e conquistas. Muito obrigada pela amizade verdadeira.

À minha amiga Patrícia Silva, pelo fundamental apoio na etapa final deste trabalho e principalmente pela amizade verdadeira.

À minha amiga Neuza Felix Rochette que me ensinou a base da metodologia científica, por toda sua amizade, atenção, incentivo e principalmente por todos os momentos de descontração. Muito obrigada por tudo.

A todos os meus amigos que indiretamente contribuíram para desenvolvimento deste trabalho com incentivos, palavras de carinho e motivação.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, por ter me concedido afastamento para finalização da tese, em especial a diretora Antônia Francimar da Silva e aos professores Emanuel, Adalva, Gleison, Adriana, Hirllen, Claudinha e Érica. Nunca esquecerei da valiosa ajuda de cada um. Muito obrigada.

Aos meus adoráveis pais, Carlos Alberto Bezerra e Francisca Ivonete de Freitas Bezerra, exemplo de força, amor e bondade, aos meus queridos irmãos, Carlos Henrique, Carla de Freitas e Monaliza Alves, pelo carinho, pela confiança em mim depositada, pelo apoio de sempre, e aos meus amáveis sobrinhos Laís, Rafael, Pedro, Júlia, Danilo e Alana pela injeção de ânimo disponibilizada sendo fundamental para a continuidade deste trabalho. Obrigada por estarem sempre presentes em minha vida.

Em especial, agradeço ao meu esposo, amigo e companheiro de todas as horas, Leandro Bezerra de Oliveira, sempre presente, não importa o momento, de alegria ou de tristeza. Obrigada pela força, pela paciência e pelas palavras e ações de apoio e carinho. Muito obrigada por tudo.

E agradeço também, de forma muito especial, a minha pequena Maytê, que está em meu ventre, só com algumas semanas de vida, mas me deu força e serenidade para concluir esta etapa muito importante em minha vida. Te amo filha.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para execução deste trabalho.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

Calotropis procera (Ait.) R.Br é uma planta laticífera, reconhecida por suas propriedades farmacológicas. As proteínas solúveis do látex (PL) desta planta apresentam atividades anti-inflamatórias, antitumoral entre outras. Apesar dos estudos realizados a respeito do potencial fitoterápico de PL, ainda são incipientes os conhecimentos sobre suas propriedades toxicológicas e imunomoduladoras. Estudo prévio a respeito do potencial imunomodulador de PL por via subcutânea e oral, mostrou que esta fração foi capaz de induzir resposta imune por via subcutânea, com produção de IgE e sinais de anafilaxia, entretanto quase sem resposta imune por via oral. O objetivo do trabalho foi determinar o potencial toxicológico e imunomodulador das proteínas do látex de *Calotropis procera*. PL foi processada e caracterizada para utilização de ensaios *in vivo*. Os ensaios de toxicidade foram realizados em camundongos Swiss, por via oral e intraperitoneal, avaliando o perfil comportamental, hematológico, bioquímico e histológico. A atividade imunomoduladora foi determinada através de protocolo de tolerância oral em camundongos BALB/c, sendo quantificado o nível de anticorpos, citocinas, DTH e realizado análises hematológicas e histológicas. Os animais que receberam doses de até 5000 mg/kg por via oral, não exibiram praticamente nenhum efeito adverso nos parâmetros fisiológicos, bioquímicos e hematológicos, apresentando uma DL50 acima de 5000 mg/kg. Entretanto, 20% de mortes foram registradas para a dose de 75 mg/kg por via intraperitoneal. Doses menores (35 e 15 mg/kg) foram administrada e mortes não foram registradas. Consequentemente, PL foi classificada na categoria 3, com DL50 na faixa de 50 a 300 mg/kg (OECD, N°423). Uma possível modulação supressora da resposta imune, através do processo de tolerância oral, foi observada com a redução da IgE e IgG no soro, IL-4 e IFN- γ em homogenato de baço e ausência de sinais de anafilaxia. PL, por via oral, apresentou baixa toxicidade e imunogenicidade de acordo com os ensaios de toxicidade e imunomodulação realizados. Por via intraperitoneal, entretanto, apresentou alta toxicidade devido, principalmente, a atividade proteolítica da amostra. Embora a tolerância oral tenha sido alcançada nas diferentes doses estudadas, mais estudos devem ser realizados para o estabelecimento do uso seguro de PL.

Palavras-chave: Anafilaxia. Proteínas do látex. Tolerância oral.

ABSTRACT

Calotropis procera (Ait.) R.Br is a lactiferous plant, recognized for its pharmacological properties. The latex soluble proteins (LP) of this plant present anti-inflammatory, antitumor, anti-arthritis, among others activities. Despite the studies carried out regarding the phytotherapeutic potential of LP, knowledge about its toxicological and immunomodulatory properties is still incipient. Preliminary study on the immunomodulatory potential of PL by subcutaneous and oral route showed that this fraction was able to induce immune response subcutaneously, with production of IgE and symptoms of anaphylaxis, but with almost no immune response orally. The objective of this study was to determine the toxicological and immunomodulatory potential of the latex of *Calotropis procera*. LP was processed and characterized for use *in vivo* assays. The toxicity tests were performed in oral and intraperitoneal Swiss mice, evaluating the behavioral, hematological, biochemical and histological profile. Immunomodulatory activity was determined by oral tolerance protocol in BALB / c mice, and the level of antibodies, cytokines, DTH and hematological and histological analyzes were quantified. Animals given up to 5000 mg/Kg orally exhibited almost no adverse effects on physiological, biochemical and hematological parameters, with LD 50 above 5000 mg/kg. Death (20%) was documented when LP (75 mg/Kg) was given in the peritoneum. Minor doses (35 and 15 mg / kg) were administered and deaths were not documented. Accordingly, PL was classified in category 3 with LD50 in the range of 50 to 300 mg / kg (OECD, No. 423). Suppression of the immune response through the oral tolerance process was confirmed by the lowering of IgE and IgG in the serum, IL-4 and IFN- γ in spleen homogenates and the absence of anaphylaxis signs. PL, orally, showed low toxicity and immunogenicity according to the toxicity and immunomodulation tests performed. By intraperitoneal route, however, it presented high toxicity mainly due to the proteolytic activity of the sample. Although oral tolerance has been achieved at the different doses studied, further studies should be performed to establish the safe use of PL.

Keywords: Anaphylaxis. Latex proteins. Oral tolerance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Planta <i>Himatanthus drasticus</i> (Mart.)-----	22
Figura 2 -	Planta <i>Plumeria rubra</i> Linn.-----	23
Figura 3 -	Planta <i>Cryptostegia grandiflora</i> R. Br.-----	24
Figura 4 -	Planta <i>Thevetia peruviana</i> (Pers.) Schum.-----	25
Figura 5 -	Aspectos gerais da planta <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R.Br.-----	26
Figura 6 -	Esquema de reação de hipersensibilidade do tipo I-----	32
Figura 7 -	Mecanismo de indução da tolerância oral-----	36
Figura 8 -	Processamento do Látex para obtenção das proteínas do látex---	43
Figura 9 -	Esquema de administração das doses em exposições de toxicidade aguda-----	47
Figura 10 -	Desenho experimental do ensaio de toxicidade aguda (ORAL)-----	48
Figura 11 -	Perfil cromatográfico e eletroforético de PL e frações inibidas com iodoacetamida-----	49
Figura 12 -	Atividade proteolítica total de PL e frações inibidas com iodoacetamida-----	54
Figura 13 -	Perfil cromatográfico e eletroforético de PL e frações inibidas com iodoacetamida-----	60
Figura 14 -	Atividade proteolítica total de PL e frações inibidas com iodoacetamida-----	61
Figura 15 -	Peso corpóreo de camundongos tratados oralmente com PL 2000 e 5000 durante a avaliação de toxicidade aguda-----	63
Figura 16 -	Peso corpóreo de camundongos tratados (i.p) com PL 75 durante a avaliação de toxicidade aguda-----	69
Figura 17 -	Microestrutura do fígado de camundongos tratados com PL (75 e 150 mg/kg, i.p)-----	73
Figura 18 -	Microestrutura do rim direito de camundongos tratados com PL (75 e 150 mg/kg, i.p)-----	74
Figura 19 -	- Microestrutura do baço de camundongos tratados com PL (75 e 150 mg/kg, i.p)-----	75
Figura 20 -	Peso corpóreo de camundongos tratados com PL (i.p) (a. 15-75 IAA / b. PI e PII IAA) durante a avaliação de toxicidade aguda-----	79

Figura 21 - Microestrutura do fígado de camundongos tratados com PL (15 - 75 IAA (i.p))-----	84
Figura 22 - Microestrutura dos rins de camundongos tratados com PL (15 -75 IAA) (i.p)-----	85
Figura 23 - Microestrutura do baço de camundongos tratados com PL (15 -75 IAA (i.p))-----	86
Figura 24 - Microestrutura do coração de camundongos tratados com PL (15 -75 IAA (i.p))-----	87
Figura 25 - Microestrutura dos pulmões de camundongos tratados com PL (15 -75 IAA (i.p))-----	88
Figura 26 - Microestrutura do fígado de camundongos tratados com PL – PI/PII IAA (i.p)-----	89
Figura 27 - Microestrutura dos rins de camundongos tratados com PL-PI/PII IAA (i.p)-----	90
Figura 28 - Microestrutura do baço de camundongos tratados com PL-PI/PII IAA (i.p)-----	91
Figura 29 - Microestrutura do coração de camundongos tratados com PL- PI/PII IAA (i.p)-----	92
Figura 30 - Microestrutura dos pulmões de camundongos tratados com PL- PI/PII IAA (i.p)-----	93
Figura 31 - Nível de imunoglobulina IgG de camundongos submetidos ao protocolo de tolerância oral-----	97
Figura 32 - Nível de imunoglobulina IgA de camundongos submetidos ao protocolo de tolerância oral-----	99
Figura 33 - - Nível de imunoglobulina IgE em camundongos tratados com OVA ou PL-----	100
Figura 34 - Títulos de imunoglobulina IgG1 de camundongos submetidos ao protocolo de tolerância oral-----	101
Figura 35 - Pesos corpóreos de camundongos durante o experimento de tolerância oral-----	102
Figura 36 - Sinais de anafilaxia após imunização (dia 28) e desafio (dia 42) de animais durante o experimento de tolerância oral-----	103
Figura 37 - Temperatura corpórea antes e depois da imunização (dia 28) e	

	desafio (dia 42) de animais durante o experimento de tolerância oral-----	104
Figura 38 -	Reação de hipersensibilidade do tipo tardia avaliada em animais submetidos ao protocolo de tolerância oral-----	105
Figura 39 -	Níveis de citocinas em homogenatos de baços de animais durante o experimento de tolerância oral-----	107
Figura 40 -	Pesos relativos dos órgãos linfoides, baço e timo de animais durante o experimento de tolerância oral-----	108
Figura 41 -	Microestrutura do intestino delgado de animais tratados com PL 2,5; 5 e 10-----	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeito de PL 2000 e 5000, administrado por via oral, sobre parâmetros comportamentais de camundongos durante a avaliação de toxicidade aguda-----	60
Tabela 2 -	Parâmetros fisiológicos de camundongos tratados oralmente com PL 2000 e 5000-----	64
Tabela 3 -	Parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos tratados oralmente com PL 2000 e 5000-----	65
Tabela 4 -	Efeito de PL 75, 150 e 300 (i.p) sobre os parâmetros comportamentais de camundongos durante a avaliação de toxicidade aguda-----	66
Tabela 5 -	Efeito de PL 75, 150 e 300 (i.p) sobre os parâmetros comportamentais de camundongos durante a avaliação de toxicidade aguda-----	68
Tabela 6 -	Parâmetros fisiológicos de camundongos tratados com PL 75 (i.p)-----	70
Tabela 7 -	Parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos tratados com PL 75 (i.p)-----	71
Tabela 8 -	Peso relativo dos órgãos de camundongos tratados com PL 75 (i.p)-----	72
Tabela 9 -	Efeito de PL (15-75 IAA/ PI e PII IAA, i.p) sobre parâmetros comportamentais de camundongos durante a avaliação de toxicidade aguda-----	77
Tabela 10 -	. Parâmetros fisiológicos de camundongos tratados com PL (15-75 IAA/ PI e PII IAA) por via intraperitoneal-----	80
Tabela 11 -	Parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos tratados com PL (15-75 IAA) por via intraperitoneal-----	81
Tabela 12 -	Parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos tratados com PL (PI e PII IAA) por via intraperitoneal-----	82
Tabela 13 -	Peso relativo dos órgãos de camundongos tratados com PL (15-75 IAA/ PI e PII IAA) por via intraperitoneal-----	83
Tabela 14 -	Parâmetros Hematológicos de camundongos submetidos ao protocolo de tolerância oral-----	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BSA	Albumina Sérica Bovina
DL50	Dose Letal para 50% de uma população teste
DTH	Delayed type hypersensitivity
DTT	Ditiotreitol
Elisa	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FcεR	Receptor de Membrana Específico para IgE
H&E	Hematoxilina-Eosina
Hevb	<i>Hevea brasiliensis</i>
i.p.	Via Intraperitoneal
i.v.	Via Intravenosa
IAA	Iodoacetamida
IFN-γ	Interferon- gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
MDA	Malondialdeído
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade de Classe II
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OVA	Ovalbumina
PCA	Anafilaxia Cutânea Passiva
PL	Proteína do Látex
PI-IAA	Proteínas do látex inibida com iodoacetamida
PL-PI	Pico I de <i>C. procera</i> – CM-Sepharose
PL-PII	Pico II de <i>C. procera</i> – CM-Sepharose
PL-PII IAA	Pico Cromatográfico PII inibido com iodoacetamida

Pp	Papaína
PRS	Proteínas Relacionadas à Patogenicidade
s.c	Via subcutânea
T CD4 ⁺	Linfócito T auxiliar
T _h 1	T <i>helper</i> 1
T _h 2	T <i>helper</i> 2
TMB	Tetrametilbenzidino
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
Tris-HCl	Cloridrato de Trizma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO-----	19
2	REVISÃO DE LITERATURA-----	21
2.1	Látex e Plantas laticíferas-----	21
2.2	<i>Calotropis procera</i> -----	25
2.3	Toxicidade-----	28
2.4	Alergia-----	31
2.5	Tolerância Imunológica-----	34
3	OBJETIVOS-----	39
3.1	Objetivo geral-----	39
3.2	Objetivos Específicos-----	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS-----	40
4.1	Materiais-----	40
4.1.1	<i>Reagentes</i> -----	40
4.1.2	<i>Material Vegetal</i> -----	40
4.1.3	<i>Animais</i> -----	41
4.2	Métodos-----	41
4.2.1	<i>Etapa I: Extração e caracterização bioquímica de proteínas do látex de Calotropis procera</i> -----	41
4.2.1.1	<i>Coleta do látex</i> -----	42
4.2.1.2	<i>Processamento do látex</i> -----	42
4.2.1.3	<i>Cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose</i> -----	43
4.2.1.4	<i>Análise do perfil proteico através de eletroforese unidimensional</i> -----	44
4.2.1.5	<i>Dosagem de proteínas</i> -----	45
4.2.1.6	<i>Atividade proteolítica</i> -----	45
4.2.2	<i>Etapa II : Avaliação de toxicidade aguda por via oral e</i>	

	<i>intraperitoneal de proteínas do látex de Calotropis Procera</i>	45
4.2.2.1	<i>Avaliação do Potencial Agudo Oral</i>	46
4.2.2.2	<i>Avaliação do Potencial Agudo Intraperitoneal</i>	48
4.2.2.3	<i>Observações Comportamentais e Necropsia</i>	50
4.2.2.4	<i>Análises Hematológicas</i>	51
4.2.2.5	<i>Análises Bioquímicas</i>	51
4.2.2.6	<i>Ensaio de Peroxidação Lipídica</i>	51
4.2.2.7	<i>Análise Histológica</i>	52
4.2.3	<i>Etapa III: Avaliação da capacidade de proteínas do látex de Calotropis procera em induzir tolerância oral em camundongos</i>	52
4.2.3.1	<i>Desenho experimental do protocolo de tolerância oral</i>	53
4.2.3.2	<i>Ensaio Imunoenzimático (ELISA)</i>	55
4.2.3.3	<i>Anafilaxia cutânea passiva para IgG₁</i>	56
4.2.3.4	<i>Parâmetros relacionados a manifestações alergênicas</i>	57
4.2.3.5	<i>Determinação de reação de hipersensibilidade do tipo IV ou tardia (DTH)</i>	5
4.2.3.6	<i>Determinação do perfil de citocinas</i>	7
4.2.3.7	<i>Análise Estatística</i>	57
5	RESULTADOS	58
5.1	Etapa I: Extração e caracterização bioquímica de proteínas do látex de Calotropis procera	59
5.1.1	<i>Cromatografia de Troca iônica</i>	59
5.1.2	<i>Atividade proteolítica</i>	60
5.2	ETAPA II: Avaliação de toxicidade aguda por via oral e intraperitoneal de proteínas do látex de Calotropis Procera	61
5.2.1	<i>Toxicidade aguda oral</i>	61
5.2.2	<i>Toxicidade aguda intraperitoneal</i>	66

5.3	ETAPA III: Avaliação da capacidade de proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i> em induzir tolerância oral em camundongos -----	94
5.3.1	<i>Perfil hematológico e Teor de Imunoglobulinas</i> -----	94
5.3.2	<i>Parâmetros relacionados a manifestações alérgica</i> -----	101
5.3.3	<i>Reação de hipersensibilidade tardia (DTH)</i> -----	104
5.3.4	<i>Perfil de citocinas</i> -----	105
5.3.5	<i>Pesos dos órgãos linfóides e histologia do intestino</i> -----	108
6	DISCUSSÃO -----	110
7	CONCLUSÃO -----	121
	REFERÊNCIAS -----	122
	ANEXO A – Parâmetros de <i>screening</i> hipocrático utilizados nos ensaios toxicológicos (BRITO, 1994) -----	139

1 INTRODUÇÃO

Calotropis procera é uma planta laticífera explorada em vários países, como Índia, Paquistão, Egito e Malásia, e em menor intensidade no Nordeste do Brasil (FIGUEIREDO *et al.*, 2014). Seu látex apresenta diversas propriedades farmacológicas e é utilizado tradicionalmente para o tratamento de infecções cutâneas, doenças inflamatórias, entre outras doenças relacionadas (SHARMA *et al.*, 2012).

Nosso grupo de pesquisa avaliou diversas propriedades biológicas das proteínas do látex de *C. procera* (PL) como potencial inseticida (RAMOS *et al.*, 2010) e antifúngico (SOUZA *et al.*, 2011), além de inúmeras atividades farmacológicas, dentre estas, atividades antinociceptivas (SOARES *et al.*, 2005), pro e anti-inflamatórias (ALENCAR *et al.*, 2006), atuação depressora sobre o sistema nervoso central (LIMA *et al.*, 2010), atividades citotóxica e antitumoral (OLIVEIRA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010), atividade anticonvulsivante (LIMA *et al.*, 2012), prevenção de mucosite oral e intestinal induzida por 5-fluorouracil e irinotecano, respectivamente (FREITAS *et al.*, 2012; ALENCAR *et al.*, 2016), ação contra choque séptico causado por infecção com bactérias patogênicas (LIMA-FILHO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2016), potencial cicatrizante (FIGUEIREDO *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2016), pro-coagulante (RAMOS *et al.*, 2012) e atividades antiedematogênica, antioxidante e antiartrite (CHAUDHARY *et al.*, 2015; CHAUDHARY *et al.*, 2016).

A composição do látex de *C. procera* apresenta uma diversidade de compostos químicos do metabolismo secundário como fenólicos variados (flavonoides, taninos), ácidos graxos e compostos aromáticos, esteroides, glicosídeos cianogênicos; além de metabólitos primários: carboidratos, incluindo amido, e diversas proteínas (HELI *et al.*, 2008; SANTOS ; VAN, 2011; JUCÁ *et al.*, 2013;). As propriedades tóxicas deste látex foram relatadas por diversos pesquisadores (MAHMOUD *et al.*, 1979; PAHWA; CHATTERJEE, 1988; EL SHEIKH *et al.*, 1991; EL BADWI *et al.*, 1998; FAHIM *et al.*, 2016 e AHMED *et al.*, 2016). Em relação a composição das proteínas do látex, são encontradas principalmente enzimas antioxidantes como superóxido dismutase e ascorbato dismutase, tendo maior atividade para superóxido dismutase. Além de apresentar

atividade quitinolítica e forte atividade proteolítica devido as proteases cisteínicas (FREITAS *et al.*, 2007). Entretanto, as propriedades tóxicas destas proteínas do látex ainda precisam ser investigadas.

Além da falta de estudos sobre a toxicidade das proteínas do látex de *C. procera*, outro fator limitante ao uso farmacológico destas proteínas seria a indução de respostas alérgicas, como visto anteriormente em nosso estudo sobre avaliação da resposta imunológica induzida por PL pelas vias subcutânea e oral (RAMOS *et al.*, 2007a). Resposta imune foi determinada com produção de IgG e IgA e repostas alérgicas através da produção de IgE e sinais de anafilaxia, por via subcutânea. Entretanto, por via oral, ausência de respostas alérgicas e baixa produção de IgG foram mensuradas. A via oral naturalmente induz tolerância imunológica, que é definida como diminuição da capacidade de um indivíduo em produzir anticorpos ou células ativadas em resposta a um antígeno quando este é conduzido a um tratamento por via oral (SAKAI *et al.*, 2006). As proteínas de *C. procera*, administradas oralmente, podem ter modulado a resposta imune negativamente, induzindo tolerância oral sistêmica, diminuindo assim a produção de IgE e, conseqüentemente, amenizando as manifestações alérgicas.

Diante do exposto, realizar uma investigação detalhada sobre as propriedades tóxicas e moduladoras das proteínas do látex de *Calotropis procera* apresenta uma grande relevância científica no momento que vem a somar com os achados do nosso grupo de pesquisa, podendo contribuir também economicamente e socialmente por fornecer subsídios para sua utilização como futuro fitoterápico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Látex e Plantas laticíferas

Semelhante a ação do sangue nos animais, os tecidos de plantas laticíferas, quando danificados, transbordam látex que coagula rapidamente quando exposto ao ar (AGRAWAL & KONNO *et al.*, 2009).

Látex, armazenado em tecidos chamados laticíferos, contém muitos compostos fitoquímicos, tais como proteínas, ácidos graxos, óleos, amidos, açúcares, resinas, gomas e poliisopreno, alcaloides, esteróis, taninos, além de possuir também muitas proteínas enzimáticas como proteases cisteínicas, serínicas, quitinases, oxidases, glucosidades, lipases, esterases, trombinas, plasminas, peroxidases, lectinas, inibidores de proteases e diversos alérgenos (VAN DIE, 1955; SANTOS; VAN, 2011; HELI *et al.*, 2008).

Cerca de 10% das espécies de angiospermas libertam fluidos laticíferos quando seus tecidos são danificados (NASCIMENTO *et al.*, 2016). Entretanto, somente seringueira (*Hevea brasiliensis*) é utilizada comercialmente como fonte de borracha natural, devido ao seu excelente rendimento e propriedades físicas (AOKI *et al.*, 2014).

A borracha natural é produto do processamento do citosol, da árvore *Hevea brasiliensis*, sendo que 90% dos produtos desta espécie são processados por coagulação ácida, dando origem a produtos como pneus de automóveis. Os outros 10% são processados por adição de amônia sem coagulação, que origina produtos como luvas de borracha, balões e preservativos (YUNGINGER, 2009).

Os látices de outras espécies laticíferas são amplamente utilizados na medicina popular para diversos fins, como: cicatrização, dores nas articulações, controle de verminoses, entre outros fins terapêuticos (UPADHYAY, 2011).

Dentre as plantas laticíferas, as espécies estudadas por nosso grupo de pesquisa são pertencentes à família Apocynaceae como *Calotropis procera*, *Cryptostegia grandiflora*, *Himatanthus drasticus*, *Plumeria rubra* e *Thevetia peruviana*.

Himatanthus drasticus é conhecida popularmente como Janaguba, sendo indicada para enfermidades como úlcera gástrica, câncer, cicatrização de feridas, verminoses, artrite e laxante (BITU *et al.*; 2015) (Figura 1). Apresenta propriedades

farmacológicas comprovadas cientificamente como ação anti-inflamatória e de antinocicepção (LUCETTI *et al.*, 2010; MATOS *et al.*, 2013), e atividade antitumoral (MOUSINHO *et al.*, 2011). *Calotropis procera* também possui diversas propriedades farmacológicas, atribuídas a várias partes da planta, tendo seu látex diferentes compostos bioativos, incluindo glicosídeos, taninos, proteínas e isopreno, entre outros (JUNCKER *et al.*, 2009).

Figura 1 - Planta *Himatanthus drasticus* (Mart.)



Fonte: www.plantaslaticiferas.ufc.br (2017).

Plumeria rubra, nomes populares jasmim, árvore-pagode, frangipane, é usado popularmente com fins medicinais para tratar ou aliviar febre, frio, infecções cutâneas, distúrbios gastrointestinais e hepatite (ALENCAR *et al.*, 2015) (Figura 2). A fração proteica obtida do látex desta planta foi caracterizada quanto suas atividades proteolíticas (SOUSA *et al.*, 2011) e enzimáticas relacionadas ao metabolismo antioxidante (FREITAS *et al.*, 2010). Adicionalmente, foram determinadas atividades como ação repelente sobre insetos (RAMOS *et al.*, 2011) e prevenção de lesões gástricas induzidas por etanol (ALENCAR *et al.*, 2015).

Figura 2 - Planta *Plumeria rubra* Linn.



Fonte: www.plantaslaticiferas.ufc.br (2017).

Cryptostegia grandiflora (conhecida como bombom ou alamanda), arbusto encontrado em regiões tropicais. A planta produz látex que é liberado após danos em pequenos ramos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009) (Figura 3). Existem poucos relatos sobre os constituintes químicos ou atividades presentes no látex desta planta. Entretanto, suas proteínas mostraram potente atividade larvívica sobre *Aedes aegypti* (RAMOS *et al.*, 2009), além disso, seu látex modulou processo inflamatório em ratos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009) e suas proteases cisteínicas conferiram atividades fibrinogénolítica e pró-coagulantes *in vitro* (VIANA *et al.*, 2013).

Figura 3 - Planta *Cryptostegia grandiflora* R. Br.



Fonte: www.horsedvm.com (2017).

Por fim, *Thevetia peruviana* (conhecida como chapéu de napoleão) é uma árvore pequena de 2-6 m de altura, perene, com uma ampla distribuição geográfica e ecológica, sendo suas partes usadas para fins medicinais pela medicina Indiana (SAMANTA *et al.*, 2016) (Figura 4).

As principais frações da folha de *T. peruviana* foram relatadas por apresentarem aucubina, ácido ursólico e cardenólideos. A planta é fonte principalmente de terpenóides e glicosídeos cardíacos (KOHLS *et al.*, 2012) e sua ingestão acidental pode causar problemas gástricos intestinais como náuseas, vômitos e dores abdominais (BANDARA *et al.*, 2010). Recentemente foi identificado no látex desta planta, uma proteína tipo germina com atividade peptidase cisteínica, uma atividade desconhecida para esta família de proteína, até o momento (FREITAS *et al.*, 2016).

Figura 4 - Planta *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum.



Fonte: www.plantaslaticiferas.ufc.br (2017).

Apesar dos avanços conferidos aos estudos com plantas medicinais, muitas terapias com estas plantas ainda são suportadas por descobertas empíricas (GURIB-FAKIM, 2006), sendo necessários mais estudos sobre suas propriedades fitoterápicas, assim como seus efeitos tóxicos e imunológicos adversos.

2.2 *Calotropis procera*

Calotropis procera (Ait.) R.Br. é um arbusto pertencente à família Apocynaceae, nativo de regiões tropicais, explorado principalmente pelos povos indígenas (FIGUEIREDO *et al.*, 2014). Teve sua origem na Índia, sendo disseminada para outras partes do mundo como planta ornamental. Essa espécie pode ser encontrada nas regiões áridas e semi-áridas da Ásia, África e Sul da América, incluindo o Brasil (KAKKAR *et al.*, 2012). Seu crescimento se dá em solos secos, arenosos e em climas quentes, podendo também crescer como erva daninha em terrenos agrícolas (ABHISHEK *et al.*, 2010). No Brasil, *C. procera* é conhecida como

algodão de seda, paninha de seda, leiteiro, queimadura e jacaúna, sendo no Ceará mais conhecida como ciúme, flor de seda e hortêncica (VIANA, 2011) (Figura 5).

Figura 5 - Aspectos gerais da planta *Calotropis procera* (Ait.) R.Br.



a. Planta, b. inflorescência e fruto globoso, c. sementes ligadas a fios de seda e d. folha exsudando látex. Fonte: www.plantaslaticiferas.ufc.br (2017).

Nos fluidos laticíferos de *C. procera* já foram identificados diversos compostos como cardenólídeos, alcaloides, carboidratos, esteroides, terpenos, carbonatos orgânicos, proteases cisteínicas, quitinases, osmotinas, inibidores de proteases entre outros (FREITAS *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2011), fazendo deste látex uma potente fonte de compostos com atividades farmacológicas.

Todas as partes desta planta apresentam diversos usos medicinais, sendo utilizadas pela população no combate de doenças como febre, reumatismo, indigestão, tosse, resfriado, eczema, asma, elefantíase, náuseas, vômitos, diarreia

(ABHISHEK *et al.*, 2010), bem como no tratamento da hanseníase, doenças de pele, úlceras, hemorroidas, tumores, doenças do baço, do fígado e do abdome (KRITIKAR; BASU, 1999). Contudo, ainda faltam comprovações científicas para muitas atividades descritas popularmente.

A primeira atividade farmacológica do látex de *C. procera*, comprovada cientificamente, foi reportada por Kumar & Basu (1994), que mostraram seu potencial anti-inflamatório após inibição de edema de pata induzido por carragenina e formalina. Em seguida, determinou-se o potencial angiogênico e mitogênico (RASIK *et al.*, 1999) e mais tarde, ação analgésica através da inibição de contorções abdominais induzidas por ácido acético em ratos (DEWAN *et al.*, 2000).

Ação antidiarreica do látex de *C. procera* em ratos que receberam óleo de mamona, também foi determinada (KUMAR *et al.*, 2001), assim como efeito antipirético alcançado pelos extratos aquosos do látex de *C. procera* (LARHSINI *et al.*, 2002). Ademais, extratos alcoólicos do látex de *C. procera* conferiram proteção ao infarto do miocárdio quando administrados oralmente em ratos (MUEEN *et al.*, 2004). O látex de *C. procera* atua sobre os músculos lisos do trato gastrointestinal resultado numa diminuição no trânsito e no conteúdo intestinal (KUMAR; SHIVKAR, 2004a) e induz melhorias em ratos diabéticos através do seu potencial antioxidante e anti-hiperglicêmico (ROY *et al.*, 2005).

Na segunda metade dos anos 2000, nosso grupo uniu esforços, juntamente com os indianos, para tentar entender o potencial farmacológico e as limitações toxicológicas do látex de *C. procera*.

O látex de *C. procera* foi processado através de centrifugações e diálises, tornando-se livre da fração de borracha e retido em membranas de diálise com poros de 8.000 Da. Esta fração proteica retida foi denominada PL. Atividade antinociceptiva de PL foi determinada por nosso grupo de pesquisa (SOARES *et al.*, 2005), assim como anti-inflamatória, enquanto sua fração proteica complementar, de baixo peso molecular apresentou atividade pró-inflamatória (ALENCAR *et al.*, 2006).

PL foi exaustivamente estudada em relação à outras atividades farmacológicas, como atividade citotóxica contra linhagens de células cancerígenas (OLIVEIRA *et al.*, 2007), atividade antitumoral avaliada em camundongos transplantados com sarcoma 180 (OLIVEIRA *et al.*, 2010), ação depressora sobre o sistema nervoso central (LIMA *et al.*, 2010) e ação anticonvulsivante avaliada pelo modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol (LIMA *et al.*, 2012).

Entretanto, resultados mais relevantes foram alcançados quando se estabeleceu a capacidade das proteínas do látex em prevenir choque séptico em animais letalmente infectados com *Salmonella enterica* Typhimurium (LIMA-FILHO *et al.*, 2010), assim como o efeito fitomodulatório indutor de inflamação destas proteínas, protegendo camundongos submetidos à febre tifoide por infecção com *Salmonella* (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Adicionalmente, PL e sub-frações apresentaram papéis importantes na coagulação e homeostasia de camundongos sépticos (RAMOS *et al.*, 2012).

Atividade farmacológica, igualmente relevante, foi observada quando todos os efeitos adversos clinicamente ocasionados por mucosite oral e intestinal, foram eliminados de animais experimentais tratados com PL (FREITAS *et al.*, 2012, ALENCAR *et al.*, 2016). Além destas atividades, outras mais foram determinadas, como ação cicatrizante tópica (FIGUEREIDO *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2016), atividade antiartrite (CHAUDARY *et al.*, 2016), potencial antiedematogênico e antioxidante de sub-fração das proteínas do látex de *C. Procera* (CHAUDHARY *et al.*, 2015) e potencial imunomodulador protetor de infecção com *Listeria monocytogenes* (NASCIMENTO *et al.*, 2016).

Em todos os casos estudados, a capacidade de PL em inibir processos inflamatórios foi avaliada através da modulação de mediadores inflamatórios importantes. Diante disto, PL reuniu, preliminarmente, pré-requisitos procurados nos medicamentos modernos, como ter potencial para aplicação a mais de uma finalidade clínica. O entendimento atual sobre o uso seguro de PL está limitado aos nossos próprios estudos e, portanto, há uma necessidade em avançar este entendimento sobre os conhecimentos toxicológicos deste fitoterápico.

2.3 Toxicidade

O uso de plantas medicinais como alternativa para o tratamento de doenças vem aumentando mundialmente e ganhando popularidade em países em desenvolvimento (ROSIDAH *et al.*, 2009). Embora as plantas medicinais possam apresentar atividades biológicas benéficas aos seres humanos, o potencial de toxicidade destas substâncias sempre deve ser investigado (ALMANÇA *et al.*, 2011). Estas substâncias ditas “naturais” devem ser utilizadas com cautela, pois podem

causar reações adversas, principalmente se forem administradas em doses excessivas ou juntamente com drogas convencionais (SAAD *et al.*, 2006).

O látex possui uma composição complexa de compostos químicos e proteínas (KONNO *et al.*, 2011), o qual pode apresentar compostos tóxicos para animais e insetos. Dentre estes, os cardenolídeos são altamente tóxicos por inibirem as bombas de sódio-potássio. Estas bombas são responsáveis pela manutenção do potencial elétrico de células animais, e são particularmente importantes na manutenção da condutividade elétrica do coração (ASLANI *et al.*, 2004).

Outros componentes presentes no látex, como os alcaloides, são considerados tóxicos para animais e insetos por afetarem neurotransmissores e lectinas que se ligam às porções específicas de carboidratos, promovendo coagulação (WALDHOER *et al.*, 2004).

Apesar das inúmeras atividades farmacológicas citadas anteriormente para o látex de *C. procera*, relatos sobre sua toxicidade já vêm sendo abordado há bastante tempo na literatura. Mahmoud e colaboradores (1979), avaliaram a toxicidade aguda do látex de *C. procera* em carneiros e cabras por diferentes vias de administração, em doses únicas ou múltiplas (6 – 0,001 mL/kg). O látex foi capaz de causar mortalidade por todas as vias, para ambas espécies, causando danos severos aos rins, fígado, coração, pulmões, cérebro e intestino.

Administração oral de uma única dose do látex de *C. procera* (1,2 ou 1,5 mL/Kg) provocou a morte de cabras em até 7 horas após a aplicação (EL SHEIKH *et al.*, 1991). El Badwi e colaboradores (1998) também constataram a morte de cabras após a administração oral do látex de *C. procera* na dose de 1 mL/kg e por via intravenosa ou intraperitoneal na dose 0,005 mL/kg, entre 20 min. e 4 dias, respectivamente. Entretanto, quando a dose de 0,005 mL/kg foi administrada por via oral ou intramuscular, nenhuma morte ocorreu entre as cabras. As principais lesões detectadas foram congestão e hemorragia, cianose pulmonar, enterohepatonefropatia, peritonite (nas cabras que receberam látex pela via intraperitoneal) e mucosite hemorrágica no local da injeção do látex.

C. procera também é utilizada para fins não convencionais. A planta é utilizada para práticas de suicídio de acordo com Rutten & Statius Van Eps (1998) que relataram um caso de envenenamento intencional, assim como Kosaraju e colaboradores (2015) que também registraram casos de suicídios realizados pela população da zona rural da Índia após consumo de *C. procera*.

As propriedades inflamatórias do látex de *C. procera* também foram relatadas. Látex pode ser utilizado como modelo de indução de inflamação para avaliação do potencial de drogas anti-inflamatórias (SINGH *et al.*, 2000; KUMAR & SHIVKAR, 2004b).

Singhal & Kumar (2009) avaliaram os efeitos tóxicos de suspensão aquosa do látex em pó de *C. procera*, livre da fração de poli-isopreno (borracha), sobre a função hepática e renal de ratos. A suspensão foi administrada por 45 dias, via oral, nas doses de 10, 100 e 400 mg/kg. Nenhum efeito adverso foi observado pelos autores durante o período de tratamento, sugerindo que a fração de borracha seja a principal responsável pelos efeitos tóxicos.

Corroborando com as conclusões de Singhal & Kumar (2009), Lima e colaboradores (2011) constataram que o látex íntegro (com fração da borracha) de *C. procera*, possui propriedades cardiotoxícas e hepatotóxicas após administração intraperitoneal em ratos, na dose de 1 mL/kg. Os ratos chegaram a óbito com 2 horas após administração da amostra, apresentando fortes lesões no coração como focos de necrose por coagulação, citoplasma eosinofílico sem estrias transversais, presença de núcleos picnóticos, além de infiltração de células inflamatórias e proeminente vacuolização do sarcoplasma. Já o fígado mostrou difusa vacuolização do citoplasma, congestão sinusoidal com poucos depósitos de hemossiderose nos hepatócitos.

Recentemente, Fahim *et al.* (2016) e Ahmed *et al.* (2016) avaliaram os efeitos tóxicos do látex de *C. procera*. Fahim e colaboradores (2016), definiram DL50 do látex por via oral, em 1,32 mL/kg. Ademais, avaliaram o efeito da administração do látex de *C. procera* nas doses de 1/10 e 1/20 da DL50, em ratos por 4 ou 8 semanas. A administração do látex causou aumento sérico dos marcadores de danos renais para ambos tratamentos, de maneira dose dependente. Aumento da peroxidação lipídica e depleção do nível de glutathione nos rins, além de alterações na estrutura e integridade dos mesmos também foram observados, sendo as lesões mais deletérias ocasionadas com tempo de tratamento.

Complementarmente, Ahmed e colaboradores (2016) observaram os efeitos tóxicos no coração e nos testículos de ratos que foram tratados com látex de *C. procera*, de acordo com trabalho de Fahim *et al.* (2016). Aumento nos níveis séricos de creatina quinase, aspartato aminotransferase e lactato desidrogenase foram observados nos dois tratamentos, de maneira dose dependente. Aumento de

peroxidação lipídica, TNF- α e diminuição dos níveis de glutathiona e das enzimas antioxidantes no coração e nos testículos de ambos tratamentos foram mensurados. Além de causar perturbações na arquitetura e integridade do coração e dos testículos.

Apesar de todos os efeitos adversos relatados para o látex de *C. procera*, ainda não se sabe os efeitos tóxicos agudos ocasionados pela fração proteica deste látex, embora várias propriedades farmacológicas sejam atribuídas a mesma.

A caracterização bioquímica de PL determinou que está fração proteica é predominantemente composta por proteínas básicas (PI > 6,0), com massas variando entre 5-95 KDa, sendo as de 26 KDa, aproximadamente, as mais evidentes. Entre as enzimas antioxidantes, superóxido dismutase e ascorbato dismutase estão presentes, sendo a última em menor grau de atividade. Apresenta atividade quitinolítica e forte atividade proteolítica conferida pelas proteases cisteínicas (FREITAS *et al.*, 2007).

Atividade enzimática presente em PL é provavelmente responsável por sua resistência a fitopatógenos e insetos, apresentando toxicidade a algumas pragas como *Anticarsia gemmaralis* e *Callosobruchus maculatus*, conhecidas popularmente como lagarta de soja e caruncho do feijão, respectivamente (RAMOS *et al.*, 2007b, RAMOS *et al.*, 2010). Entretanto, quando avaliamos a digestibilidade *in vitro* e *in vivo* de PL, foi possível observar parcial digestibilidade *in vitro* e ausência de PL em material fecal de ratos tratados com PL em água de ingestão por 35 dias. Estes dados reunidos sugeriram que a toxicidade do látex deve estar relacionada com a fração de borracha (RAMOS *et al.*, 2006).

A fração proteica do látex de *C. Procera*, PL, necessita de estudos padronizados por órgãos normatizadores como OECD (Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico) e OMS (Organização Mundial da Saúde) para garantir resultados confiáveis que possibilitem seu uso de forma segura. Adicionalmente, propriedades adversas de PL, como alergenicidade, precisam ser descartadas a fim de permitir a validação do uso da mesma para fins terapêuticos.

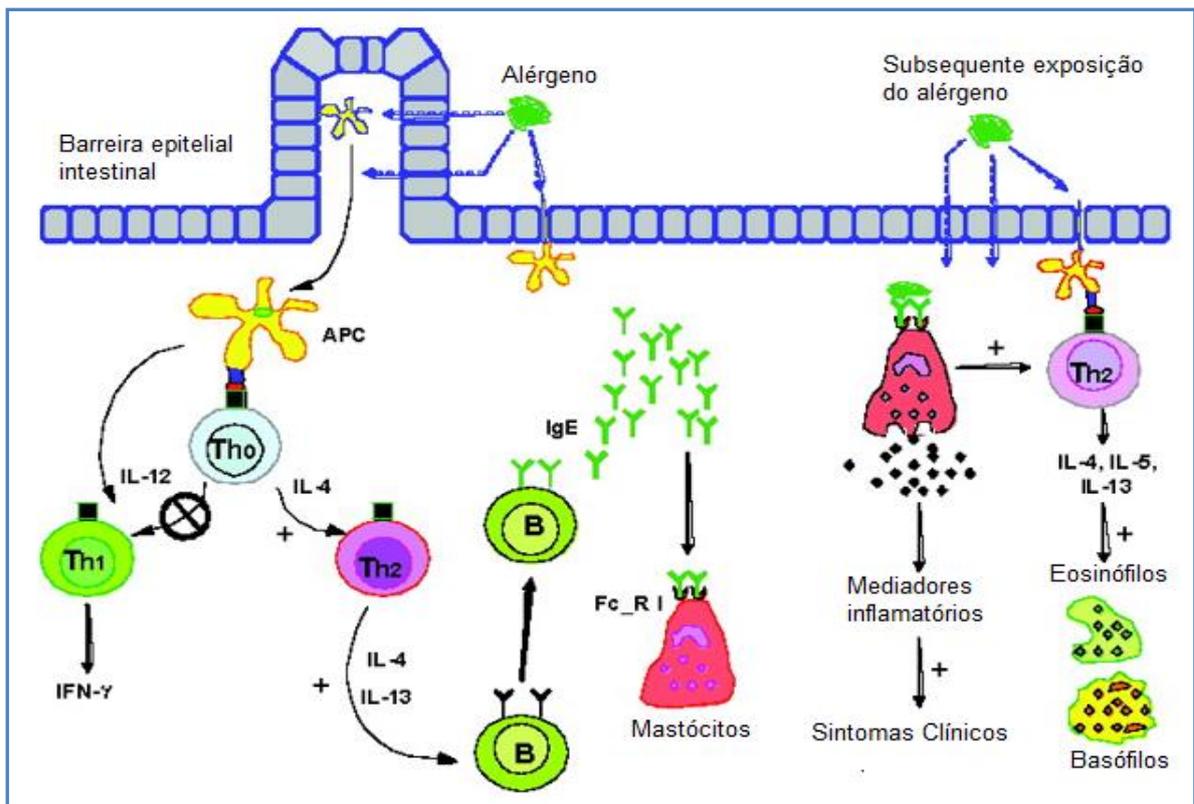
2.4 Alergia

A prevalência de doenças alérgicas está aumentando desde meados do século XX, entretanto a compreensão da causa deste aumento ainda não está

totalmente clara (GÓMEZ-CASADO; DÍAZ-PERALES, 2016). Classificada como hipersensibilidade do tipo I, alergia consiste em manifestação clínica da resposta imune contra moléculas proteicas estranhas, comumente conhecidas como alérgenos, que são indutores potentes da síntese de imunoglobulinas IgE (GOULD; SUTTON, 2008; HOLGATE; POLOSA, 2008).

Primeiramente, ocorre a fase de indução pelo antígeno (sensibilização alérgica), a qual é caracterizada pela produção de anticorpos IgE, que são distribuídos sistematicamente e associados aos mastócitos nos tecidos através de receptores de membranas plasmáticas específicos (FcεR). A exposição subsequente do indivíduo, sensibilizado pelo antígeno, promove a degranulação de mastócitos associados com IgE. Mediadores sintetizados e pré-formados são liberados provocando uma reação inflamatória sistêmica que caracteriza os sintomas clínicos da alergia (DEARMAN; KIMBER, 2009) (Figura 6).

Figura 6 - Esquema de reação de hipersensibilidade do tipo I



Legenda: APC: célula apresentadora de antígeno; Th: células T *helper*; IL: interleucinas; IFN- γ : interferon-gama; IgE: imunoglobulina E; FcεR: receptores de membranas plasmáticas específicos.
Fonte: MINE & YANG (2008).

Os alérgenos possuem enzimas ou fatores irritantes que ajudam na penetração da mucosa. Após a primeira exposição, os alérgenos são capturados pelas células apresentadoras de antígenos e são processados em fragmentos peptídicos (LI *et al.*, 2007). Estes fragmentos peptídicos são associados ao complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II), os quais são apresentados às células TCD4⁺. Essas células, também chamadas de T *helper*, se dividem em dois tipos, Th₁ e Th₂, classificadas basicamente pelo tipo de citocinas que produzem (LIPSCOMB; WILDER; MASTEN, 2007). O sinal de ativação de células B e a mudança de classe para IgE são, principalmente, induzidos por IL-4, IL-5 e IL-13, as quais são liberadas por células Th₂ (ROY *et al.*, 2013).

Nas plantas encontram-se as principais fontes de alérgenos que induzem respostas imunes mediadas por IgE (SINHA *et al.*, 2014). Alérgenos presentes em pólen, esporos e outras partes associadas das plantas são responsáveis por sintomas como rinoconjuntivite, asma, edema, urticárias e anafilaxias (MAYORAL *et al.*, 2008).

Os grupos mais comuns de alérgenos de plantas estão relacionados às proteínas de armazenamento de sementes, proteínas estruturais e proteínas relacionadas com a patogênese (PRs) (MILLS *et al.*, 2002). O látex apresenta em sua composição proteínas PRs que realizam ligações cruzadas com IgE devido a sua homologia com muitos alérgenos vegetais (ASERO, 2011), sendo o látex uma fonte de potenciais alérgenos.

Além disso, outras características peculiares aos alérgenos proteicos de vegetais podem ser ressaltadas como: compacta estrutura tridimensional, elevado número de pontes dissulfeto e glicosilações que conferem estabilidade ao sistema gastrointestinal, presença em abundância nas plantas, interação com estruturas lipídicas e pertencer a grupos específicos de proteínas (superfamília das cupinas, superfamília das prolaminas e proteínas relacionadas à patogenicidade vegetal) (BREITENEDER; MILLS, 2005).

Os principais estudos sobre alergia ao látex envolvem a espécie *Hevea brasiliensis*. Reações mediadas por IgE, contra compostos da borracha natural do látex de *H. brasiliensis*, têm sido frequentemente observadas em profissionais da saúde e da jardinagem, os quais se expõem diariamente a produtos derivados do látex (BOUSQUET *et al.*, 2006).

Em relação a fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PL), seu potencial alergênico já foi avaliado por nosso grupo de pesquisa (RAMOS *et al.*, 2007a). PL foi capaz de induzir respostas alérgicas com produção de IgE e sinais de anafilaxia, por imunização subcutânea, entretanto quando administrado por via oral, estes parâmetros não foram observados. A via de administração oral é naturalmente uma via de indução de tolerância imunológica. Provavelmente, a tolerância imunológica tenha sido induzida quando PL foi administrado por via oral em camundongos.

2.5 Tolerância Imunológica

A tolerância imunológica é o mecanismo pelo qual o sistema imune previne reatividade patológica ao próprio ou a antígenos inócuos (BLUESTONE *et al.*, 2011). Uma das formas de indução de tolerância imunológica ocorre pela administração de antígenos por via oral, denominada tolerância oral.

Tolerância oral é um permanente estado imunológico no qual exposições antigênicas, por via oral, não resultam em reações alérgicas devido à baixa reatividade a estes antígenos ou alérgenos (VAN WIJK & KINIPPELS, 2007). Ela ocorre naturalmente quando a mucosa intestinal é exposta a uma vasta quantidade de antígenos estranhos ao corpo, principalmente no momento da alimentação, tendo que discriminar entre antígenos prejudiciais, gerando resposta imune protetora, e materiais inofensivos, induzindo tolerância imunológica a estes (PABST; MOWAT, 2012).

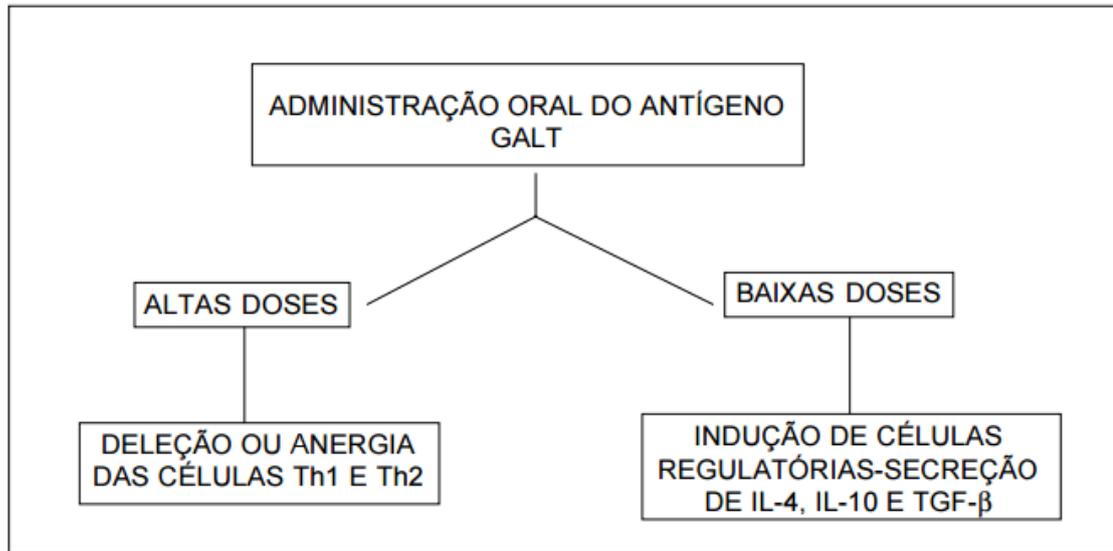
A indução e manutenção da irresponsividade a antígenos específicos inócuos, através da tolerância oral, torna-se um caminho para prevenção de respostas imunes prejudiciais ou mesmo a cura de desordens imunes como doenças alérgicas (AKDIS ;AKDIS, 2009).

O estado de tolerância oral pode ser induzido em animais por exposição de antígenos através da alimentação forçada (gavagem) ou natural, denominada tolerância inerente, ou por transferência de células T regulatórias (Tregs) de animais já tolerantes, denominada tolerância adquirida (SIMIONI *et al.*, 2004; YAMASHITA *et al.*, 2012). A tolerância inerente foi relatada como mais eficiente na supressão da resposta imune (YAMASHITA *et al.*, 2012), sendo utilizada no presente trabalho.

Vários fatores podem influenciar o processo de indução da tolerância, como a natureza do antígeno e sua solubilidade, a dose e tempo de exposição, a idade do animal experimental, a microbiota intestinal e a via de exposição do antígeno (CABRERA; URRÁ, 2015). Em relação a dose e a frequência de exposição, a tolerância imunológica pode ser induzida pela ingestão de uma única dose do antígeno, em altas concentrações (5-100 mg), ou pela ingestão de repetidas doses do mesmo, em baixas concentrações (0,5 – 1 mg/dia) (TANG; MARTINO, 2013). Administrações de altas doses favorecem o processo de deleção clonal ou anergia, enquanto múltiplas doses baixas do antígeno estão relacionadas com supressão da resposta imune mediada por células T (WEINER *et al.*, 2011).

Anergia ocorre quando células apresentadoras de antígenos (APCs) não expressam moléculas co-estimulatórias, anulando a reatividade das células T frente ao antígeno (MELO; CARVALHO, 2009). Células T anergizadas persistem na periferia, mas com baixa capacidade de expansão clonal e para sintetizar um completo repertório de citocinas contra antígenos, restringindo-se a produção de IL-10 (TANG; MARTINO, 2013). Deleção clonal é um processo de apoptose ou inativação de linfócitos T autoreativos no timo, estando desta forma envolvido na tolerância imunológica aos antígenos próprios (MELO; CARVALHO, 2009). Já as células Tregs participam da tolerância imunológica através da supressão das células T efetoras, bloqueando a ativação e a função destes linfócitos, controlando a resposta imunológica aos antígenos próprios e não-próprios (SOJKA *et al.*, 2008) (Figura 7).

Figura 7 - Mecanismo de indução da tolerância oral



Legenda: Th: células T helper; IL: interleucinas, TGF- β : fator de transformação do crescimento beta. Fonte: BUENO & PACHECO-SILVA (1999).

De fato, a tolerância oral ainda não está totalmente esclarecida em relação ao seu mecanismo de ação. Apesar da regulação imunológica de Tregs estar relacionada com exposições antigênicas contínuas em baixas concentrações, já se sabe que estas células regulatórias também podem exercer papel importante na tolerância induzida por altas doses (TANG; MARTINO, 2013).

Vários subtipos de células Tregs estão envolvidos na tolerância oral, incluindo células Th₃ secretoras de TGF- β , células Tr₁ secretoras de IL10 e células CD4⁺ CD25⁺/FOXP3⁺ (KARLSSON *et al.*, 2010). O balanço efetivo entre células efetoras e reguladoras no intestino, aparentemente, regulam a tolerância a alérgenos da alimentação. Conseqüentemente, falhas na indução de células Tregs na lâmina própria implicam no desenvolvimento de alergias alimentares (SHREFFLER *et al.*, 2009).

O sistema de tolerância oral pode ser mensurado pela supressão da resposta imune humoral, através dos níveis de anticorpos séricos (IgE, IgG1, IgG2a e IgA) e da resposta celular pelo controle de células T e suas citocinas, assim como da reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) (PABST; MOWAT, 2012).

As citocinas Th₂ como IL-4, IL-5 e IL-13 estão relacionadas com as principais reações alérgicas, que levam a hipersensibilidade do tipo I mediada por IgE (ROY *et al.*, 2013). Quando a tolerância é estabelecida, os níveis de IgE são

suprimidos de forma significativa (BAEK *et al.*, 2017), evitando a liberação de mediadores que provocam reações inflamatórias sistêmicas. Apesar das reações alérgicas serem caracterizadas, principalmente, pelo aumento sérico dos níveis de IgE, os anticorpos IgG e IgA também estão *envolvidos* neste tipo de reação. Aumento de complexos imunes envolvendo IgG, IgE e IgA foram encontrados em pacientes com asma (KURMA *et al.*, 2012).

IgA é uma imunoglobulina chave na imunidade mucosal e está envolvida nos mecanismos de proteção e homeostasia do intestino (CERUTTI, 2008). Camundongos transgênicos, com baixa produção de imunoglobulinas poliméricas (IgA e IgM), mostraram-se predispostos ao desenvolvimento de anafilaxia após sensibilização parenteral (KARLSSON *et al.*, 2010). A importância da diminuição dos níveis de Igs (IgE, IgG e IgG1) e da produção controlada de IgA, induz o estabelecimento da tolerância oral.

Tolerância oral também está relacionada com a supressão tanto de subtipos de células Th1 como Th2. IFN- γ é uma citocina estimulante do perfil de resposta Th1. Modelos animais de artrite foram tratados com *Lactobacillus casei* e desenvolveram tolerância através da supressão da resposta imune Th1 com diminuição nos níveis de IFN- γ (SO *et al.*, 2008).

Já as citocinas IL-4 e IL-10 estimulam a resposta Th₂. IL4 é a principal citocina responsável pela indução de diferenciação de células T CD4⁺ em Th₂, atuando nas reações alérgicas e nas parasitoses (BAEK *et al.*, 2017). IL10 é uma citocina imunossupressora que possui papel fundamental na manutenção da tolerância, apresentando diferentes ações sobre a supressão das respostas humorais e celulares. Ela é capaz de suprimir a produção de IgE, migração de mastócitos, basófilos e eosinófilos para o tecido (WAMBRE *et al.*, 2012). A quantificação de IL10 e TGF- β , produzidas por células Tregs FoxP3⁺, e relação entre as respostas Th₂/Th₁ foram utilizadas para mensurar a indução da tolerância oral (LING *et al.*, 2004; FAITH *et al.*, 2003).

Ademais, IL-10 apresenta papel importante na supressão da resposta DTH através da ação das células T CD4⁺ e CD25⁺ (Wang *et al.*, 2016). DTH tem sido comumente usada como parâmetro para avaliar a imunidade celular em relação a estados de infecções e vacinação. Esta reação de hipersensibilidade ocorre devido as células imunocompetentes como linfócitos T CD4⁺, linfócitos T citotóxicos; macrófagos e outras células secretoras de citocinas inflamatórias, as quais migram

para o local de aplicação da amostra, causando recrutamento celular, edema e proliferação de fibroblastos (SCHIJNS *et al.*, 2001). As reações de hipersensibilidade do tipo tardia têm sido reconhecidas como um parâmetro primordial para avaliar a indução da tolerância oral (KUMAR *et al.*, 2014). A tolerância oral induzida por administrações orais de ovalbumina (OVA) foi reportada por suprimir DTH completamente em camundongos (KARLSSON *et al.*, 2010).

Outro parâmetro para avaliar respostas de alergenicidade, assim como de tolerância, é o estado inflamatório do intestino. O epitélio intestinal, em boas condições de saúde, forma uma barreira dinâmica que exclui antígenos e microrganismos, representando a primeira linha de defesa para a manutenção da imune homeostasia no intestino. Em adição, as células epiteliais possuem funções regulatórias que podem direcionar a resposta imune para tolerância ou inflamação (TANG; HSIAO, 2016). O processo inflamatório alérgico envolve a presença de infiltrados celulares, hiperplasia de células produtoras de muco, aumento do número de células de Paneth, espessamento da camada muscular, alongamento de criptas e atrofia de vilosidades (NAKAJIMA-ADACHI *et al.*, 2006). Quando o antígeno atua na indução da tolerância imunológica, estes sintomas são atenuados ou não observados.

PL administrado por via oral não induziu reações alérgicas em camundongos, de acordo com nosso trabalho mencionado anteriormente (RAMOS *et al.*, 2007). A hipótese de indução da tolerância oral necessita de confirmação, visto inúmeras propriedades farmacológicas atribuídas a PL, para que juntamente com o estudo de toxicidade possam contribuir para validação do uso seguro desta fração proteica como fitoterápico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a toxicidade e o potencial de induzir tolerância oral das proteínas do látex de *Calotropis procera in vivo*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil comportamental de camundongos Swiss submetidos a doses agudas de PL por via oral e intraperitoneal;
- Determinar parâmetros fisiológicos, bioquímicos e hematológicos de camundongos Swiss em exposição aguda de PL por via oral e intraperitoneal;
- Analisar perfil histológico dos órgãos vitais de camundongos Swiss em avaliação de toxicidade aguda;
- Avaliar o papel das proteases de PL na toxicidade pela administração intraperitoneal;
- Verificar se há indução de tolerância imunológica às proteínas de *C. procera* quando administradas previamente por via oral em camundongos BALB/c;
- Caracterizar o perfil hematológico dos camundongos BALB/c em protocolo de tolerância oral;
- Quantificar anticorpos IgA, IgG, IgG₁, IgE no soro de camundongos BALB/c em diferentes dias do período de tratamento de indução da tolerância oral;
- Avaliar parâmetros de alergenicidade como – perda de peso, sinais de anafilaxia e diminuição da temperatura corpórea;
- Avaliar o desenvolvimento de reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) em camundongos BALB/c sensibilizados por via oral, imunizados por via ip e desafiados por via sc com proteínas de *C. procera*;
- Mensurar peso relativo dos órgãos linfoides como baço e timo e analisar perfil histológico do intestino delgado de camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de tolerância oral;
- Determinar o perfil de citocinas IL4, IL10 e IFN- γ em homogenato do baço de animais submetidos ao protocolo de tolerância oral.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

Marcadores de Massa Molecular, persulfato de amônio, membrana de diálise com poro de exclusão de 8.000 Da, acrilamida, bis-acrilamida, azocaseína, pepsina (E.C. 3.4.4.1) Ref. P6887 16 , extraída da mucosa estomacal de suínos e tripsina (E.C. 3.4.2.1.4) Ref.(T-8253), extraída de pâncreas bovino, hidróxido de alumínio, mouse IgE ELISA Kit (RAB0799), mouse IL-4 ELISA Kit (RAB0299), mouse IFN-gamma ELISA Kit (RAB0224), IgG e IgA de coelho anti-mouse conjugado com fosfatase alcalina, p-nitrofenil fosfato dissódico foram obtidos da Sigma-Aldrich, Brasil. DuoSet® ELISA Kits IL10 (M1000B) foi obtido de R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA. Kits Labtest: Transaminase oxalacética (TGO/AST), Transaminase pirúvica (TGP/ALT), Creatinina color/p. final, Ureia , ref.: 52; 53; 35 e 27, respectivamente. A coluna de troca iônica Mono-Q e a coluna de fase reversa tipo C18 marca HICROM, foram obtidas da GE HealthCare, Brasil. Ditiotreitól (DTT), dodecil sulfato de sódio (SDS), iodoacetamida (IAA), resina de troca iônica CM-Sepharose Fast Flow foram obtidos da Amersham Bioscience, USA. Tween 20 e Albumina Sérica Bovina (BSA) foram obtidas de INLAB, Brasil. Os demais reagentes foram de grau analítico e de diferentes fornecedores.

4.1.2 Material Vegetal

A planta *Calotropis procera* (Ait.) R.Br., pertencente à família Apocynaceae, foi identificada pelo Professor Edson de Paula Nunes, taxonomista do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará e foi depositada sob exsicata de número 32663. A coleta do látex foi realizada nos arredores da região metropolitana de Fortaleza-CE.

4.1.3 Animais

Camundongos fêmeas Swiss (*Mus musculus*) oriundos de colônias do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará foram utilizados no presente trabalho para os ensaios de toxicidade. Para os ensaios de tolerância oral foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c (*Mus musculus*), provenientes do Biotério Central da Universidade de Fortaleza. Os animais foram mantidos na sala de experimentação animal do Laboratório de Plantas Laticíferas, na Universidade Federal do Ceará em caixas plásticas à temperatura ambiente (25°C), umidade entre 50-60% e submetidos a 12 horas de luz e 12 horas de escuro, recebendo ração e água à vontade.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará sendo aprovado com número de protocolo nº8/2016. Os animais foram manipulados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2 Métodos

4.2.1 Etapa I: Extração e caracterização bioquímica de proteínas do látex de *Calotropis procera*

O látex de *Calotropis procera* foi processado para obtenção da fração proteica do látex (PL). Esta fração foi utilizada nas demais etapas do trabalho. Subfrações (PL-PI e PL-PII) de PL também foram obtidas, através de cromatografia de troca iônica, no intuito de investigar o mecanismo de ação das proteases em relação às propriedades tóxicas, quando as proteínas são administradas por via intraperitoneal.

Para a caracterização bioquímica da fração proteica, foram realizados ensaios de cromatografia, dosagem de proteínas pelo método de Bradford, eletroforese em gel de poliacrilamida e atividade proteolítica.

4.2.1.1 Coleta do látex

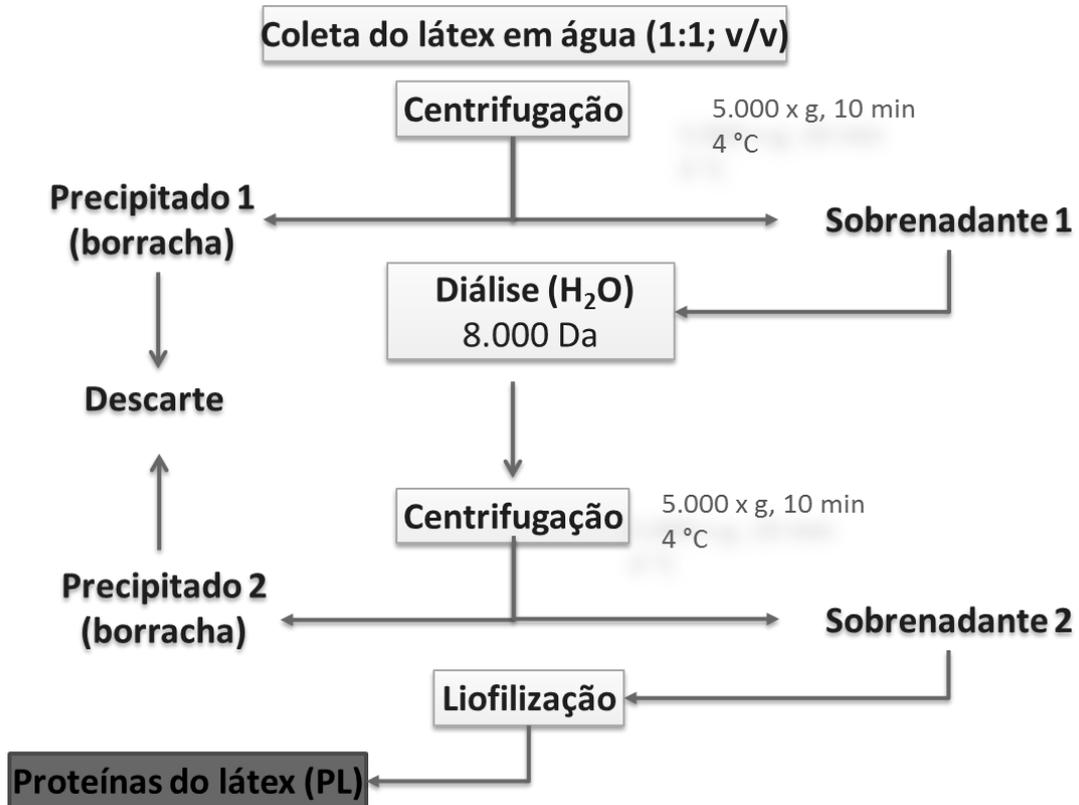
O látex de *Calotropis procera* foi coletado no período da manhã, entre 07-09 horas, através de incisões no ápice caulinar de espécimes com o auxílio de tubos do tipo Falcon, contendo 20 mL de água destilada, sendo o mesmo misturado na proporção de 1:1 (v/v). A coleta de até 20 mL pode ser obtida de um único exemplar da planta e leva em média 10-15 min. (RAMOS *et al.*, 2010).

Adicionalmente, o látex foi coletado em tubos do tipo Falcon com 20 mL de solução de iodoacetamida 30mM, e submetido ao processamento.

4.2.1.2 Processamento do látex

O látex de *C. procera*, após coleta em água, foi centrifugado a 5.000 x g por 10 min. a 4° C. O precipitado obtido foi descartado e o sobrenadante submetido à diálise em membranas com poros de 8.000 Da, contra água destilada a 4°C durante três dias (com três trocas de água por dia, totalizando 9 trocas). Após a segunda centrifugação, nas mesmas condições acima, o sobrenadante límpido e completamente desprovido de borracha foi obtido (ALENCAR *et al.*, 2006). Esta fração designada como Proteínas do Látex (PL) foi submetida ao processo de liofilização e posteriormente armazenada para demais análises (Figura 1). O látex coletado em solução de iodoacetamida e processado conforme figura 1, foi designado como Proteínas do Látex inibidas com iodoacetamida (PL IAA).

Figura 8 - Processamento do Látex para obtenção das proteínas do látex



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

4.2.1.3 Cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose

De acordo com a metodologia de Ramos e colaboradores (2006), PL foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de CM - Sepharose *Fast Flow* (14 x 2,5 cm). Inicialmente a coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0). Uma amostra de 80 mg de PL foi dissolvida em 8 mL da solução de equilíbrio e em seguida centrifugada a 10.000 x g, a 4 °C, durante 10 min., sendo o sobrenadante obtido aplicado a coluna.

Proteínas não retidas à coluna foram inicialmente eluídas com a solução de equilíbrio, obtendo-se desta forma o pico I (PL-PI). As proteínas retidas, por sua vez foram eluídas após aplicação de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) acrescido de NaCl 0,2 M para obtenção do pico II (PL-P II). Já o pico III (PL-P III) foi obtido após a aplicação, novamente, da solução de equilíbrio acrescida de NaCl 0,3

M. O fluxo de coleta das frações foi de 0,5 mL/min totalizando em um volume de 5 mL/tubo para cada fração, sendo o teor proteico determinado por absorvância em espectrofotômetro à 280 nm. O material obtido de cada fração foi reunido, dialisado e liofilizado, nas mesmas condições descritas anteriormente. As frações PL-PI e PL-P II foram avaliadas quanto ao seu grau de pureza através de eletroforese unidimensional. A fração PL-PIII não foi utilizada neste trabalho.

4.2.1.4 Análise do perfil proteico através de eletroforese unidimensional

As eletroforeses foram feitas em gel de poliacrilamida 12,5%, em condições desnaturantes. A técnica foi conduzida de acordo com o método descrito por Laemmli (1970), adaptada para o uso de géis de separação em placas.

Foram utilizados géis de aplicação com 5% de poliacrilamida, em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 1%. Os géis de separação foram feitos com tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,9, SDS 1% e 12,5% de poliacrilamida.

As amostras liofilizadas (PL, PL-PI e PL-P II) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, contendo SDS 1%, submetidas à centrifugação por 5 min a 25° C em uma centrífuga de bancada e aos sobrenadantes obtidos foram adicionados traços de azul de bromofenol 0,02% e cristais de sacarose, para a marcação da frente de corrida eletroforética.

Para a estimativa da massa molecular das proteínas em análise, foram utilizados os seguintes marcadores de massa molecular: fosforilase B (97,0 kDa), albumina sérica bovina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e alfa-lactalbumina (14,4 kDa).

As corridas foram realizadas sob as condições de 15 mA por placa e 120 V, por um período médio de 2 horas, a 25 °C, utilizando a solução de Tris 0,025 M (pH 8,3) contendo glicina 0,192 M e 0,1% de SDS como tampão de corrida. As bandas proteicas foram visualizadas após coloração dos géis com uma solução de metanol, ácido acético e água destilada (4:1:5; v:v:v) contendo o corante *Coomassie Brillante Blue R-250* (PhastGel Blue R) e revelados com uma solução contendo os mesmos componentes, porém, sem o corante.

4.2.1.5 Dosagem de proteínas

O teor de proteínas de PL foi estimado pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976). A partir de 100 µL da amostra em diferentes concentrações, adicionou-se 2,5 mL do reagente de Bradford. As misturas foram levemente agitadas e após 10 min. foram realizadas as leituras das absorvâncias a 595 nm em espectrofotômetro. A quantidade de proteínas foi estimada utilizando-se Albumina Sérica Bovina (BSA) como referência padrão para a curva de calibração.

4.2.1.6 Atividade proteolítica

Azocaseína foi utilizada como substrato para investigar a atividade proteolítica total de PL, PL inibido com iodoacetamida 30 mM (IAA), PL-PI, PL-PII e PL -PII IAA (FREITAS *et al.*, 2007).

Inicialmente, 100 µL da solução de proteínas (1 mg/mL, em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, contendo DTT 3 mM) foi incubada por 10 min. para ativação das proteases cisteínicas. Após este período, foram adicionados 200 µL de azocaseína 1% e 250 µL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 6,0). Depois de 1 hora de incubação a 37°C, a reação foi parada com TCA 10% (ácido tricloroacético), seguida de centrifugação (10.000 x g a 10 °C por 10 min). Foram retirados 400 µL do sobrenadante e adicionado 400 µL de hidróxido de sódio 2N. A cor desenvolvida foi medida a 420 nm no espectrofotômetro. Ao branco da reação, a azocaseína foi adicionada após parada da reação com TCA. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorvância em 0,01.

4.2.2 Etapa II: Avaliação de toxicidade aguda por via oral e intraperitoneal de proteínas do látex de *Calotropis Procera*

Diante de diversas propriedades farmacológicas das proteínas do látex de *Calotropis procera* (Alencar *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2010; Ramos *et al.* 2012; Oliveira *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2012; Chaudary *et al.* 2016; Alencar *et al.*, 2016), avaliar seu potencial toxicológico agudo tornou-se necessário. Os ensaios de toxicidade basearam-se nas orientações da Organização Mundial de

Saúde (OMS) e da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), de acordo com o guia para testes de produtos químicos.

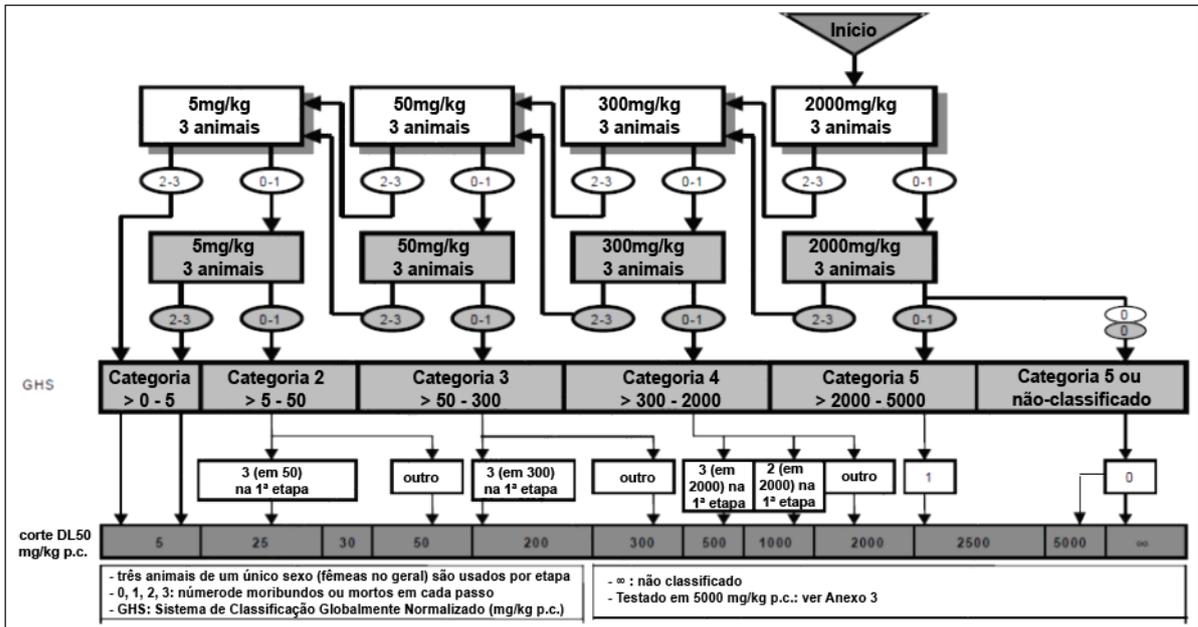
Foram realizadas exposições agudas em camundongos, por via oral e intraperitoneal, seguindo o protocolo 423 da OECD, com modificações.

4.2.2.1 Avaliação do Potencial Agudo Oral

Os testes de toxicidade aguda foram realizados de acordo com as orientações para testes de produtos químicos da OECD, número 423, de 17 de dezembro de 2001, que objetiva identificar a menor dose que cause mortalidade, verificar a faixa estimada da DL50 e classificar a substância testada em uma das cinco classes como preconiza o método de classes de toxicidade aguda.

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas saudáveis, com 8-10 semanas de idade, peso 25 ± 3 g, divididos em três grupos (n=3); grupo controle: animais que receberam solução salina (200 μ L), grupo PL 2000: animais que receberam PL (2000 mg/kg de peso corpóreo) dissolvido em salina (200 μ L) e grupo PL 5000: animais que receberam PL (5000 mg/kg) em salina (200 μ L). Segundo as orientações da OECD, a avaliação do potencial tóxico agudo de uma determinada substância, quando já existem estudos prévios sobre sua toxicidade (RAMOS et al., 2006), pode ser iniciada com administração de doses elevadas, denominadas como doses limites (Figura 9).

Figura 9 - Esquema de administração das doses em exposições de toxicidade aguda



Legenda: p.c: peso corporal. 0,1,2,3: número de animais moribundos ou mortos. GHS: Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (Sistema de Classificação Globalmente Normalizado). Este sistema classifica os produtos químicos por categorias. Cada categoria possui uma faixa onde a DL50 se enquadra, ou seja, dose capaz de matar 50% de uma população.

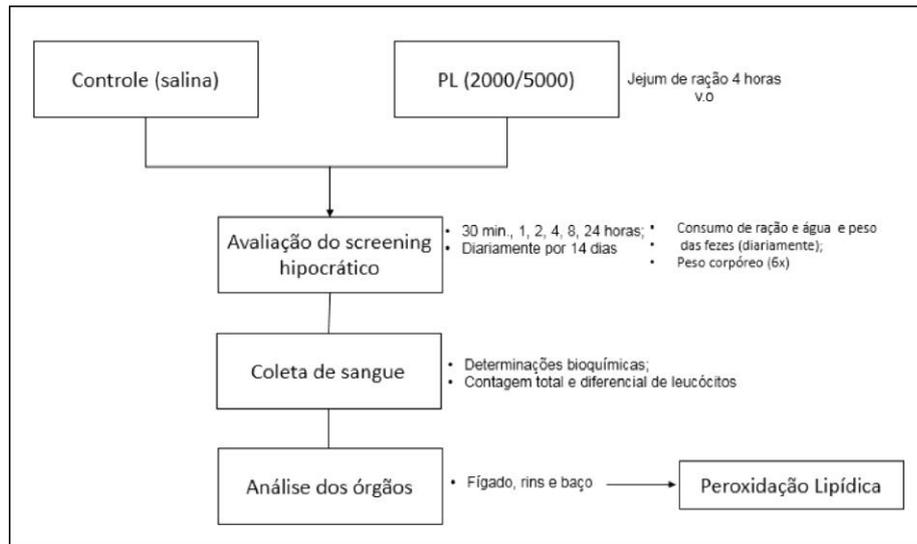
Fonte: nº423/OECD (2001).

As doses foram administradas de forma sequencial, de acordo com as recomendações preconizadas (Figura 9). Primeiramente foi administrada a dose de 2000 mg/kg em três animais, devido à ausência de morte, a dose de 5000mg/kg foi administrada a outros três animais. De acordo com o guia nº 423, substâncias que não causam morte aos animais quando administradas nas doses de 2000 mg/kg ou 5000 mg/kg são classificadas na categoria 5, o que significa que determinada substância apresenta DL 50 acima de 5000 mg/kg.

As proteínas do látex de *C. procera* foram administradas uma única vez, por via oral, precedidos de um jejum de ração, e não de água, de 4 horas e permanência de mais 1 hora de jejum após a administração da amostra (Figura 10). Os animais foram observados quanto ao seu comportamento durante as primeiras horas (0,5; 1, 2, 4, 8 e 24 horas) após a administração da amostra e diariamente durante 14 dias de acordo com o item 3.13.

Ao final do experimento, os animais foram sangrados e necropsiados, sendo o soro utilizado para posteriores análises hematológicas (item 3.14) e bioquímicas (item 3.15).

Figura 10 - Desenho experimental do ensaio de toxicidade aguda (ORAL)



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

4.2.2.2 Avaliação do Potencial Agudo Intraperitoneal

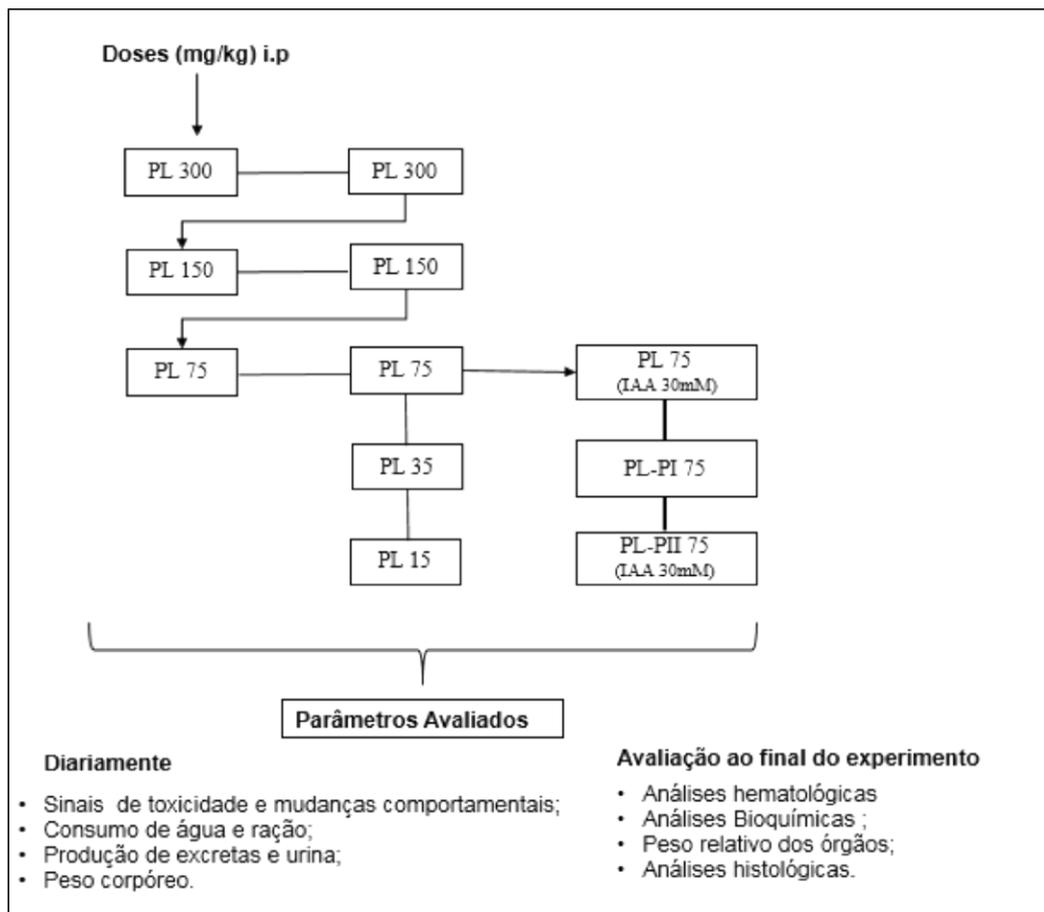
Os testes de toxicidade intraperitoneal seguiram as orientações da OECD, nº423 (2001), entretanto com algumas adaptações. A via intraperitoneal foi escolhida devido às atividades farmacológicas de PL por esta via (LIMA-FILHO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Camundongos Swiss fêmeas saudáveis, com 8-12 semanas de idade, peso 27 ± 3 g, foram divididos em grupos (n=5) de acordo como os resultados de percentual de sobrevivência obtidos para cada dose administrada. Inicialmente foi administrada a dose de 300 mg/kg, logo após doses sequenciais de 150 e 75 mg/kg foram realizadas objetivando-se identificar principalmente a menor dose que cause mortalidade. Novos ensaios com a mesma dose foram realizados, quando necessário, para confirmação dos resultados obtidos.

No intuito de investigar se os efeitos tóxicos devem-se às proteínas cisteínicas, presentes em PL, alguns grupos experimentais adicionais foram realizados na dose de 75mg/kg adicionada de iodoacetamida (30 Mm) e em

paralelo, a administração de mais duas doses menores, 35 e 15mg/kg sem iodoacetamida. Frações cromatográficas também foram administradas, denominadas PL-PI e PL-PII na dose de 75 mg/kg, sendo PL-PII com iodoacetamida. A iodoacetamida é uma substância que promove a inibição de proteases cisteínicas, as principais proteases presentes no látex de *C. procerca* (Freitas *et al.*, 2007). Já em relação aos picos cromatográficos escolhidos, PL-PI não apresenta atividade proteolítica, entretanto PL-PII possui esta atividade, podendo assim investigar se possíveis sintomas tóxicos estão relacionados às proteases (Ramos *et al.*, 2012). O desenho experimental do ensaio de toxicidade aguda por via intraperitoneal encontra-se na figura 11.

Figura 11 - Desenho experimental do ensaio de toxicidade aguda (INTRAPERITONEAL)



Legenda: PL (15-300): proteínas do látex de *C. procerca* administradas na dose de 15-300 mg/kg por via intraperitoneal; PL-PI e PL-PII: frações proteicas referentes aos picos cromatográficos PI e PII; IAA: iodoacetamida. Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O grupo controle recebeu somente salina em volume de 200 µL e os demais grupos tiveram suas amostras (PL e frações) dissolvidas em 200 µL de salina.

Semelhante ao procedimento adotado na toxicidade por via oral, os animais foram mantidos em jejum de ração por 4 horas antes da administração da amostra e permaneceram mais 1 hora após a administração da mesma. Observações comportamentais sistemáticas foram realizadas (item 4.12), assim como análises hematológicas (4.13), bioquímicas (4.14) e histológicas (4.15).

4.2.2.3 Observações Comportamentais e Necropsia

Observações comportamentais sistemáticas foram realizadas avaliando o *screening* hipocrático, sendo os seguintes parâmetros avaliados: atividade geral (frequências de locomoção e levantar dos animais), frêmito vocal, irritabilidade, reflexo das córneas, reflexo auricular, resposta ao aperto de cauda, resposta ao toque, contorção, posição do trem posterior, reflexo de endireitamento, tônus corporal, força para agarrar, ataxia, tremores, convulsões, enrijecimento da cauda ou cauda ereta (*straub tail*), hipnose, anestesia, ptose, lacrimação, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração e cianose que englobam características relacionadas ao sistema nervoso central e autônomo, ao sistema psicomotor e ao sistema sensorial. Estas observações foram mensuradas em escores (0-4), segundo Brito (1994) (anexo I).

O peso corpóreo foi avaliado no primeiro dia, antes da administração das amostras, e por mais cinco vezes no decorrer dos 14 dias. As quantidades de ração e água consumidas e peso das fezes foram mensurados diariamente. Após 14 dias de avaliação, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cetamina (60mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) e amostras de sangue foram coletadas para a realização das análises hematológicas e bioquímicas.

Os animais foram sacrificados por inalação de Halotano® e os órgãos fígado, baço e rim direito foram retirados para ensaio de toxicidade oral e ensaios iniciais de toxicidade intraperitoneal, entretanto, na avaliação de algumas doses por via i.p, além dos referidos órgãos, adicionalmente foram retirados os pulmões e coração. Os órgãos foram pesados para verificação do peso relativo e analisados macroscopicamente quanto a quaisquer lesões ou necroses existentes. Uma fração

do fígado foi pesada e congelada rapidamente em nitrogênio líquido e armazenada a - 80°C para posterior análise de peroxidação lipídica. A fração restante do fígado e os demais órgãos de forma íntegra foram armazenados em solução de formol a 10% para posteriores análises histológicas.

4.2.2.4 Análises Hematológicas

Amostras de sangue dos diferentes grupos (via oral e i.p) foram coletadas pelo plexo retro orbital após serem anestesiados com cetamina e xilazina, sendo uma alíquota retirada para o ensaio de contagem total e diferencial de leucócitos e o restante das amostras de sangue deixadas em repouso durante 2 horas, à temperatura ambiente, para retração do coágulo. Posteriormente, os soros foram separados dos coágulos por centrifugação 6.000 x g por 10 min., a 4° C e armazenado a -20° C para posteriores análises bioquímicas.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada, através de esfregaços corados pelo método Panótico rápido e examinados ao microscópio óptico.

4.2.2.5 Análises Bioquímicas

Nos soros, obtidos através da coleta de sangue (item 4.13), foram dosados os níveis das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), além de teores de ureia e creatina através de Kit's comerciais (Labtest) de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.2.5.1 Ensaio de Peroxidação Lipídica

O ensaio de peroxidação lipídica foi realizado, de acordo com Agar e colaboradores (1999), em amostras de fígados dos animais submetidos aos ensaios de toxicidade aguda oral e intraperitoneal. Resumidamente, o ensaio consiste em macerar com tampão cloreto de potássio 10% (pH 7,4) uma fração do fígado de camundongos. Logo após, foram retirados 250 µL desse homogenato e as amostras foram mantidas a 37° C durante 60 min. em banho-maria. Posteriormente, adicionou-se ácido perclórico 35% e submeteu-se o homogenato a uma

centrifugação de 8.000 x g por 10 min. a 4° C. O sobrenadante resultante foi misturado com ácido tiobarbitúrico 1,2% e aquecido a 98°C durante 30 min. em banho-maria. Após esse período, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente até o resfriamento e depois foram lidas a 532 nm em leitor de microplacas. Para a realização dos cálculos, foi utilizado o reagente 1,1,3,3 tetrametoxipropano como padrão, construindo-se uma curva com diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em nanomoles de MDA (malondialdeído) por grama de tecido (nmol MDA/g de tecido).

4.2.2.6 Análise Histológica

Amostras do fígado, rim direito, baço, pulmões e coração, dos grupos administrados com PL e frações por via i.p, foram coletadas e fixadas em formalina 10 % tamponada pH 7,6 e encaminhadas para laboratório de histologia. Os órgãos foram desidratados em álcool 70%, diafanizados em xilol e posteriormente imersos em parafina. Secções de 5 µm de espessura foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E) e examinadas por microscópio óptico Zeiss acoplado a uma câmera digital de alta resolução (AxioCam Icc 3). As imagens capturadas foram salvas em formato TIF pelo software Axio vision (versão 4.8.2, SP1/2011), padronizando a luminosidade, objetiva e a altura do condensador (NOURSADEGHI e colaboradores, 2008) e analisados posteriormente utilizando o software ImageJ® versão 1.4.3.67 (U.S. National Institutes of Health, USA). A presença de alterações morfológicas, lesões e/ou citotoxicidades foram alvo de investigações (MATOS *et al.*, 2013).

4.2.3 Etapa III: Avaliação da capacidade de proteínas do látex de *Calotropis procera* em induzir tolerância oral em camundongos

De acordo com os estudos realizados por Ramos *et al.* (2007), as proteínas do látex de *C. procera* induziram reações alérgicas quantificadas por via subcutânea em camundongos Swiss, entretanto, não induziram reações alérgicas por via oral. No intuito de investigar um possível efeito de tolerância oral frente às proteínas de *C. procera* foi desenvolvido, no presente trabalho, um protocolo de tolerância oral em camundongos BALB/c tratados oralmente e imunizados por via intraperitoneal com PL.

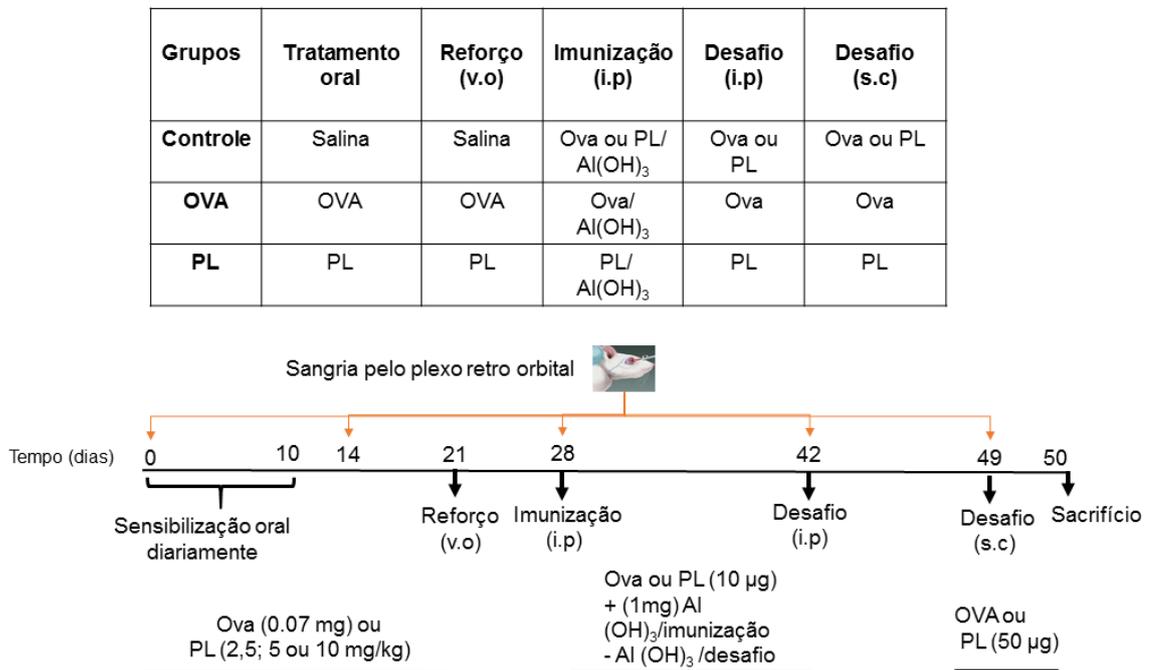
A quantificação de imunoglobulinas e o perfil de citocinas foram determinados por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), no soro e homogenato do baço de camundongos, respectivamente. Outros parâmetros também foram avaliados como sinais de anafilaxia, reação de hipersensibilidade do tipo IV, análises hematológicas e histopatológicas.

4.2.3.1 *Desenho experimental do protocolo de tolerância oral*

O protocolo de tolerância foi estabelecido de acordo com Simioni *et al.*, (2004) e Ramos *et al.*, (2007), com adaptações. Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, divididos em seis grupos (n=5). Os animais foram distribuídos da seguinte forma: Grupos Controle OVA e Controle PL: animais que não foram sensibilizados com proteínas (OVA ou PL) por via oral, receberam somente solução salina por esta via; Grupo OVA (controle positivo): animais sensibilizados por via oral através da administração de 0,07mg de ovalbumina (OVA) dissolvida em solução salina e Grupos PL 2,5; PL 5 e PL 10: animais sensibilizados por via oral através da administração de 2,5; 5 e 10 mg/ kg de peso corpóreo de PL dissolvido em salina, respectivamente.

Os animais, dos diferentes grupos, sensibilizados ou não, receberam por via oral (200 µL de PL ou OVA) diariamente, durante dez dias consecutivos. No vigésimo primeiro (21°) dia, todos os animais receberam um reforço por via oral nas mesmas condições ditas anteriormente. No vigésimo oitavo (28°) dia, os mesmos foram imunizados por via intraperitoneal (i.p) com 10 µg de PL juntamente com 1 mg de hidróxido de alumínio em 100 µl de salina. Já os grupos Controle OVA e OVA foram imunizados com 10 µg de OVA adicionado de 1 mg de hidróxido de alumínio em 100 µL de salina. No quadragésimo segundo (42°) dia, todos os animais foram desafiados nas mesmas condições da imunização, exceto pela ausência do hidróxido de alumínio. No quadragésimo nono (49°) dia, os animais foram novamente desafiados, entretanto agora por via subcutânea (s.c), com 50 µg de PL dissolvida em 50 µL de salina para todos os grupos, exceto os grupos controle OVA e OVA que foram desafiados com 50 µg de OVA em solução salina (Figura 12). Antes e 24 horas após o desafio (s.c), a espessura das patas dos animais foi mensurada para avaliar a resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), conforme item 4.21.

Figura 12 - Desenho experimental do protocolo de tolerância oral



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Todos os animais foram sangrados no início do tratamento (dia zero) e novamente no décimo quarto (14^o) dia, no vigésimo oitavo (28^o) dia antes da imunização, no quadragésimo segundo (42^o) dia antes do desafio e no quadragésimo nono (49^o) dia antes do segundo desafio.

As amostras sanguíneas foram coletadas via plexo retro-orbital dos camundongos, sob anestesia de cetamina (60mg/kg) e xilazina (8 mg/kg). Uma alíquota de sangue de cada coleta foi retirada para o ensaio de contagem total e diferencial de leucócitos como descrito no item 4.13. As amostras de sangue restantes foram destinadas à separação dos soros e armazenadas a -80°C para análises posteriores de imunoglobulinas pelo método de ELISA (item 4.17) e por anafilaxia cutânea passiva (PCA) (item 4.18).

No decorrer do experimento de 50 dias, parâmetros como peso e temperatura corpórea e sinais de anafilaxia foram registrados (item 4.19). Ao final do experimento, os animais foram sacrificados com inalação de Halotano® e necropsiados. Órgãos como baço e timo foram pesados para determinação do peso relativo, sendo o baço, após a pesagem, imediatamente congelado em nitrogênio líquido para análise de citocinas por ELISA (item 4.21).

Uma porção do intestino delgado (jejuno) foi colocada em solução de formol a 10% e processada de acordo com item 4.15. A presença de infiltrados celulares, produção de muco, formação de edema foram alvos de investigações da análise histológica.

4.2.3.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os soros obtidos pelas sangrias, de acordo com o desenho experimental (Figura 5), foram utilizados para dosar e quantificar o teor de imunoglobulinas (isotipos IgG, IgG₁, IgA e IgE). Os níveis específicos de IgG e IgA foram quantificados de acordo com Ramos *et al.*, (1996). Os níveis de IgE total foram quantificados através de kit enzimático mouse IgE ELISA (Sigma), de acordo com as instruções do fabricante. Já os níveis de IgG₁ foram quantificados através de ensaios de PCA.

Para a quantificação de IgG e IgA, placas de microtitulação com 96 poços foram sensibilizadas com 150 µL de PL dissolvida em tampão do antígeno (Na₂CO₃ 0,1M e NaHCO₃ 0,1M, pH 9,6) na concentração de 8 µg/ml (IgG) e 31 µg/ml (IgA), de acordo com estudo prévio de Ramos *et al.*, (2007a). Logo após, o material foi incubado *overnight* a 4° C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (NaCl 0,15M; KH₂PO₄ 0,003M e K₂HPO₄ 0,007M; pH 7,4; Tween 20 0,05%), secadas e bloqueadas por 1h, a 37°C, com solução de BSA (BSA 10 mg/ml em tampão PBS, pH 7,4). Feito isto, uma segunda lavagem foi realizada como já descrito. Depois, os soros obtidos dos diferentes dias de coleta foram dissolvidos no tampão de anticorpo (KH₂PO₄ 0,001M, Na₂HPO₄ 0,01M, KCl 0,002M, NaCl 0,15M, pH 7,6, Tween 20 0,025%), na proporção de 1:10.000 (IgG) e 1:5.000 (IgA), e mantidos em repouso por 2 horas a 37°C. Em seguida, uma terceira lavagem foi realizada nas mesmas condições anteriores.

Após isso, foi aplicada uma alíquota de 150 µL, em cada poço da placa, do anticorpo secundário conjugado com a enzima fosfatase alcalina, dissolvido no tampão de anticorpo em proporção de 1: 2.000. Os mesmos permaneceram em repouso por 2 horas, a 37°C. E então uma quarta lavagem foi realizada.

Em seguida, o substrato p-nitrofenil fosfato dissódico foi adicionado, juntamente com o tampão de substrato (NaCO₃ 0,05 M; NaHCO₃ 0,05 M e MgCl₂

0,01 M; pH 9,8), e mantido em repouso por 30 min a 37°C. A reação foi paralisada com a adição de NaOH 4 N e a leitura feita a 405 nm em leitor de microplacas.

Para o ensaio de IgE total, foram adicionados 100 µL dos soros diluídos em tampão de diluição (1:10.000) em placa de microtitulação com 96 poços já fixadas com anticorpo primário anti-IgE. A placa foi mantida a temperatura ambiente por 2,5 horas em leve agitação. Logo após, o soro foi descartado da placa e foram realizadas quatro lavagens com tampão de lavagem. Em seguida, 100 µL do anticorpo de detecção biotilado e diluído no tampão de diluição foi adicionado na proporção 1: 80. A placa foi mantida por 1 hora a temperatura ambiente em leve agitação. A solução foi descartada e mais 4 lavagens foram realizadas. Foram adicionadas 100µL de estreptavidina conjugada com peroxidase (1:1.200) e manteve-se a mistura incubada por 45 min. a temperatura ambiente em leve agitação. Novamente mais 4 lavagens foram realizadas. Adicionou-se então o reagente colorimétrico tetrametilbenzidina (TMB) por 30 min. a temperatura ambiente em leve agitação e na ausência de luz. A reação foi parada com adição de ácido sulfúrico 0,2 M e a leitura foi realizada a 450 nm em leitor de microplacas.

4.2.3.3 Anafilaxia cutânea passiva para IgG₁

As determinações dos títulos de anticorpos do tipo IgG₁ foram feitas em camundongos Swiss fêmeas, pesando entre 35-40g, com 6 meses de idade. A pele da região do dorso dos animais foi tricotomizada, sob anestesia com cetamina (60mg/kg) e xilazina (8 mg/kg), e as diluições dos soros dos diferentes grupos, em relação aos dias 0, 28 e 49, foram injetadas (50 µl) por via intra-dérmica em pontos previamente marcados no dorso dos animais.

Após um período de latência de 2 h, foram injetados por via endovenosa, no plexo retro orbital, 250 µl de solução salina de Azul de Evans 0,5 % contendo 250 µg do antígeno específico: PL ou OVA. Após 30 min, os ratos foram sacrificados com halotano e a pele foi dissecada para a leitura da reação feita através da visualização de manchas azuladas provocadas pelo extravasamento do corante nos locais das aplicações dos soros (FLORINDO *et al.*, 2002).

4.2.3.4 Parâmetros relacionados a manifestações alergênicas

O peso corpóreo dos animais foi mensurado no período de 10 dias do tratamento por via oral, durante 7 dias após a imunização (28° dia) e durante mais 7 dias após o desafio (42° dia). A temperatura corpórea também foi mensurada antes e 20 min. após a imunização e o desafio, utilizando um termômetro retal digital (Brasmed, Brasil).

Em relação aos sinais de anafilaxia, os mesmos foram mensurados através de uma escala com escores de 0 a 5 (KUMAR *et al.*, 2014), em que cada escore significa: sem sintomas (escore 0); coçar e esfregar em torno do focinho e da cabeça (escore 1); inchaço ao redor dos olhos e focinhos, piloereção, diarreia, redução na atividade geral e aumento da taxa respiratória (escore 2); chiado no peito, respiração difícil, cianose ao redor da boca (escore 3); perda da consciência, tremores e convulsões (escore 4) e morte (escore 5). Estes sintomas foram avaliados logo após a imunização e após o desafio por via intraperitoneal.

4.2.3.5 Determinação de reação de hipersensibilidade do tipo IV ou tardia (DTH)

No quadragésimo nono (49°) dia, os animais foram desafiados com 50 µg de PL ou OVA em 50 µl de solução salina, no coxim plantar da pata traseira direita e 50 µL de salina na pata esquerda. A espessura da pata foi medida antes e 24 horas após as aplicações utilizando-se um micrômetro digital (Forbes, 25 mm) para determinar a espessura do edema formado (STRID *et al.*, 2004).

4.2.3.6 Determinação do perfil de citocinas

As citocinas IL4, IL10 e IFN-γ foram determinadas em homogenato de baços de camundongos dos diferentes grupos. Amostras de 100 mg de baços foram adicionadas com 600 µL de tampão PBS 1x e homogeneizadas em aparelho homogeneizador de amostras (Polytron). Logo após, os homogenatos foram centrifugados a 5000 x g por 10 min. a 4° C e o sobrenadante recolhido e armazenado a -80°C para posteriores análises de citocinas (SAFIEH-GARABEDIAN *et al.*, 1995). As citocinas IL-4, IL-10 e IFN- γ foram determinadas através de kits enzimáticos (mouse IL-4 ELISA Kit e mouse IFN-gamma ELISA Kit (Sigma); ELISA

Kits IL10 (R&D Systems). Os testes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, procedimentos semelhantes ao realizado no item 3.18.

4.2.3.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão. Todos os cálculos foram realizados usando o programa estatístico *Graph-Pad Prism Software* versão 6.0. Os dados resultantes da comparação entre os diferentes tratamentos experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido dos testes de Tukey ou Bonferroni ou submetidos a Teste t de Student seguido do teste Mann–Whitney, com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Etapa I - Extração e caracterização bioquímica de proteínas do látex de *Calotropis procera*

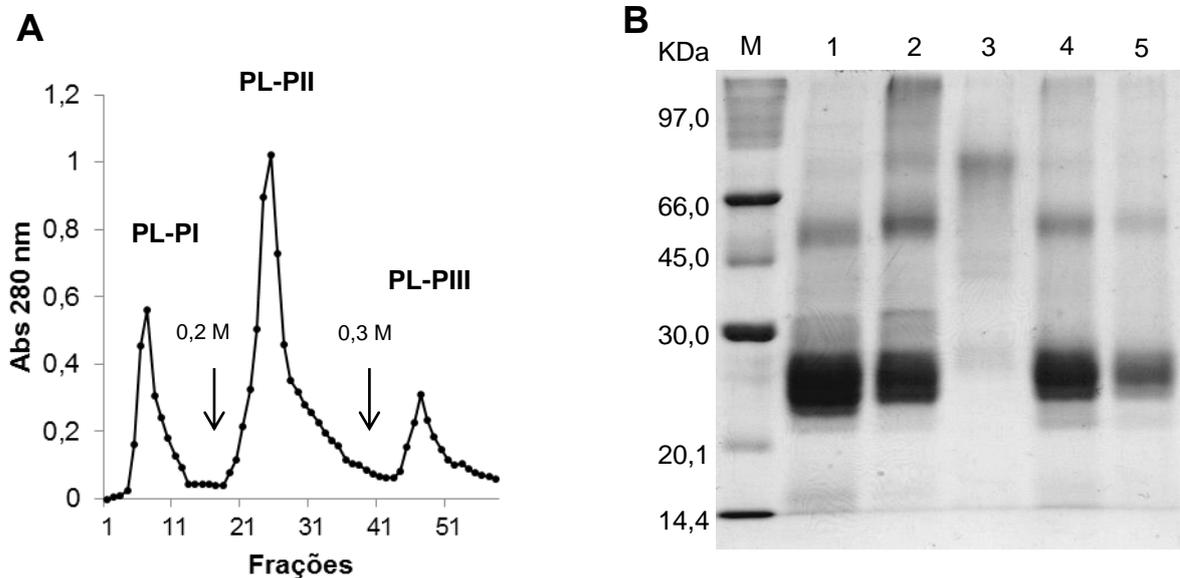
5.1.1 Cromatografia de Troca iônica

A fração proteica de *Calotropis procera* (PL) obtida no presente trabalho através da coleta e processamento do látex foi utilizada para a maioria dos ensaios *in vivo*. Entretanto para tentar compreender o efeito das proteases de PL frente à toxicidade aguda gerada quando administrada por via intraperitoneal, fez-se necessário o fracionamento através da cromatografia de troca iônica para obtenção de picos cromatográficos que pudessem ser usados nos ensaios *in vivo*.

O fracionamento das proteínas presentes em PL foi realizado com êxito através de cromatografia de troca iônica, em matriz de CM-Shepharose *fast flow* de acordo com metodologia determinada por Ramos *et al.*, 2006 (Figura 13-A). As três frações obtidas foram denominadas PL-PI, PL-PII e PL-PIII. O pico PL-PI (pico não retido) foi eluído com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5 e os picos PL- PII e PL-PIII (picos retidos) foram eluídos pelo aumento da força iônica com acréscimo de 0,2 e 0,3 M de NaCl, respectivamente. Foram escolhidas as frações PL-PI e PL-PII para utilização nos ensaios *in vivo*.

Atividade proteolítica de PL pode estar relacionada com a toxicidade aguda por via intraperitoneal. No intuito de responder esta hipótese, PL e PL-PII foram inibidas com iodoacetamida 30 mM, devido alta atividade proteolítica presente em ambas as frações. O pico PL-PIII não foi utilizado neste trabalho, pois apesar de possuir atividade proteolítica, o pico PL-PII apresenta esta atividade de forma mais expressiva, sendo suficiente, juntamente com o PL-PI (sem atividade proteolítica), para entendimento da ação das proteases por via ip. O perfil proteico de cada fração, assim como sua inibição com iodoacetamida foi avaliado por SDS-PAGE 12,5% (Figura 13-B).

Figura 13 - Perfil cromatográfico e eletroforético de PL e frações inibidas com iodoacetamida.

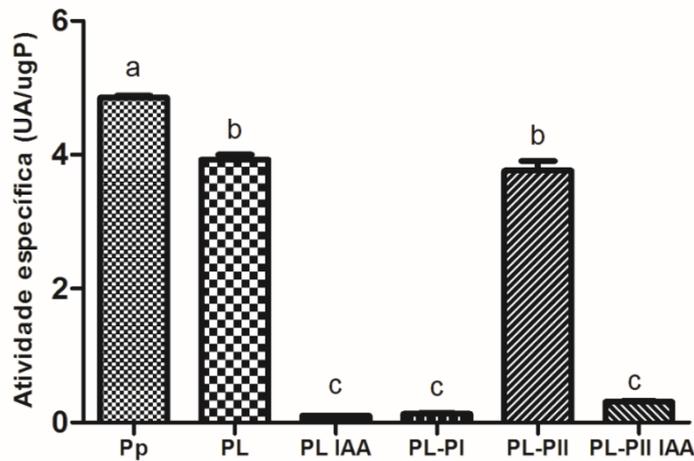


A - Cromatografia de troca iônica das proteínas do látex de *C. procera* em coluna de CM-Sepharose Fast Flow pH 5,0. As setas indicam a eluição de proteínas retidas com o tampão acetato de sódio 50 mM, contendo NaCl 0,2 e 0,3 M, respectivamente. **B** - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% de PL: proteínas do látex (1), PL IAA: proteínas do látex inibida com iodoacetamida (2), PL-PI: pico cromatográfico PI (3), PL-PII: pico cromatográfico PII (4) e PL-PII IAA: pico cromatográfico PII inibido com iodoacetamida (5). (M) Marcadores de massa molecular. Foram aplicados 25 μ L das frações no interior de cada poço, a partir de soluções de 2 mg/mL.

5.1.2 Atividade proteolítica

Foram testadas as atividades proteolíticas *in vitro* das proteínas totais de *C. procera* e de suas frações PL-PI e PL-PII, assim como de PL e PL-PII inibidas com iodoacetamida 30mM. Observou-se que PL-PI possui baixa atividade proteolítica, 97,3% menor que a das proteases da papaína (Pp). Já PL e PL-PII possuem atividades proteolíticas semelhantes às Pp (Figura 14). As mesmas foram diminuídas nas frações inibidas com iodoacetamida (PL IAA e PL-PII IAA) e foram tão baixas quanto às de PL-PI.

Figura 14 - Atividade proteolítica total de PL e frações inibidas com iodoacetamida



Dados apresentados como média \pm erro padrão. Pp: papaína (controle positivo); PL: proteínas do látex; PL IAA: proteínas do látex inibida com iodoacetamida; PL-PI: pico cromatográfico PI; PL-PII: pico cromatográfico PII; PL-PII IAA: pico cromatográfico PII inibido com iodoacetamida. Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$; ANOVA-Teste Tukey).

5.2 Etapa II - Avaliação do potencial toxicológico agudo oral e intraperitoneal de proteínas do látex de *Calotropis procera*

5.2.1 Toxicidade aguda oral

As proteínas totais do látex de *C. procera* apresentaram baixa toxicidade quando administradas por via oral nas doses limites de 2000 mg/kg e 5000 mg/kg. De acordo com o método utilizado (OECD, 2001), PL se enquadram na classe 5 sendo assim uma substância com DL50 superior a 5000 mg/kg.

Neste sentido foi verificado que, após 14 dias de administração de PL, nenhum dos animais foi a óbito. Observou-se diferenças pontuais em relação aos parâmetros que avaliaram a influência de PL sobre atividade geral, sistema psicomotor (contorção, trem posterior, reflexo do endireitamento, tônus corporais, força para agarrar e ataxia), sistema sensorial (frêmito vocal, irritabilidade, reflexo auricular, reflexo corneal, aperto da cauda e resposta ao toque) e sistema nervoso central (tremores, convulsões, *straube tail*, hipnose e anestesia), quando comparados com o grupo controle.

Para a dose de 2000 mg/kg, os animais apresentaram contorções, ou seja, movimentos vermiformes do corpo somente após duas horas de aplicação da amostra, sendo este sintoma não observado novamente ao decorrer dos 14 dias de avaliação (Tabela 1). Já para a dose de 5000 mg/kg, os animais apresentaram hipotermia na primeira hora de aplicação da amostra, com patas ligeiramente frias que retornaram a temperatura normal com uma hora após. Os mesmos animais também apresentaram comportamento fora do padrão em relação ao aperto intenso da extremidade da cauda com uma pinça, parâmetro denominado aperto de cauda. Os animais moveram-se, correram e pularam intensamente após este estímulo. Em relação aos demais parâmetros avaliados, os animais que receberam as doses 2000 e 5000 mg/kg apresentaram comportamento semelhante ao controle.

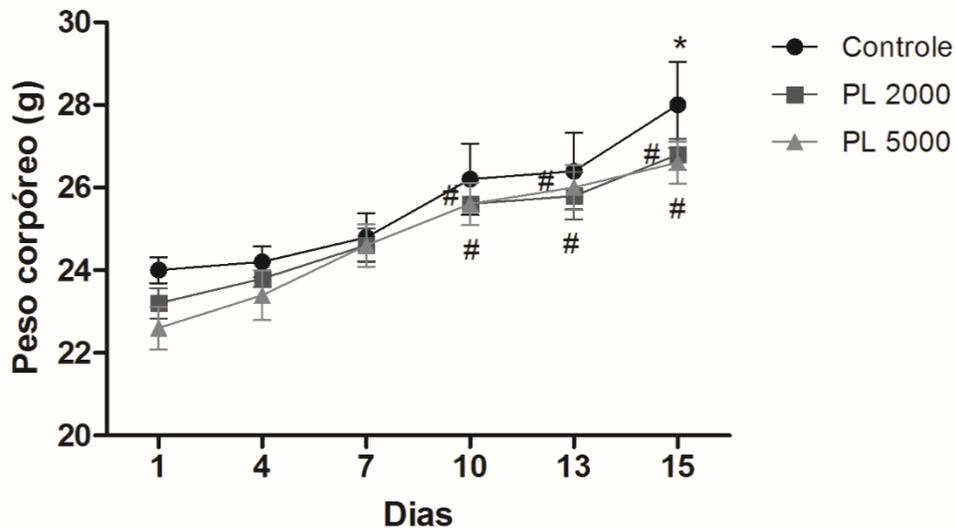
Tabela 1. Efeito de PL 2000 e 5000, administrado por via oral, sobre parâmetros comportamentais de camundongos durante a avaliação de toxicidade aguda

Grupos (mg/kg)	Sintomas de Toxicidade				Animais (M/T)
	Sistema Nervoso Central	Sistema Nervoso Autônomo	Sistema Psicomotor	Atividade Geral/Sistema Sensorial	
Controle	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	0/5
PL 2000	Nenhum	Nenhum	Contorções, 2h*	Nenhum	0/5
PL 5000	Nenhum	Hipotermia, 1h*	Nenhum	Aperto de cauda, 6d*	0/5

Dados apresentados como média \pm erro padrão (5 animais/grupo). ($p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni comparado com controle). Controle: animais que receberam v.o (salina); PL 2000 e 5000: animais que receberam v.o (2000 e 5000 mg/kg de PL, respectivamente). Sistema Nervoso Central: tremores, convulsões, cauda ereta, hipnose e anestesia; Sistema Nervoso Autônomo: ptose, lacrimação, micções, defecação, piloereção, hipotermia, respiração e cianose; Psicomotor: contorção, trem posterior, reflexo de endireitamento, tônus corporal, força de agarrar e ataxia; Atividade Geral/Sistema Sensorial: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, reflexo auricular, reflexo corneal, aperto de cauda, resposta ao toque. Nenhum: nenhum sintoma de toxicidade com diferença estatística em relação ao controle. M: morte, e T: total de animais tratados.

Os pesos corpóreos dos animais foram mensurados antes e no decorrer de 14 dias da administração das amostras (Figura 15). Os animais não perderam peso, e ainda ganharam mais peso que o grupo controle ao longo da avaliação. A perda de peso após a administração de uma substância é considerada um sinal clínico característico de toxicidade, entretanto, os animais, apesar de elevadas doses administradas, cresceram e ganharam peso como esperado no seu desenvolvimento fisiológico normal.

Figura 15 - Peso corpóreo de camundongos tratados oralmente com PL 2000 e 5000 durante a avaliação de toxicidade aguda.



Dados apresentados como média \pm erro padrão (5 animais/grupo). ($p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni). Controle: animais que receberam v.o (salina); PL 2000 e 5000: animais que receberam v.o (2000 e 5000 mg/kg de PL, respectivamente). Diferença em relação grupo controle (*) e aos grupos PL 2000 e PL 5000 (#) em relação ao primeiro dia.

Parâmetros fisiológicos como produção de fezes, produção de urina, consumo de água e ração, foram verificados durante os 14 dias de avaliação (Tabela 2). Animais tratados com PL nas doses 2000 e 5000 mg/kg exibiram perfil fisiológico semelhante ao controle.

Tabela 2 - Parâmetros fisiológicos de camundongos tratados oralmente com PL 2000 e 5000.

Parâmetros	Grupos		
	Controle	PL 2000	PL 5000
Produção de excretas (g/dia)	1,86 ± 0,09	2,02 ± 0,12	2,05 ± 0,13
Nº de pellets (nº/dia)	94,94 ± 5,21	101,3 ± 5,33	103,4 ± 5,39
Produção de urina (nº/dia)	3,53 ± 0,16	3,31 ± 0,27	3,30 ± 0,30
Consumo de água (ml/dia)	8,33 ± 0,27	8,86 ± 0,27	8,11 ± 0,19
Consumo de ração (g/dia)	4,26 ± 0,23	4,70 ± 0,28	4,51 ± 0,23

Dados apresentados como média referente aos 14 dias de avaliação ± erro padrão (5 animais/grupo). Sem diferença estatística em relação ao controle. Controle: animais que receberam v.o (salina); PL 2000 e 5000: animais que receberam v.o (2000 e 5000 mg/kg de PL, respectivamente).

Os parâmetros hematológicos foram quantificados em soros de camundongos coletados ao final do experimento (Tabela 3). A contagem total e a diferencial de leucócitos não demonstraram diferença em relação ao controle, exceto para os monócitos, os quais se encontraram aumentados nos grupos tratados. Em relação aos parâmetros bioquímicos, também não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados com PL e os não-tratados, com todos os resultados dentro da normalidade.

Tabela 3 - Parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos tratados oralmente com PL 2000 e 5000

Parâmetros	Grupos		
	Controle	PL 2000	PL 5000
Hematológicos			
Contagem Total de Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	1,80 ± 0,15	2,82 ± 0,54	1,84 ± 0,10
Linfócitos (%)	76,40 ± 1,43	75,80 ± 2,27	78,00 ± 2,96
Neutrófilos (%)	19,40 ± 1,21	14,40 ± 3,08	14,40 ± 2,84
Monócitos (%)	4,60 ± 0,51	9,80 ± 0,97*	11,40 ± 0,25*
Eosinófilos (%)	0	0	0
Basófilos (%)	0	0	0
Bioquímicos			
ALT (U/L)	62,93 ± 3,49	60,17 ± 2,21	56,10 ± 4,96
AST (U/L)	120,30 ± 3,88	117,60 ± 6,41	111,70 ± 5,05
Creatinina(mg/dL)	0,40 ± 0,04	0,50 ± 0,03	0,49 ± 0,02
Ureia (mg/dL)	55,41 ± 5,28	68,95 ± 3,45	53,71 ± 6,95
Peroxidação lipídica (nmol de MDA/g de tecido)	195,80 ± 28,63	118,90 ± 14,37	110,10 ± 20,99

Dados apresentados como média ± erro padrão (5 animais/grupo). ($p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni comparado com controle). Controle: animais que receberam v.o (salina); PL 2000 e 5000: animais que receberam v.o (2000 e 5000 mg/kg de PL, respectivamente).

O peso relativo dos órgãos vitais como fígado, rim e baço também foram medidos ao final do experimento (Tabela 4). Não houve diferenças significativas entre os pesos dos órgãos de grupos tratados com PL em relação ao controle, assim como também não houve diferenças em relação ao controle nos aspectos macroscópicos dos órgãos avaliados.

Tabela 4 - Peso relativo dos órgãos de camundongos tratados com PL 2000 e 5000

Peso Relativo	Grupos		
	Controle	PL 2000	PL 5000
Fígado	4,71 ± 0,21	4,38 ± 0,11	4,15 ± 0,15
Rim direito	0,67 ± 0,03	0,66 ± 0,03	0,64 ± 0,01
Baço	0,24 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,01
Peso Corporal (g)	28,00 ± 1,049	24,97 ± 0,55	24,80 ± 0,64

Dados apresentados como média ± erro padrão (5 animais/grupo). Sem diferença estatística em relação ao controle. Peso Relativo: (Peso do órgão / peso corporal) x100. Controle: animais que receberam v.o (salina); PL 2000 e 5000: animais que receberam v.o (2000 e 5000 mg/kg de PL, respectivamente).

5.2.2 Toxicidade aguda intraperitoneal

A avaliação de toxicidade aguda por via intraperitoneal foi realizada devido às inúmeras atividades farmacológicas encontradas por esta via e à ausência de trabalhos prévios sobre toxicidade, por esta via. Os testes de toxicidade aguda foram iniciados com a dose de 300 mg/kg. Ao aplicar PL, nesta concentração, para cinco camundongos Swiss fêmeas, todos morreram após 30 minutos de aplicação. Ressalta-se ainda o fato que logo após a aplicação da amostra os animais ficaram bastante debilitados, letárgicos, apresentando diminuição de atividade geral, andando com dificuldade e arrastando as patas traseiras (trem posterior), sem respostas a estímulos como toque e aperto de cauda, sem reflexo de endireitamento, com piloereção, hipotermia e presença de contorções intensas. Com 30 minutos decorridos da aplicação da amostra, os animais apresentaram tremores, convulsões e contorções até chegarem ao óbito. Análises macroscópicas dos órgãos vitais foram realizadas observando-se vermelhidão intensa na região do peritônio, hemorragias e lesões teciduais com focos de necrose.

A próxima dose em sequência foi 150 mg/kg. PL foi administrada em 5 animais. Todos os animais morreram entre 1 e 2 horas após aplicação da amostra apresentando sinais clínicos semelhantes aos observados para a dose de 300 mg/kg. Com 1 hora de aplicação da amostra, 2 animais já haviam morrido, com 1,5 hora mais 2 animais morreram e ao final das 2 horas o último animal morreu. Após

necropsia, a análise macroscópica demonstrou mesmas características observadas para os animais que receberam 300 mg/kg, porém com menor intensidade.

Dando continuidade ao processo de avaliação toxicológica, uma dose de 75 mg/kg foi aplicada em 5 animais, dos quais 1 morreu com 8 horas. Na primeira hora após a aplicação da amostra, o referido animal já apresentou baixa atividade geral e na segunda hora, respiração ofegante que se intensificou na quarta hora. O mesmo apresentou também piloereção, hipotermia e ausência a estímulos como toque e aperto de cauda, chegando a óbito com 8 horas após a administração intraperitoneal. Os demais animais do grupo sobreviveram durante os 14 dias de observações e apresentaram sintomas tóxicos que afetaram alguns parâmetros do sistema nervoso autônomo, psicomotor, sensorial e atividade geral até o 4º dia, mas especificamente, nas primeiras horas após aplicação (Tabela 5).

Diante do número de mortalidade mensurada no ensaio de toxicidade para a faixa de dose de 300 a 75, podemos concluir que a DL50 da substância deve estar dentro desta faixa, classificando a substância PL na categoria 3 para via intraperitoneal, a qual determina que a DL50 se enquadra numa faixa de 50-300mg/kg.

Tabela 5 - Efeito de PL 75, 150 e 300 (i.p) sobre os parâmetros comportamentais de camundongos durante a avaliação de toxicidade aguda.

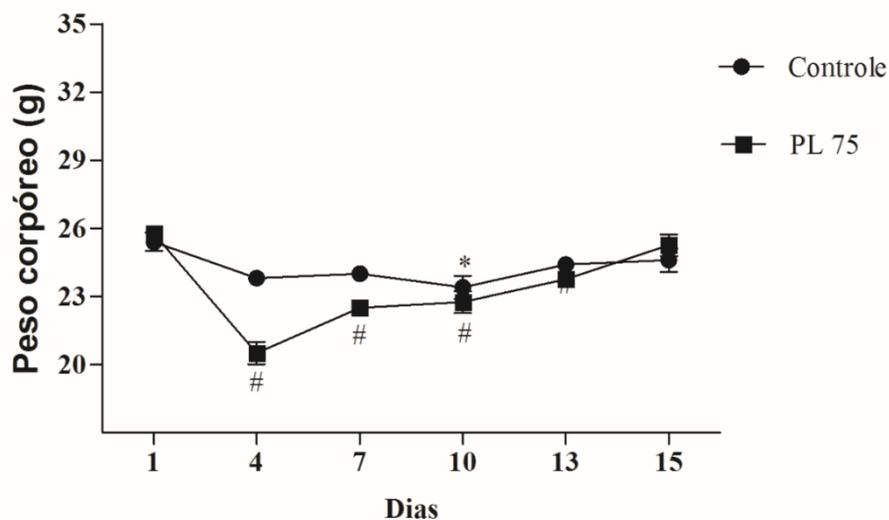
Grupos (mg/kg)	Sintomas de Toxicidade				Animais (M/T)
	Sistema Nervoso Central	Sistema Nervoso Autônomo	Psicomotor	Atividade Geral/ Sistema Sensorial	
Controle	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	0/5
PL 75	Nenhum	Piloereção, 1º dia; * Hipotermia, 30 min. e 8h; * Respiração, 8h, 1º, 2º, 3º e 4º dia; * Nº de pellets, 1º e 2º dia. *	Contorção, 30 min.; * Força de agarrar, 8 h and 1º dia. *	Atividade geral, 1, 2, 4, 8h e 1º dia; * Frêmito vocal, 4 e 8 h; * Irritabilidade, 1 h; * Aperto de cauda, 4 e 8h; * Resposta ao toque, 4 e 8h. *	1/5
PL 150	Tremores, 1h.;	Hipotermia, 30 min.; * Piloereção, 30 min. *	Contorções, 30 min.; * Trem posterior, 1 h; * Reflexo de endireitamento, 1h. *	Atividade geral, 30 min.; * Aperto de cauda, 1h; * Resposta ao toque, 1 h. *	5/5
PL 300	Tremores, 30 min.; * Convulsões, 30 min. *	Hipotermia, 30 min.; * Piloereção, 30 min. *	Contorções, 30 min.; * Trem posterior, 30 min.; * Reflexo de endireitamento, 30 min. *	Atividade geral, 30 min.; * Aperto de cauda, 30 min.; * Resposta ao toque, 30 min. *	5/5

Dados apresentados como média \pm erro padrão (5 animais/grupo). ($p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni comparado com controle). Controle: animais que receberam ip (salina); PL 75,150 e 300: animais que receberam ip (75, 150 e 300 mg/kg de PL, respectivamente). Sistema Nervoso Central: tremores, convulsões, cauda ereta, hipnose e anestesia; Sistema Nervoso Autônomo: ptose, lacrimação, micções, defecação, piloereção, hipotermia, respiração e cianose; Psicomotor: contorção, trem posterior, reflexo de endireitamento, tônus corporal, força de agarrar e ataxia; Atividade Geral/ Sistema Sensorial: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, reflexo auricular, reflexo corneal,

aperto de cauda, resposta ao toque. Nenhum: nenhum sintoma de toxicidade com diferença estatística em relação ao controle. M: morte, e T: total de animais tratados.

Os animais do grupo 75 perderam peso (Figura 16) até o 4º dia e diminuíram seu consumo de ração, produção de fezes até o 3º dia de avaliação (Tabela 6). O consumo de água só foi menor em relação ao controle no 2º dia de avaliação, tanto que a média geral de consumo foi superior à do controle. Após estes primeiros dias, todos foram se recuperando e apresentando comportamento fisiológico semelhante ao controle. Entretanto, não foram observadas alterações significativas em comparação com o controle, em relação aos dados hematológicos e bioquímicos (Tabela 7).

Figura 16 - Peso corpóreo de camundongos tratados (i.p) com PL 75 durante a avaliação de toxicidade aguda



Dados apresentados como média \pm erro padrão (5 animais/grupo). ($p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni). Controle: animais que receberam ip (salina); PL 75: animais que receberam ip (75 mg/kg de PL). Diferença em relação grupo controle ([^]) e ao grupo PL 75 ([#]) em relação ao primeiro dia.

Tabela 6 - Parâmetros fisiológicos de camundongos tratados com PL 75 (i.p)

Parâmetros	Grupos	
	Controle	PL 75
Produção de excretas (g/dia)	2,15 ± 0,31	1,95 ± 0,89*
Nº de pellets (nº/dia)	98,20 ± 8,92	90,59 ± 26,94*
Produção de urina (nº/dia)	2,45 ± 0,46	2,73 ± 0,58
Consumo de água (ml/dia)	6,54 ± 0,54	6,64 ± 1,67*
Consumo de ração (g/dia)	4,30 ± 0,65	3,91 ± 1,66*

Dados apresentados como média ± erro padrão (5 animais/ grupo). (* $p < 0.05$, T TEST-Mann Whitney comparado com controle). Controle: animais que receberam ip (salina); PL 75: animais que receberam ip (75 mg/kg de PL). Controle: animais que receberam ip (salina); PL 75: animais que receberam ip (75 mg/kg de PL, respectivamente). Diferenças observadas até o 3º dia de avaliação.

Tabela 7 - Parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos tratados com PL 75 (i.p)

Parâmetros	Grupos	
	Controle	PL 75
Hematológicos		
Contagem Total de Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	2,89 ± 1,16	2,60 ± 1,21
Linfócitos (%)	86,00 ± 3,08	82,00 ± 6,36
Neutrófilos (%)	9,00 ± 2,00	12,75 ± 5,09
Monócitos (%)	3,60 ± 1,54	4,75 ± 1,60
Eosinófilos (%)	0,40 ± 0,25	0
Basófilos (%)	1,00 ± 0,32	0,50 ± 0,29
Bioquímicos		
ALT (U/L)	71,05 ± 12,01	84,95 ± 20,28
AST (U/L)	78,67 ± 22,98	95,84 ± 18,52
Creatinina (mg/dL)	0,31 ± 0,07	0,38 ± 0,06
Urea (mg/dL)	70,78 ± 10,59	72,81 ± 15,07
Peroxidação lipídica (nmol de MDA/g de tecido)	38,55 ± 5,52	51,71 ± 5,89

Dados apresentados como média ± erro padrão (5 animais/ grupo). ($p < 0,05$, T TEST-Mann Whitney comparado com controle). Sem diferença estatística. Controle: animais que receberam ip (salina); PL 75: animais que receberam ip (75 mg/kg de PL).

O efeito relacionado ao peso dos órgãos também foi avaliado (Tabela 8). Não houve mudanças significativas no peso relativo do fígado, rim e baço, nem alterações macroscópicas em suas estruturas.

A microestrutura dos órgãos também foi avaliada através de análises histológicas tanto para a dose de 75 como para a dose de 150 mg/kg. Não houve presença de alterações morfológicas, lesões e/ou qualquer citotoxicidade no fígado, rim e baço dos animais tratados com PL na dose de 75 mg/kg, sendo mantidas a organização e a arquitetura dos referidos órgão ao final dos 14 dias de avaliação.

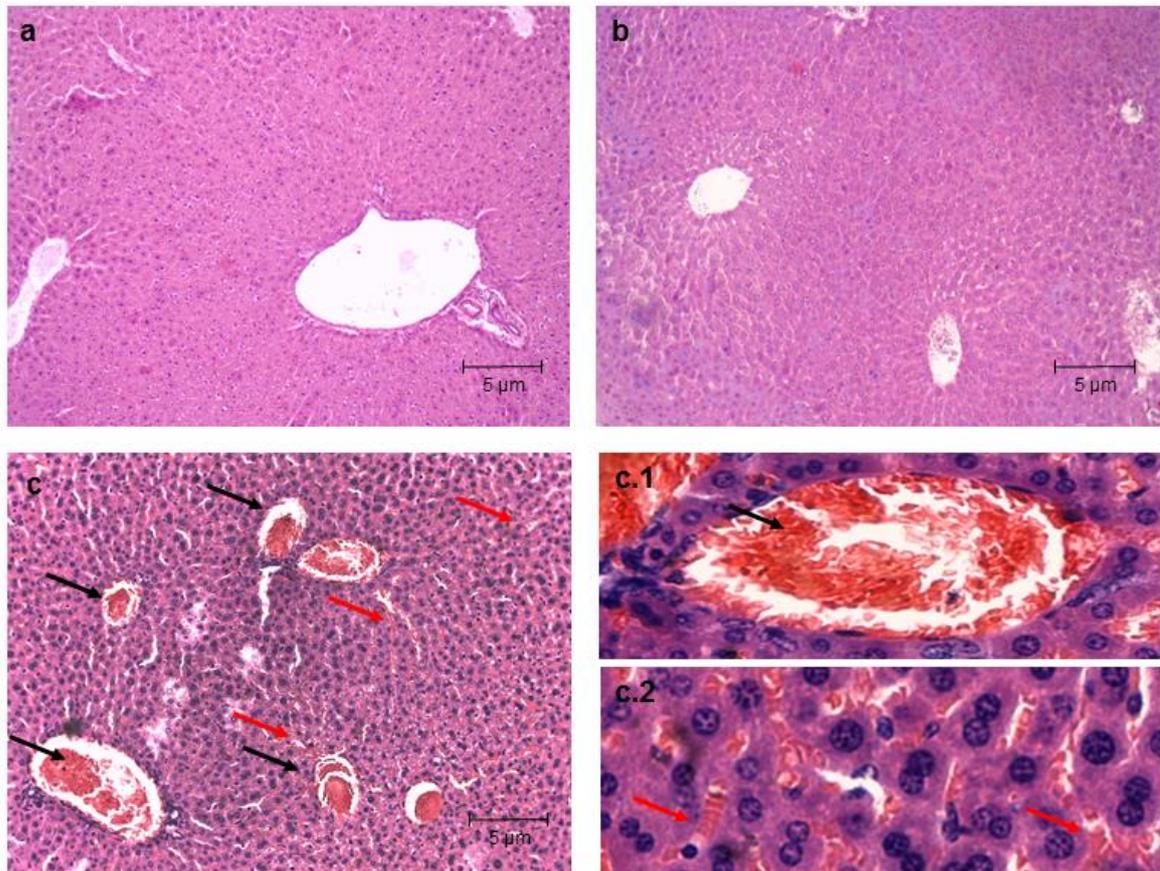
Entretanto, para a dose de 150 mg/kg foi observada intensa congestão vascular com hemossiderose, hemorragias intersticiais e presença isolada de células necróticas no fígado e nos rins, com maior intensidade para o fígado (Figuras 17, 18 e 19). O baço não foi afetado. De forma geral, a arquitetura e organização dos órgãos foram mantidas.

Tabela 8 - Peso relativo dos órgãos de camundongos tratados com PL 75 (i.p)

Peso Relativo	Grupos	
	Controle	PL 75
Fígado	4,82 ± 0,51	4,83 ± 0,25
Rim direito	0,73 ± 0,10	0,71 ± 0,04
Baço	0,27 ± 0,05	0,28 ± 0,05
Peso Corporal (g)	24,38 ± 0,77	23,42 ± 1,93

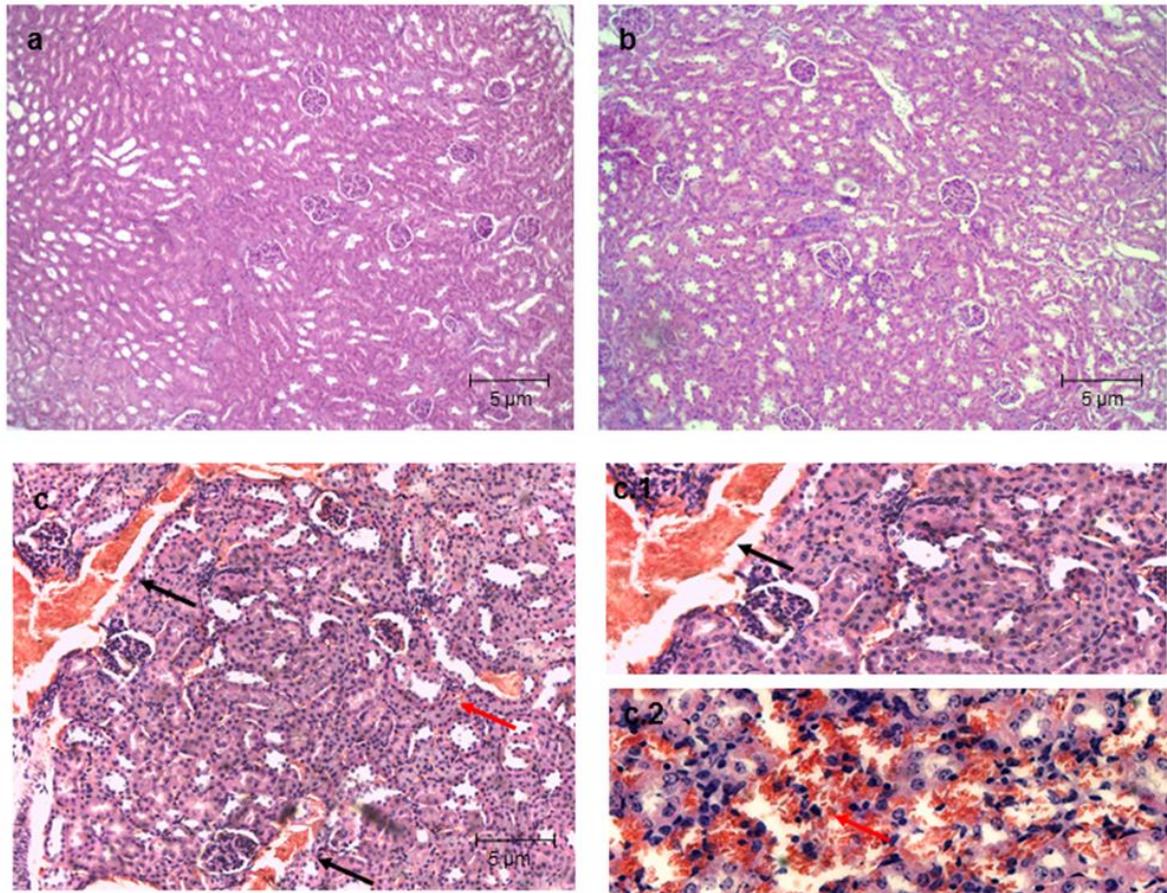
Dados apresentados como média ± erro padrão (5 animais/grupo). Sem diferença estatística em relação ao controle. Controle: animais que receberam ip (salina); PL 75: animais que receberam ip (75 mg/kg de PL). Peso Relativo: (Peso do órgão / peso corporal) x100.

Figura 17 - Microestrutura do fígado de camundongos tratados com PL (75 e 150 mg/kg, i.p)



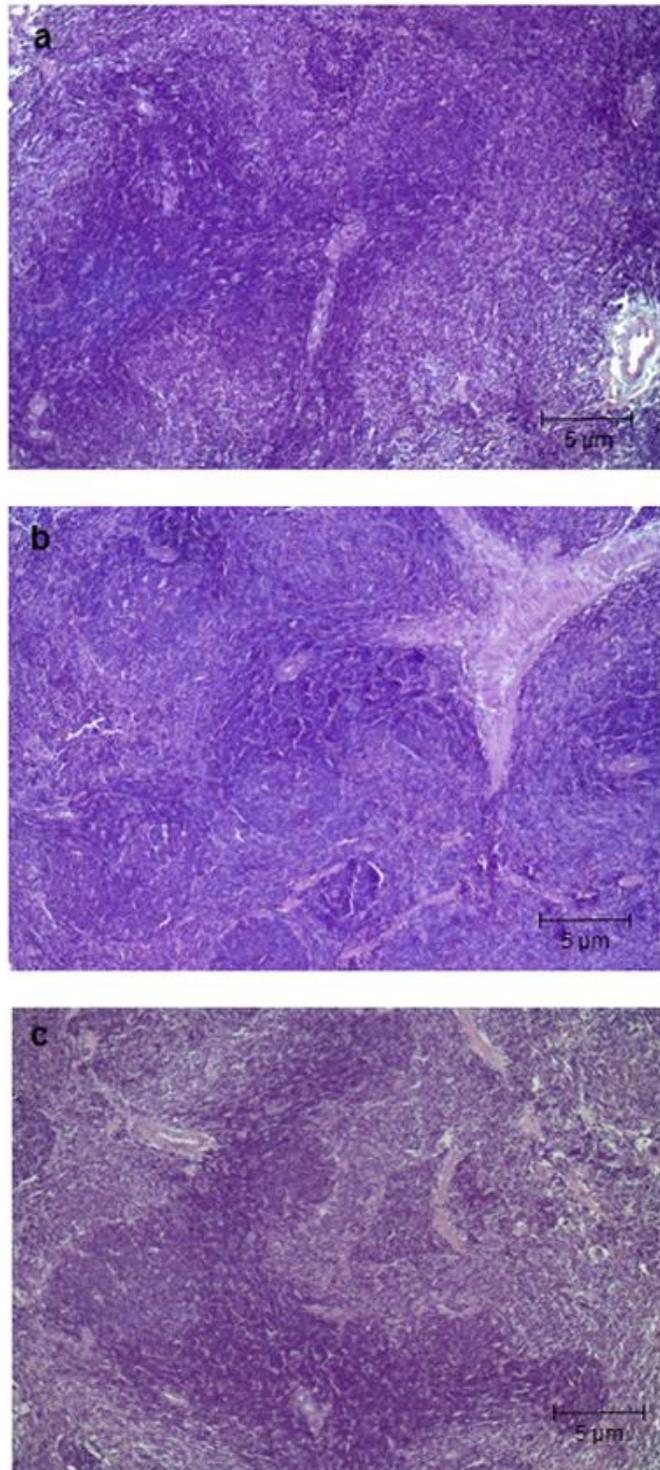
(H&E 100 x e 200 x) Controle: animais que receberam ip (salina); PL 75 e 150: animais que receberam ip (75 e 150 mg/kg de PL, respectivamente). a. controle e b. PL 75: sem alterações estruturais; c. PL 150: congestões vasculares com hemossiderose (c.1, setas pretas); hemorragias intersticiais (c.2, setas vermelhas).

Figura 18 - Microestrutura do rim direito de camundongos tratados com PL (75 e 150 mg/kg, i.p)



(H&E 100 x e 200 x) Controle: animais que receberam ip (salina); PL 75 e 150: animais que receberam ip (75 e 150 mg/kg de PL, respectivamente). a. controle e b. PL 75: sem alterações estruturais; c. PL 150: congestões vasculares com hemossiderose (c.1, seta preta); hemorragias intersticiais (c.2, seta vermelha).

Figura 19 - Microestrutura do baço de camundongos tratados com PL (75 e 150 mg/kg, i.p)



(H&E 100 x). Controle: animais que receberam ip (salina); PL 75 e 150: animais que receberam ip (75 e 150 mg/kg de PL, respectivamente). a. controle, b. PL 75 e c. PL150: sem alterações estruturais.

Diante dos resultados obtidos para avaliação de toxicidade aguda por via intraperitoneal, fez-se necessário investigar, se os efeitos tóxicos atribuídos às doses administradas estariam relacionados com a atividade das proteases cisteínicas. Para tanto, foram realizados mais dois experimentos independentes, nas doses de 75, 35 e 15mg/kg, sendo a dose de 75 inibida com iodoacetamida e outro experimento utilizando os picos cromatográficos PI e PII, na dose de 75 mg/kg, com PII inibido com iodoacetamida.

Em ambos experimentos, nenhum animal foi a óbito e os sintomas tóxicos apresentados pelos referidos grupos foram mais brandos em relação as doses administradas anteriormente.

Para a dose de 75 mg/kg de PL inibida com iodoacetamida, os animais apresentaram apenas algumas contorções na 4^o e 8^o hora após aplicação. Em relação às duas doses menores (35 e 15mg/kg de PL), os animais foram afetados quanto sua atividade geral nas primeiras horas e mostraram-se irritados na 2^o e na 4^o hora para a dose de 35 mg/kg (Tabela 9). Quanto os picos cromatográficos PI e PII inibido com iodoacetamida, os animais apresentaram apenas piloereção leve e respiração um pouco ofegante nas primeiras horas após aplicação da amostra (PI) e respiração ofegante e um pouco de irritabilidade (PII) nas primeiras horas. De acordo com parâmetros comportamentais observados, podemos inferir que a toxicidade pode estar relacionada com atividade das proteases.

Tabela 9 - Efeito de PL (15-75 IAA/ PI e PII IAA, i.p) sobre parâmetros comportamentais de camundongos durante a avaliação de toxicidade aguda.

Grupos (mg/kg)	Sintomas de Toxicidade				Animais (M/T)
	Sistema Nervoso Central	Sistema Nervoso Autônomo	Sistema Psicomotor	Atividade Geral/ Sistema de Sensorial	
Controle	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	0/5
PL 15	Nenhum	Nenhum	None	-Atividade Geral, 30 min., 1, 2, 4, 8 h*.	0/5
PL 35	Nenhum	Nenhum	Nenhum	- Atividade Geral, 30 min., 1 e 2h*; -Irritabilidade, 2 e 4 h*.	0/5
PL 75 IAA	Nenhum	Nenhum	-Contorção, 4 e 8h*.	Nenhum	0/5
Controle	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	0/5
PL-PI 75	Nenhum	-Piloereção, 30 min., 1, 2 e 4h*; - Respiração, 30min., 1 e 2h*.	Nenhum	Nenhum	0/5
PL-PII 75 IAA	Nenhum	- Respiração, 30min.,1 e 2h*.	Nenhum	-Irritabilidade (1h)*.	0/5

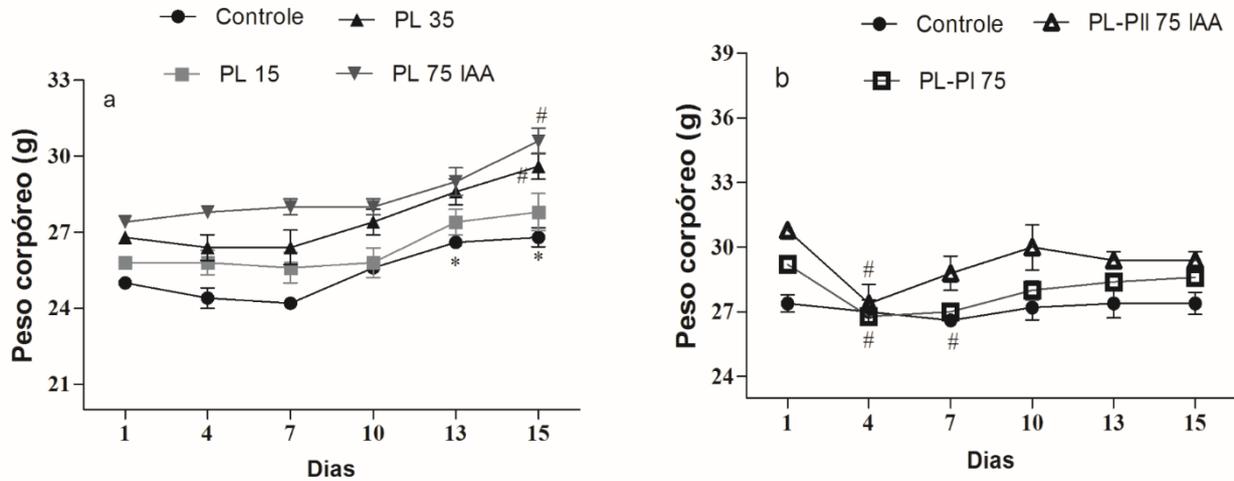
Dados apresentados como média \pm erro padrão (5 animais/grupo). ($p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni comparado com controle). Controle: animais que receberam ip (salina); PL 15, 35, 75; PL-PI e PL-PII: animais que receberam ip (15, 35 e 75 mg/kg de PL, respectivamente e pico PI e pico PII na dose de 75 mg/kg, respectivamente), IAA: inibido com iodoacetamida. Sistema Nervoso Central: tremores, convulsões, cauda ereta, hipnose e anestesia; Sistema Nervoso Autônomo: ptose, lacrimação, micções, defecação, piloereção, hipotermia, respiração e cianose; Psicomotor: contorção, trem posterior, reflexo de endireitamento, tônus corporal, força de agarrar e ataxia; Atividade Geral/

Sistema Sensorial: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, reflexo auricular, reflexo corneal, aperto de cauda, resposta ao toque. Nenhum: nenhum sintoma de toxicidade com diferença estatística em relação ao controle. M: morte, e T: total de animais tratados.

Em relação ao peso corpóreo (Figura 20), os grupos PL 35 e 75 IAA aumentaram peso como esperado para o desenvolvimento fisiológico normal no decorrer de 15 dias de avaliação. Já os animais da dose de 15 mg/kg não aumentaram o peso de forma significativa durante o período de avaliação, entretanto não perderam peso. Com a avaliação de outros parâmetros fisiológicos, hematológicos e bioquímicos pode-se concluir que o aumento não significativo de peso para este grupo não deve estar relacionado à toxicidade da amostra.

Os grupos que receberam as sub-frações de PL apresentaram uma perda de peso inicial, recuperando o peso por volta do décimo dia do experimento. Tanto a sub-fração PI como PII com IAA afetaram o peso dos animais de forma negativa, sugerindo que além das proteases outras substâncias podem conferir certo grau de toxicidade às amostras de látex de *C. procera*. Por outro lado, os animais do grupo controle não aumentaram o peso durante os dias de avaliação, indicando que outros fatores externos possivelmente podem ter influenciado negativamente o desenvolvimento dos animais e não necessariamente os sintomas tóxicos estejam relacionados com amostra estudada.

Figura 20 - Peso corpóreo de camundongos tratados com PL (i.p) (a. 15-75 IAA / b. PI e PII IAA) durante a avaliação de toxicidade aguda



Dados apresentados como média \pm erro padrão (5 animais/grupo). ($p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni). Diferença em relação grupo controle (*) e aos demais grupos PL/PL-PI e PII (#) em relação ao primeiro dia. Controle: animais que receberam ip (salina); PL 15, 35, 75; PL-PI e PL-PII: animais que receberam ip (15, 35 e 75 mg/kg de PL, respectivamente e pico PI e pico PII na dose de 75 mg/kg, respectivamente), IAA: inibido com iodoacetamida.

Em relação aos parâmetros fisiológicos (Tabela 10), os grupos PL 35 e PL 75 IAA, apesar de apresentarem diferenças em relação ao controle como na produção de excretas, número de pellets e consumo de ração, estas diferenças manifestaram-se de maneira discreta e esporádica. O grupo PL 35 produziu um menor número de pellets nos dias 1, 4, 6 e 12. Adicionalmente, o grupo PL 75 IAA apresentou também uma diminuição do número de pellets nos dias 1, 12 e 13, entretanto aumentou a produção de excretas nos dias 3, 4 e 6 e o consumo de ração no 3º dia. Mudanças nestes parâmetros de forma esporádica, não foram suficientes para alterar de forma significativa o desenvolvimento dos animais nos referidos grupos.

O mesmo perfil de alterações esporádicas foram registrados para os grupos PL-PI 75 e PL-PII 75 IAA. O número de produção de pellets foi menor, em relação ao controle, somente no 1º dia para PL-PI 75 e no 1º, 2º e 4º dia para o grupo PL-PII 75 IAA. Já a produção de excretas e o consumo de ração foram menores, em comparação com controle, somente no 2º dia (grupo PL-PII 75 IAA),

tanto que a média dos resultados dos 14 dias apresentou-se maior do que a do controle.

Tabela 10 - Parâmetros fisiológicos de camundongos tratados com PL (15-75 IAA/ PI e PII IAA) por via intraperitoneal.

Parâmetros	Grupos			
	Controle	PL 15	PL 35	PL 75 IAA
Produção de excretas (g/dia)	2,75 ± 0,34	2,94 ± 0,57	3,20 ± 0,68	3,63 ± 0,84 [*]
Nº de pellets (nº/dia)	101,60 ± 10,41	99,87 ± 12,82	79,04 ± 13,13 [*]	86,27 ± 17,16 [*]
Produção de urina (nº/dia)	2,43 ± 0,43	2,44 ± 0,47	2,81 ± 0,35	2,67 ± 0,49
Consumo de água (ml/dia)	7,69 ± 0,86	7,31 ± 0,95	8,77 ± 0,99	9,71 ± 1,42
Consumo de ração (g/dia)	4,77 ± 0,86	4,99 ± 1,12	5,17 ± 1,10	5,63 ± 1,27 [*]
	Controle	PL-PI 75	PL-PII 75 IAA	
Produção de excretas (g/dia)	1,87 ± 0,33	1,82 ± 0,42	1,96 ± 0,64 [*]	
Nº de pellets (nº/dia)	86,53 ± 10,57	83,96 ± 16,75 [*]	85,87 ± 23,85 [*]	
Produção de urina (nº/dia)	2,81 ± 0,29	2,94 ± 0,29	3,10 ± 0,27	
Consumo de água (ml/dia)	7,70 ± 1,50	7,83 ± 1,70	7,63 ± 1,80	
Consumo de ração (g/dia)	4,40 ± 0,80	4,51 ± 1,15	4,63 ± 1,29 [*]	

Dados apresentados como média ± erro padrão (5 animais/ grupo). (* $p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni comparado com controle). Controle: animais que receberam ip (salina); PL 15, 35, 75; PL-PI e PL-PII: animais que receberam ip (15, 35 e 75 mg/kg de PL, respectivamente e pico PI e pico PII na dose de 75 mg/kg, respectivamente), IAA: inibido com iodoacetamida.

Para os parâmetros hematológicos e bioquímicos, não foi observada diferença significativa dos animais tratados com PL ou sub-frações em relação aos animais do controle (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11 - Parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos tratados com PL (15-75 IAA) por via intraperitoneal.

Parâmetros	Grupos			
	Controle	PL 15	PL 35	PL 75 IAA
Hematológicos				
Contagem Total de Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	3,31 \pm 0,91	2,16 \pm 1,10	3,36 \pm 1,23	2,94 \pm 0,81
Linfócitos (%)	68,80 \pm 7,43	79,40 \pm 4,41	82,80 \pm 3,07	87,80 \pm 2,35
Neutrófilos (%)	18,00 \pm 7,35	13,00 \pm 4,18	11,60 \pm 3,14	8,40 \pm 1,96
Monócitos (%)	6,20 \pm 1,53	3,20 \pm 1,71	2,40 \pm 0,40	1,80 \pm 0,49
Eosinófilos (%)	2,20 \pm 0,58	1,80 \pm 0,58	2,00 \pm 0,71	0,40 \pm 0,40
Basófilos (%)	4,80 \pm 0,73	2,60 \pm 0,75	1,20 \pm 0,49	1,60 \pm 1,36
Bioquímicos				
ALT (U/L)	98,53 \pm 34,66	89,68 \pm 19,77	95,26 \pm 15,34	121,90 \pm 26,38
AST (U/L)	130,10 \pm 36,06	107,80 \pm 14,66	107,90 \pm 28,54	129,60 \pm 22,87
Creatinina (mg/dL)	2,01 \pm 1,32	2,55 \pm 0,77	3,30 \pm 0,78	3,08 \pm 1,49
Ureia (mg/dL)	78,86 \pm 19,78	62,67 \pm 12,89	88,73 \pm 25,88	87,59 \pm 11,84
Peroxidação lipídica (nmol de MDA/g de tecido)	105,40 \pm 39,69	94,25 \pm 42,26	89,23 \pm 35,93	47,21 \pm 24,74

Dados apresentados como média \pm erro padrão (5 animais/ grupo). (* $p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni comparado com controle). Controle: animais que receberam ip (salina); PL 15, 35, 75: animais que receberam ip (15, 35 e 75 mg/kg de PL, respectivamente), IAA: inibido com iodoacetamida.

Tabela 12 - Parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos tratados com PL (PI e PII IAA) por via intraperitoneal.

Parâmetros	Grupos		
	Controle	PL-PI 75	PL-PII 75 IAA
Hematológicos			
Contagem Total de Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	4,39 \pm 0,80	5,04 \pm 2,55	4,17 \pm 2,18
Linfócitos (%)	94,00 \pm 0,45	92,60 \pm 1,47	92,40 \pm 1,40
Neutrófilos (%)	3,40 \pm 0,51	4,00 \pm 1,05	5,20 \pm 0,97
Monócitos (%)	1,40 \pm 0,25	1,60 \pm 0,75	1,20 \pm 0,20
Eosinófilos (%)	0,40 \pm 0,25	1,00 \pm 0,55	0,40 \pm 0,25
Basófilos (%)	0,80 \pm 0,20	0,80 \pm 0,49	0,80 \pm 0,20
Bioquímicos			
ALT (U/L)	49,89 \pm 26,57	39,06 \pm 17,49	51,27 \pm 4,16
AST (U/L)	53,72 \pm 12,47	67,05 \pm 10,78	88,57 \pm 42,01
Creatinina (mg/dL)	0,57 \pm 0,30	0,62 \pm 0,18	0,63 \pm 0,11
Ureia (mg/dL)	72,25 \pm 14,27	68,06 \pm 34,08	70,74 \pm 6,89
Peroxidação lipídica (nmol de MDA/g de tecido)	91,22 \pm 19,24	98,06 \pm 19,78	103,40 \pm 45,22

Dados apresentados como média \pm erro padrão (5 animais/ grupo). (* $p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni comparado com controle). Controle: animais que receberam ip (salina); PL-PI e PL-PII: animais que receberam ip pico PI e pico PII na dose de 75 mg/kg, respectivamente), IAA: inibido com iodoacetamida.

Na avaliação macroscópica dos órgãos vitais, peso relativo (Tabela 13) e avaliação microscópica (Figuras 21-30) foi possível observar que, de uma maneira geral, os diferentes tratamentos apresentaram baixa toxicidade. Todos os órgãos apresentaram aspectos macroscópicos semelhantes aos controles. Não foi observada nenhuma mudança no peso dos órgãos, exceto o peso do fígado do grupo PL 15, que apesar de ser uma diminuição significativa, não foi acompanhado de outras mudanças significativas, uma vez que PL, nesta concentração, não afetou outros parâmetros hematológicos e bioquímicos.

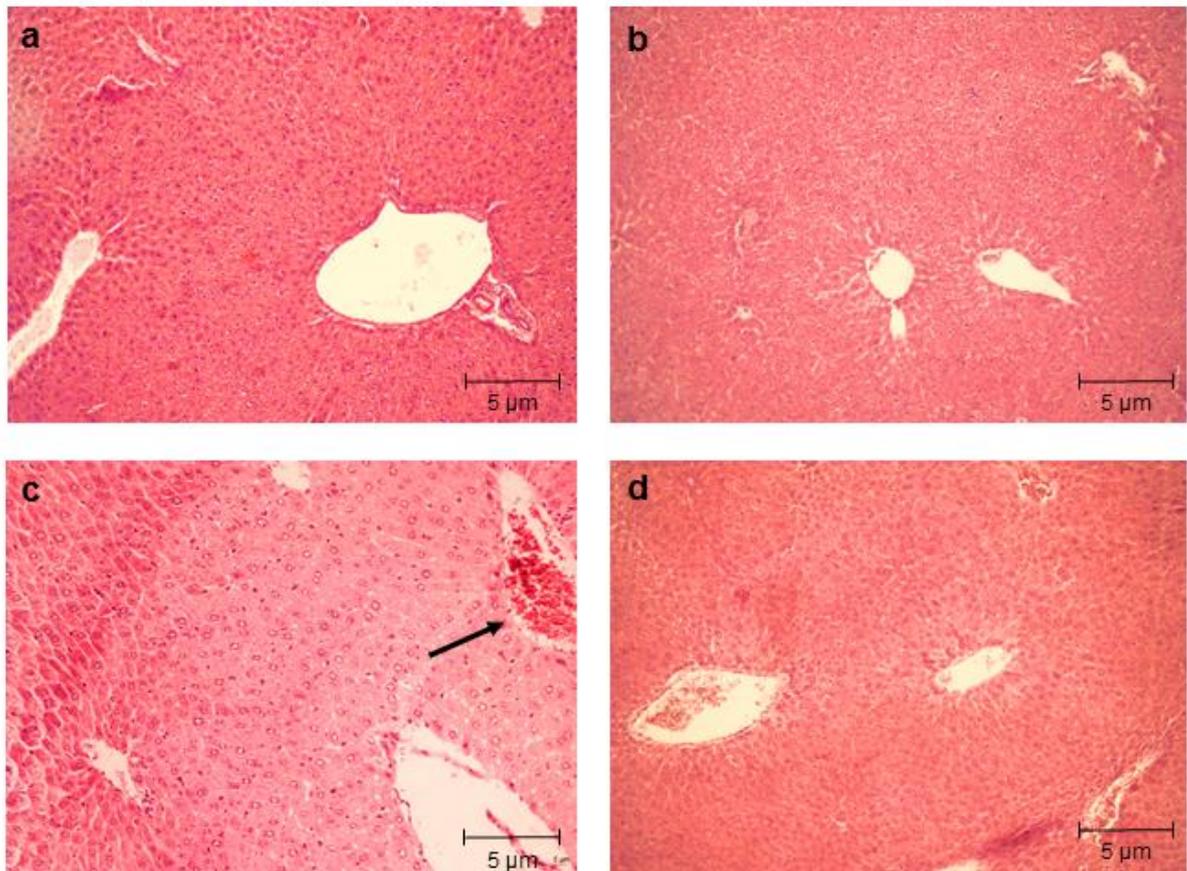
Nas análises histológicas, foi possível observar uma leve toxicidade no fígado e nos rins de animais do grupo PL 35, apresentando discretos focos de congestões vasculares no fígado, retração da cápsula de Bowman e necroses tubulares nos rins de forma isolada. Para o grupo PL 75 IAA, os animais apresentaram também retração da cápsula de Bowman e alteração da estrutura dos glomérulos com processo de necrose, igualmente de forma discreta e isolada. Por último, foram observadas alterações reversíveis nos fígados dos animais do grupo PL-PI 75, como leve a moderado focos de degeneração hidrópica centro lobular. De uma forma geral, a arquitetura e organização de ambos, rins e fígado, foram mantidas para todos os tratamentos avaliados e os demais órgãos como baço, pulmão e coração se mantiveram semelhante ao controle..

Tabela 13 - Peso relativo dos órgãos de camundongos tratados com PL (15-75 IAA/ PI e PII IAA) por via intraperitoneal

Grupos (mg/kg)	Peso Relativo					Peso corpóreo (g)
	Fígado	Rim direto	Baço	Coração	Pulmão	
Controle	4,85 ± 0,39	0,68 ± 0,03	0,23 ± 0,02	0,50 ± 0,04	0,55 ± 0,06	25,43 ± 1,10
PL15	4,12 ± 0,44*	0,65 ± 0,04	0,21 ± 0,06	0,50 ± 0,06	0,47 ± 0,02	26,37 ± 0,97
PL 35	4,31 ± 0,15	0,63 ± 0,06	0,27 ± 0,06	0,47 ± 0,02	0,50 ± 0,05	27,53 ± 1,31
PL 75 IAA	4,19 ± 0,34	0,63 ± 0,05	0,23 ± 0,04	0,47 ± 0,03	0,53 ± 0,09	28,47 ± 1,17
Controle	5,14 ± 0,35	0,64 ± 0,08	0,32 ± 0,05	0,59 ± 0,09	0,59 ± 0,07	27,03 ± 0,27
PL -PI 75	4,91 ± 0,38	0,62 ± 0,08	0,44 ± 0,10	0,50 ± 0,08	0,59 ± 0,04	28,03 ± 0,96
PL- PII 75 IAA	5,21 ± 0,46	0,71 ± 0,07	0,39 ± 0,09	0,49 ± 0,05	0,57 ± 0,04	29,33 ± 1,20

Dados apresentados como média ± erro padrão (5 animais/ grupo). (* $p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni comparado com controle). Controle: animais que receberam ip (salina); PL 15, 35, 75; PL-PI e PL-PII: animais que receberam ip (15, 35 e 75 mg/kg de PL, respectivamente e pico PI e pico PII na dose de 75 mg/kg, respectivamente), IAA: inibido com iodoacetamida.

Figura 21 - Microestrutura do fígado de camundongos tratados com PL (15 -75 IAA (i.p)



(H&E 100 x e 200 x). Controle: animais que receberam ip (salina); PL 15, 35, 75: animais que receberam ip (15, 35 e 75 mg/kg de PL, respectivamente), IAA: inibido com iodoacetamida. a. controle; b. PL 15: sem alterações estruturais; c. PL 35: discretos focos de congestões vasculares (seta preta); d. PL 75 IAA: sem alterações estruturais.

Figura 22 - Microestrutura dos rins de camundongos tratados com PL (15 -75 IAA) (i.p)

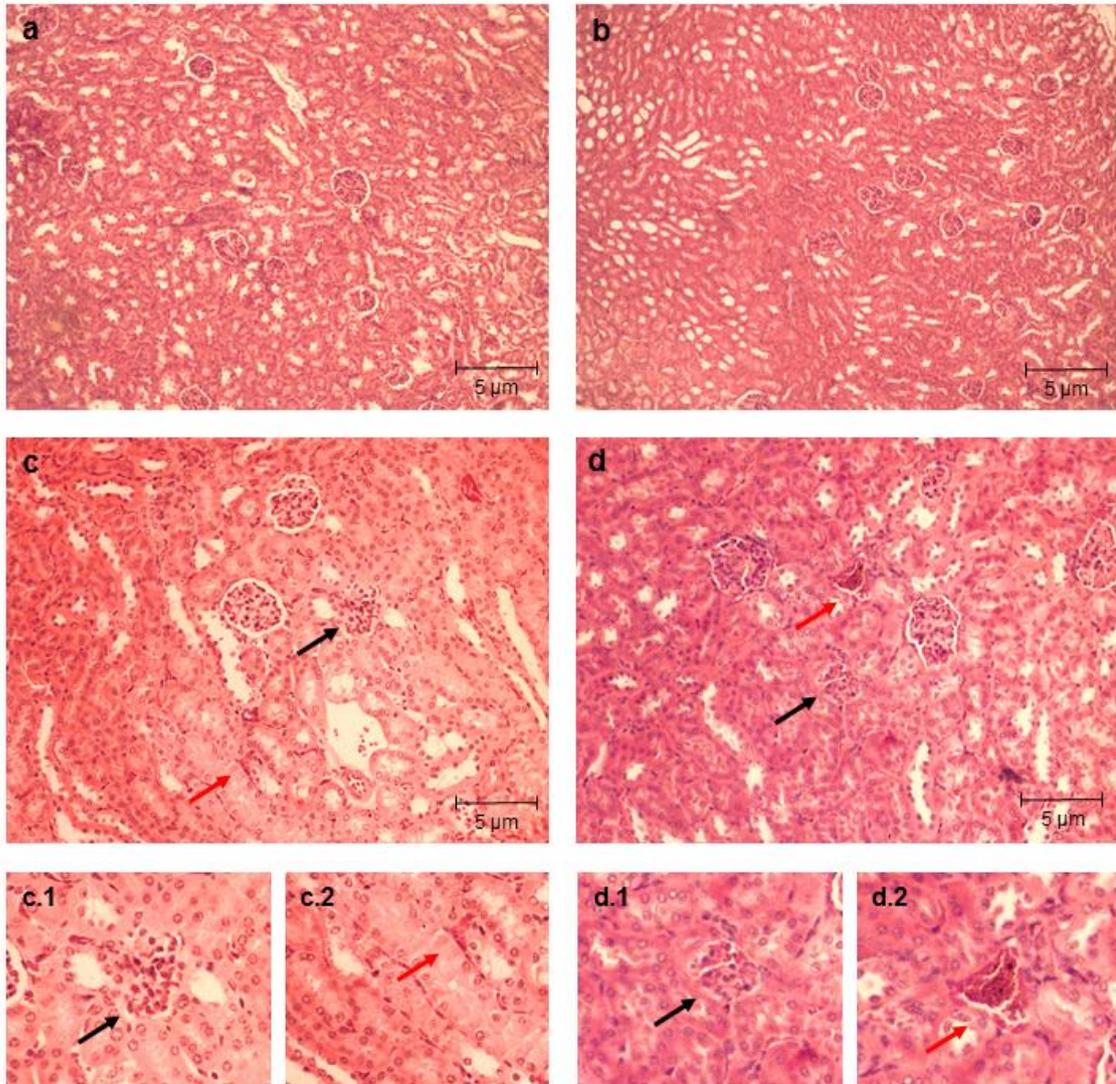
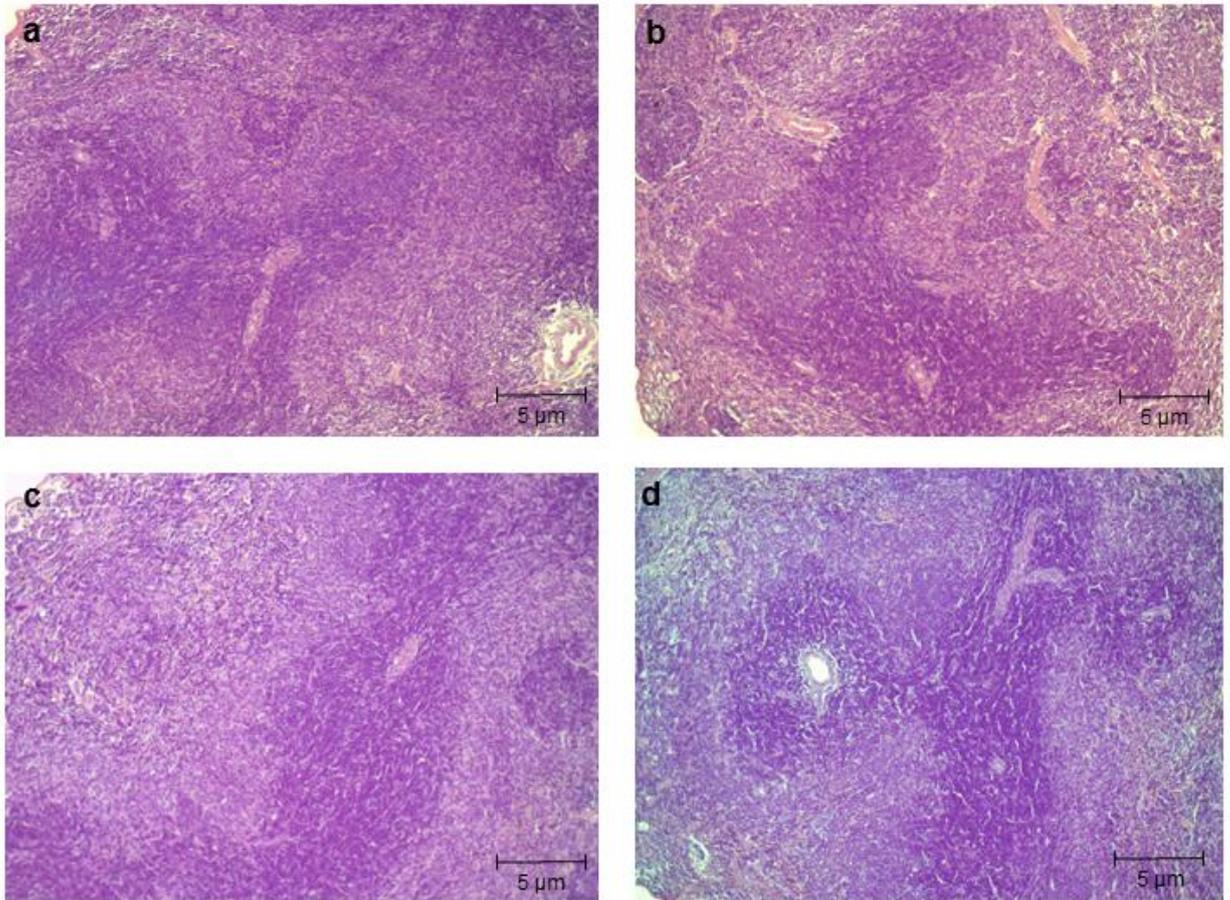


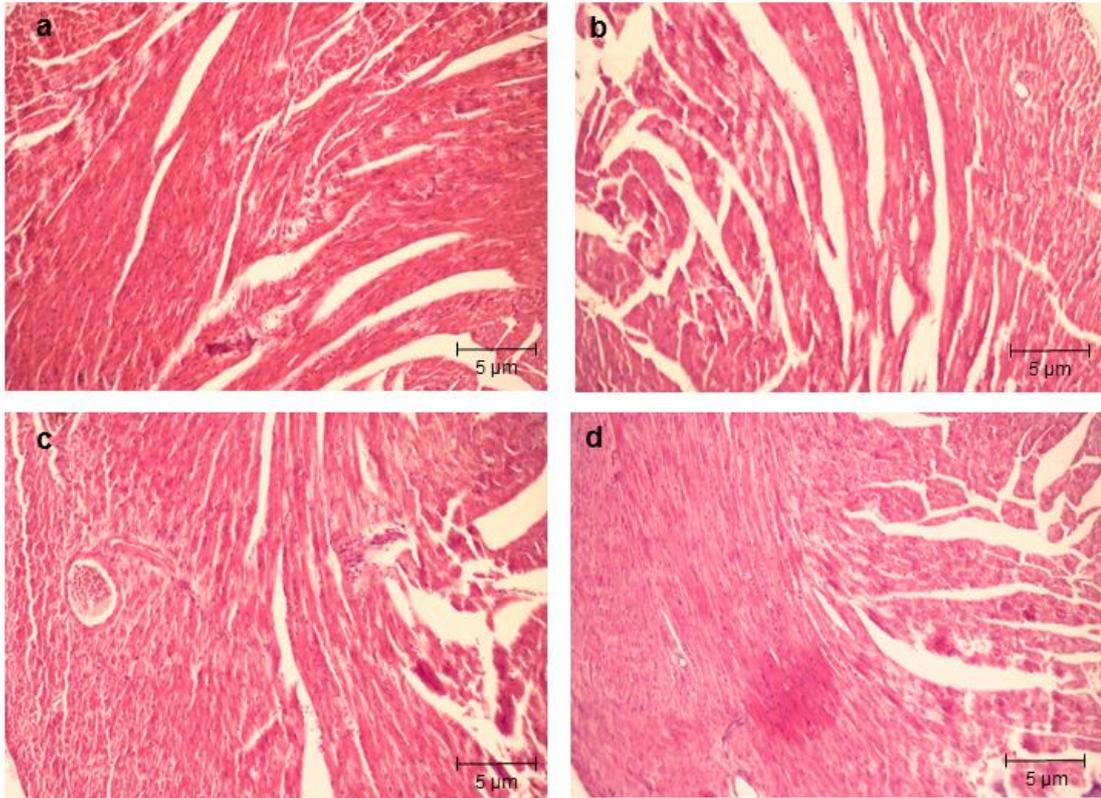
Foto representa o todo e detalhes (H&E 100 x e 200 x). Controle: animais que receberam ip (salina); PL 15, 35, 75: animais que receberam ip (15, 35 e 75 mg/kg de PL, respectivamente), IAA: inibido com iodoacetamida. a. controle e b. PL15: sem alterações; c. PL35: retração de cápsula de Bowman (c.1, seta preta), leve necrose tubular (c.2, seta vermelha); d. PL 75 IAA: retração de cápsula de Bowman (d.1, seta preta) e alterações na estrutura dos glomérulos, processo de necrose (d.2, seta vermelha).

Figura 23 - Microestrutura do baço de camundongos tratados com PL (15 -75 IAA (i.p)



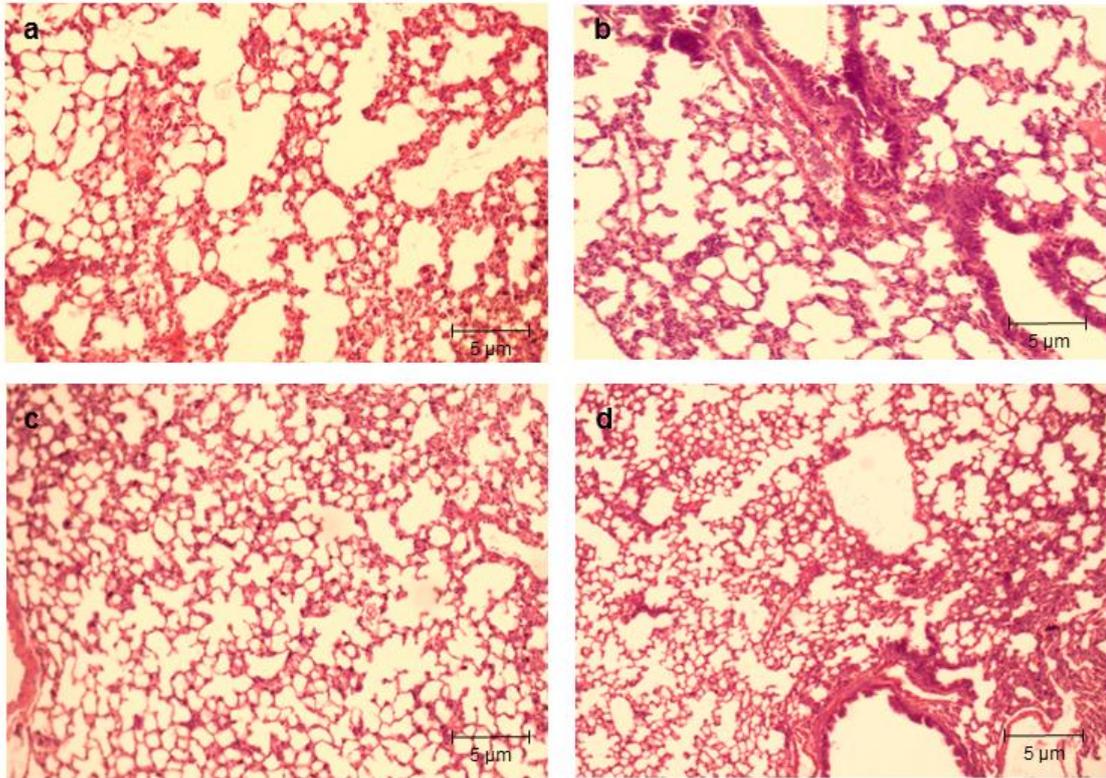
(H&E 100 x) Controle: animais que receberam ip (salina); PL 15, 35, 75: animais que receberam ip (15, 35 e 75 mg/kg de PL, respectivamente), IAA: inibido com iodoacetamida. a. controle e b. PL 15, c. PL 35, d. PL 75 IAA: sem alterações estruturais

Figura 24 - Microestrutura do coração de camundongos tratados com PL (15 -75 IAA (i.p)



(H&E 100 x) Controle: animais que receberam ip (salina); PL 15, 35, 75: animais que receberam ip (15, 35 e 75 mg/kg de PL, respectivamente), IAA: inibido com iodoacetamida. a. controle e b. PL 15, c. PL 35, d. PL 75 IAA: sem alterações estruturais

Figura 25 - Microestrutura dos pulmões de camundongos tratados com PL (15 -75 IAA (i.p)



(H&E 100 x) Controle: animais que receberam ip (salina); PL 15, 35, 75: animais que receberam ip (15, 35 e 75 mg/kg de PL, respectivamente), IAA: inibido com iodoacetamida. a. controle e b. PL 15, c. PL 35, d. PL 75 IAA: sem alterações estruturais.

Figura 26 - Microestrutura do fígado de camundongos tratados com PL -PI/PII IAA (i.p)

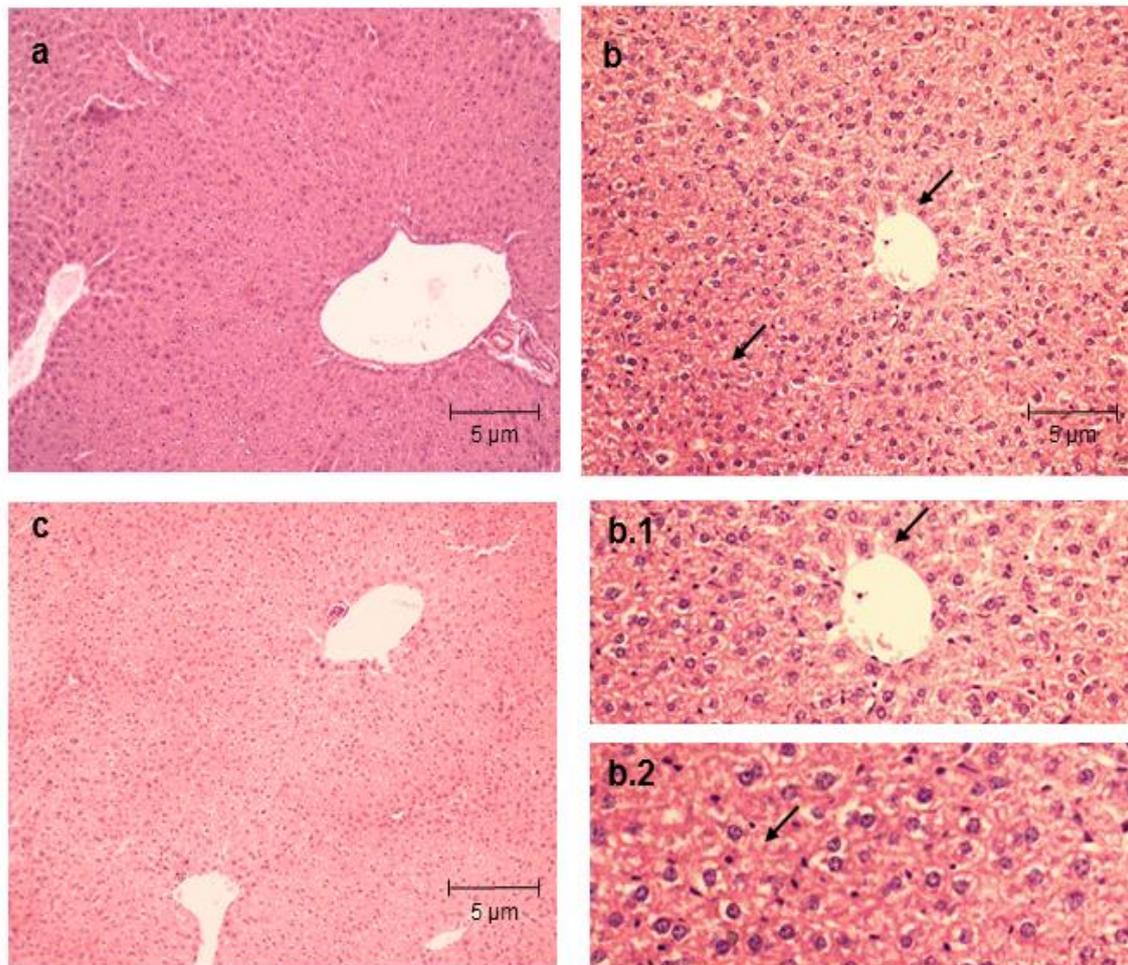
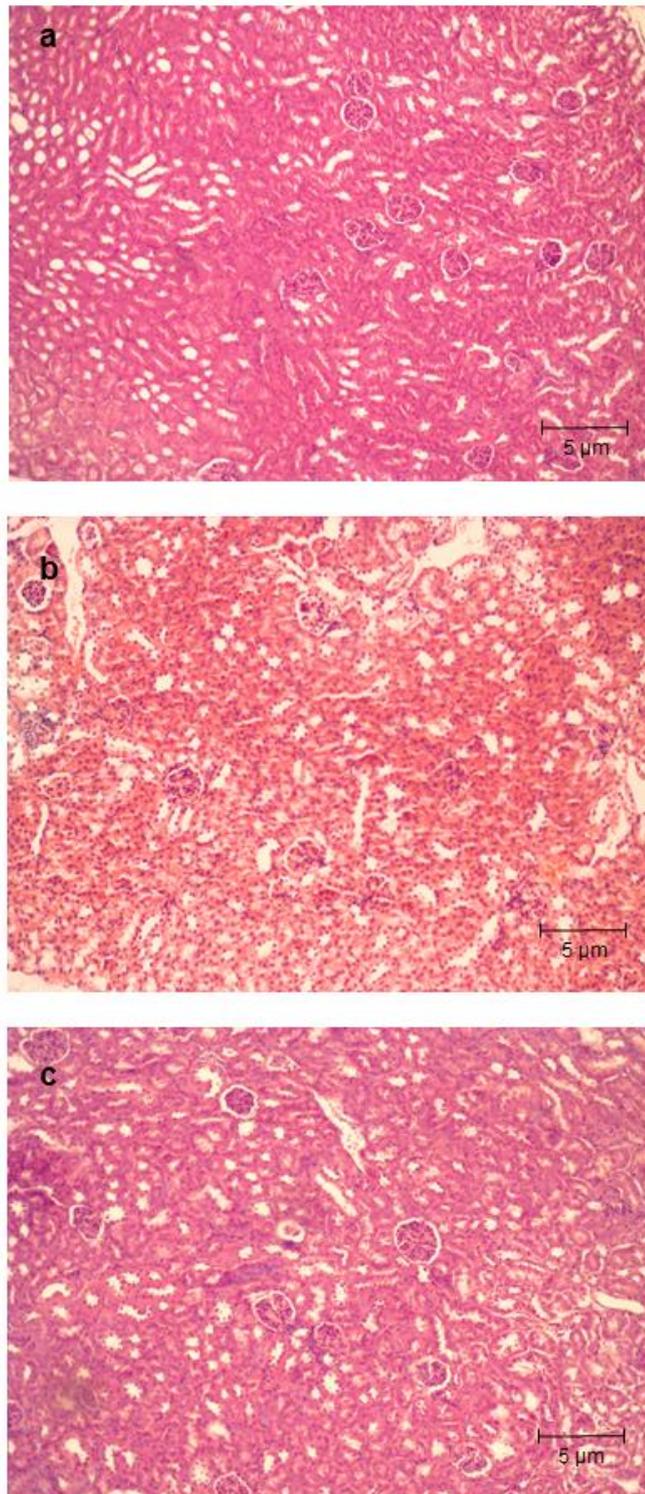


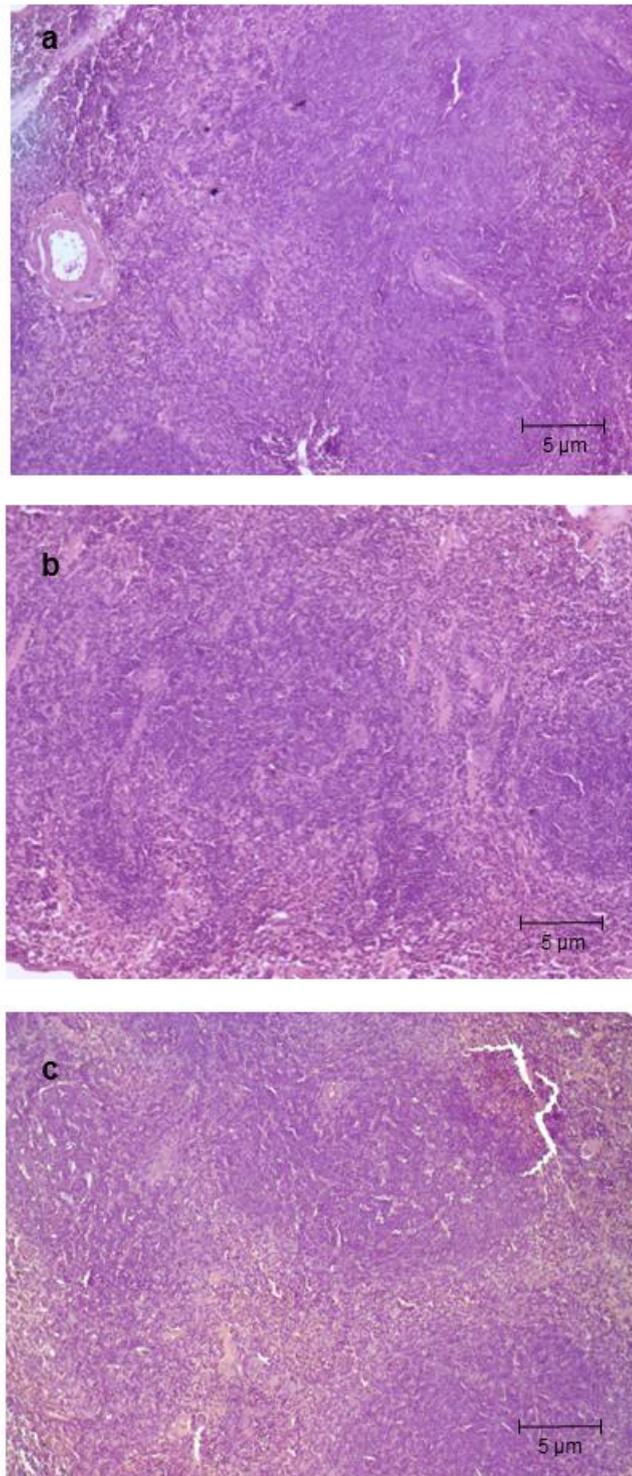
Foto representa o todo e detalhes (H&E 100 x e 200 x). Controle: animais que receberam ip (salina); PL-PI e PL-P II: animais que receberam ip (pico PI e pico P II na dose de 75 mg/kg, respectivamente), IAA: inibido com iodoacetamida. a. controle: sem alterações; b. PL-PI 75: focos de degeneração hídrica (b.1/b.2, setas pretas); c. PL-P II 75 IAA: sem alterações.

Figura 27 - Microestrutura dos rins de camundongos tratados com PL-PI/PII IAA (i.p)



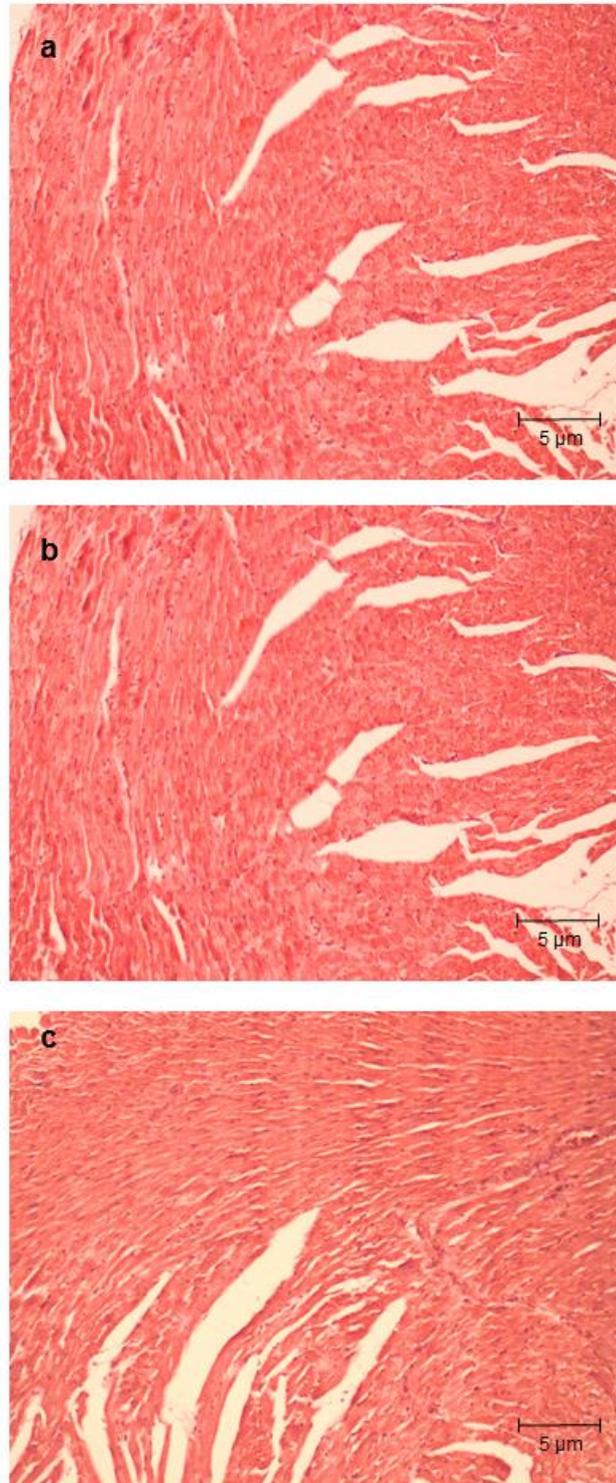
(H&E 100 x) Controle: animais que receberam ip (salina); PL-PI e PL-PII: animais que receberam ip (pico PI e pico PII na dose de 75 mg/kg, respectivamente), IAA: inibido com iodoacetamida. a. controle, b. PL-PI 75 e c. PL-PII 75 IAA: sem alterações estruturais.

Figura 28 - Microestrutura do baço de camundongos tratados com PL-PI/PII IAA (i.p).



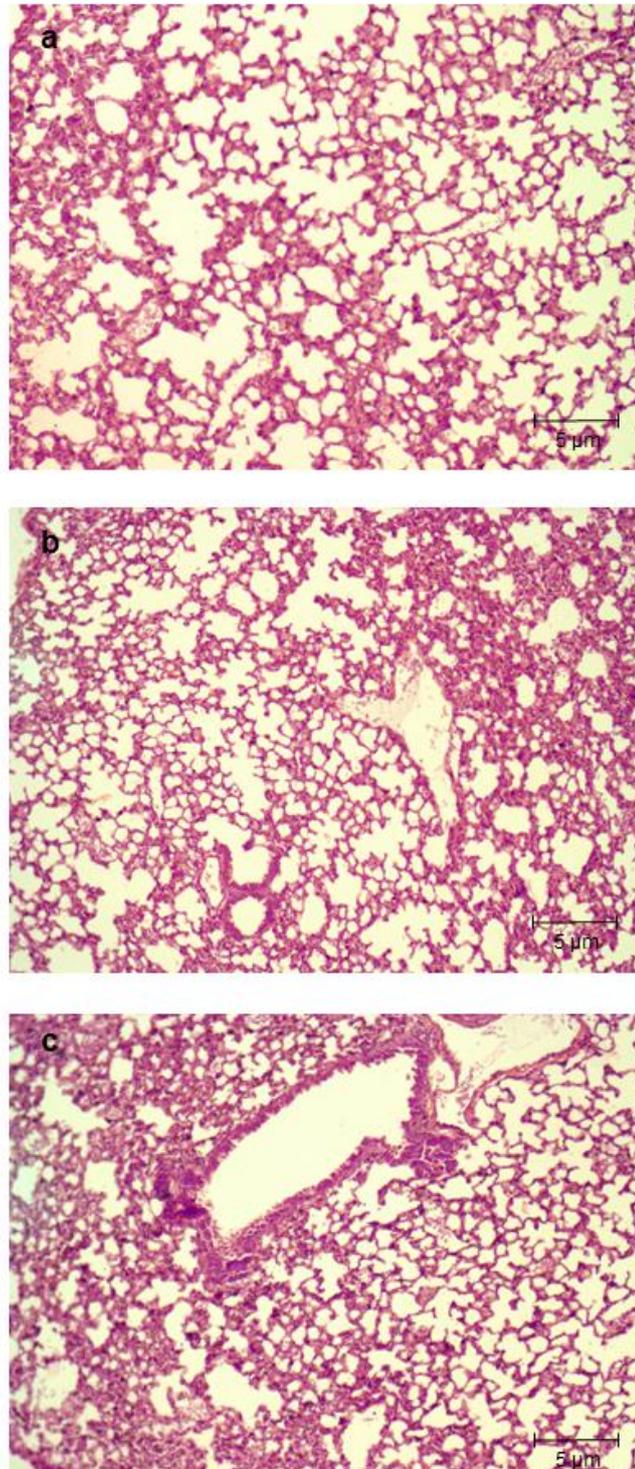
(H&E 100 x) PL-PI e PL-P II: animais que receberam ip (pico PI e pico P II na dose de 75 mg/kg, respectivamente), IAA: inibido com iodoacetamida. a. controle, b. PL-PI 75 e c. PL-P II 75 IAA: sem alterações estruturais.

Figura 29 - Microestrutura do coração de camundongos tratados com PL-PI/PII IAA (i.p)



(H&E 100 x) PL-PI e PL-P II: animais que receberam ip (pico PI e pico P II na dose de 75 mg/kg, respectivamente), IAA: inibido com iodoacetamida. a. controle, b. PL-PI 75 e c. PL-P II 75 IAA: sem alterações estruturais.

Figura 30 - Microestrutura dos pulmões de camundongos tratados com PL-PI/PII IAA (i.p)



(H&E 100 x) PL-PI e PL-PII: animais que receberam ip (pico PI e pico PII na dose de 75 mg/kg, respectivamente), IAA: inibido com iodoacetamida. a. controle, b. PL-PI 75 e c. PL-PII 75 IAA: sem alterações estruturais.

5.3 Etapa III: Indução de tolerância oral em camundongos através de administração de proteínas do látex de *Calotropis procera*

5.3.1 Perfil hematológico e Teor de Imunoglobulinas

Os animais submetidos ao protocolo de tolerância oral foram sangrados nos dias 0, 14, 28, 42 e 49 (Figura 12). A contagem total e diferencial dos leucócitos foi determinada no dia zero e no dia 49 (Tabela 14). Já as imunoglobinas (IgG, IgA e IgE) foram determinadas nos diferentes dias de sangria por ELISA, enquanto IgG₁ foi determinada no dia 49 por PCA (Figuras 31-34).

As contagens total e diferencial de leucócitos no dia zero se mantiveram constantes para os diferentes grupos. No dia 49, algumas diferenças foram observadas nos números de leucócitos e linfócitos, entretanto estas diferenças podem não estar relacionadas ao tratamento, visto que apesar de significativas, não foram expressivas quando se trata dos grupos OVA e PL 2,5. Em relação ao controle PL, apesar de ter diminuído em relação ao controle OVA, não diferiu significativamente em relação aos demais grupos tratados com PL. Os números de eosinófilos e basófilos, células associadas a processos alérgicos, mantiveram-se inalterados, sem diferença entre os grupos.

Tabela 14 - Parâmetros Hematológicos de camundongos submetidos ao protocolo de tolerância oral.

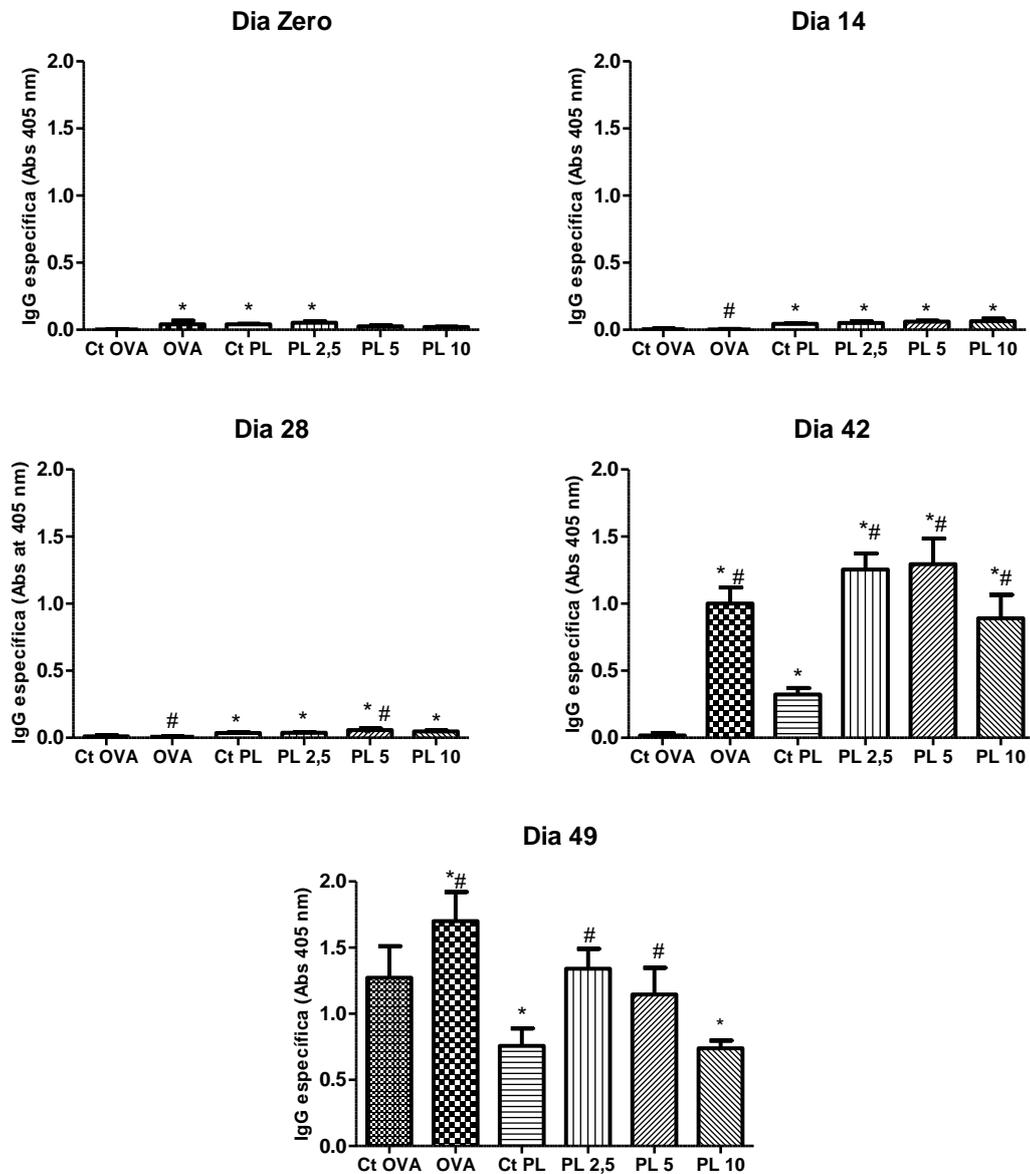
Parâmetros	Grupos – Dia Zero					
	Ct OVA	OVA	Ct PL	PL 2.5	PL 5	PL 10
Leucócitos (10 ³ /µl)	4,26 ± 0,39	5,73 ± 0,30	4,52 ± 0,36	4,77 ± 0,35	5,01 ± 0,32	5,16 ± 0,36
Linfócitos (%)	87,80 ± 2,78	84,20 ± 0,86	86,80 ± 0,80	85,60 ± 1,03	89,60 ± 0,51	84,20 ± 1,07
Neutrófilos (%)	10,00 ± 2,05	11,80 ± 0,49	12,00 ± 0,63	10,60 ± 0,93	9,60 ± 0,40	11,60 ± 0,40
Monócitos (%)	1,00 ± 0,55	0,40 ± 0,25	0,80 ± 0,20	0,40 ± 0,25	0,80 ± 0,20	1,20 ± 0,20
Eosinófilos (%)	0	0,40 ± 0,25	0	0	0,20 ± 0,20	0,20 ± 0,20
Basófilos (%)	1,20 ± 0,37	1,20 ± 0,20	0,60 ± 0,25	0,60 ± 0,40	0	0,60 ± 0,25
Parâmetros	Grupos – Dia 49					
	Ct OVA	OVA	Ct PL	PL 2.5	PL 5	PL 10
Leucócitos (10 ³ /µl)	9,66 ± 1,41	6,65 ± 0,21	5,16 ± 0,14 [*]	6,60 ± 0,31	7,45 ± 0,59	7,10 ± 0,56
Linfócitos (%)	84,00 ± 0,71	81,40 ± 0,60 [*]	83,20 ± 0,20	81,00 ± 0,32 [#]	82,00 ± 0,32	81,80 ± 0,37
Neutrófilos (%)	14,00 ± 0,71	14,80 ± 0,58	14,80 ± 0,20	15,80 ± 0,49	15,00 ± 0,55	15,00 ± 0,55
Monócitos (%)	1,00 ± 0,0	1,00 ± 0,0	1,00 ± 0,0	1,00 ± 0,0	1,00 ± 0,0	1,00 ± 0,0
Eosinophils (%)	0	0	0	0	0	0
Basófilos (%)	1,00 ± 0,0	0,80 ± 0,20	1,00 ± 0,0	0,80 ± 0,20	0,40 ± 0,25	0,80 ± 0,20

Dados apresentados como média ± erro padrão (5 animais/ grupo). ($p < 0,05$, ANOVA – Teste Bonferroni comparado com Ct OVA (^{*}) e Ct PL ([#])). Ct. OVA e Ct. PL: animais que não foram sensibilizados v.o e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente; OVA, PL 2,5, PL 5 e PL 10: animais que foram sensibilizados v.o com OVA ou PL nas doses de 2,5-10mg/kg e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente.

Em relação aos níveis de imunoglobulinas, IgG (Figura 31) referente aos dias de sangrias 0, 14 e 28 foi pouco expressiva devido os animais, até o momento, só terem sido submetidos a administração de PL por via oral. Entretanto, no dia 42 os níveis de IgG aumentaram significativamente, pois os animais já tinham sido imunizados por via intraperitoneal. Os grupos controles (OVA e PL) apresentaram discreto aumento na produção de IgG (dia 42), pois os animais destes grupos só receberam salina por via oral. Por fim, no dia 49, após desafio por via intraperitoneal,

observou-se um aumento expressivo nos níveis de IgG para os grupos controles (OVA e PL) e para o grupo OVA. Entretanto, os grupos tratados com PL (2,5; 5 e 10) mantiveram os níveis de IgG praticamente inalterados, tendo os grupos PL 5 e PL 10 ainda menor produção de IgG (PL 5- 1,29 abs (42 d); 1,14 abs (49d) e PL 10- 0,89 abs (42d); 0,74 abs (49d)). O grupo PL 10 apresentou uma redução de 17% na produção de IgG no dia 49 em comparação ao dia 42, com valores semelhantes ao controle PL. Esta diminuição na produção de IgG dos grupos tratados com PL por via oral indica uma possível tolerância imunológica.

Figura 31 - Nível de imunoglobulina IgG de camundongos submetidos ao protocolo de tolerância oral

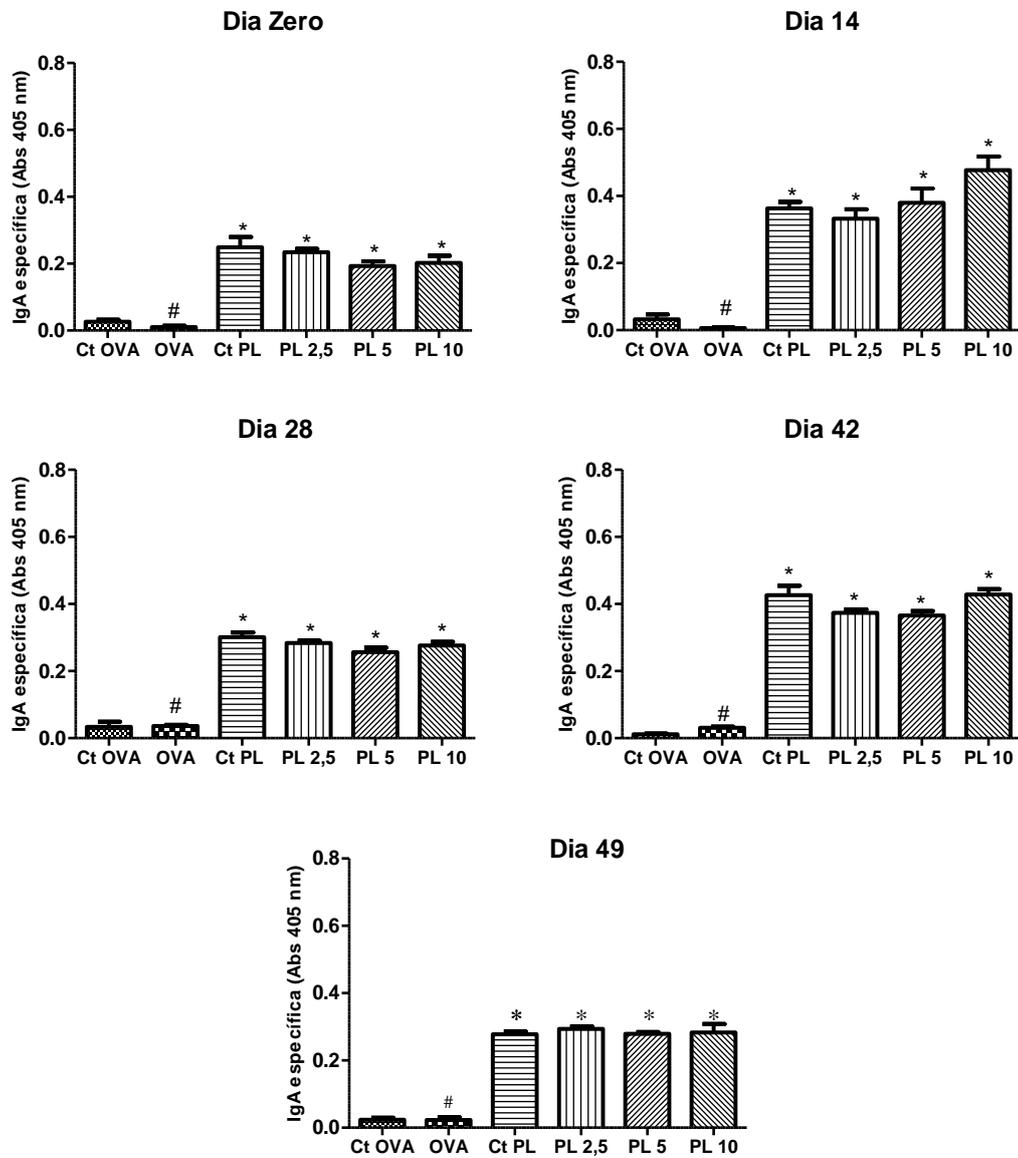


Dados apresentados como média \pm erro padrão (5 animais/ grupo). ($p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni comparado com Ct OVA (*) e Ct PL (#). Ct. OVA e Ct. PL: animais que não foram sensibilizados v.o e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente; OVA, PL 2,5, PL 5 e PL 10: animais que foram sensibilizados v.o com OVA ou PL nas doses de 2,5-10mg/kg e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente.

Para os níveis de IgA (Figura 32), podemos observar que os grupos controle OVA e OVA praticamente não produziram IgA. Os demais grupos, de maneira geral, apresentaram produção constante de IgA ao longo dos diferentes dias de tratamento. Um discreto aumento nos níveis de IgA foi observado nos dias

14 e 42, como esperado, visto que, o aumento de IgA no dia 14 está relacionado a produção de anticorpos devido a administração oral por 10 dias consecutivos de PL e o aumento no dia 42 está relacionado a imunização intraperitoneal de PL no dia 28. A produção constante de IgA dos grupos tratados com PL por via oral, com valores comparáveis aos do controle, mostra uma tendência a tolerância oral já que a produção de IgA está envolvida na homeostasia imunológica (PABST; MOWAT, 2012).

Figura 32 - Nível de imunoglobulina IgA de camundongos submetidos ao protocolo de tolerância oral.



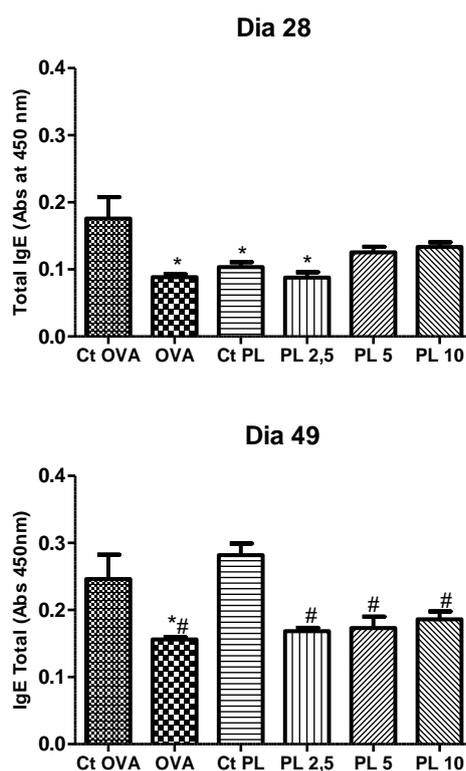
Dados apresentados como média \pm erro padrão (5 animais/ grupo). ($p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni comparado com Ct OVA (*) e Ct PL (#). Ct. OVA e Ct. PL: animais que não foram sensibilizados v.o e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente; OVA, PL 2,5, PL 5 e PL 10: animais que foram sensibilizados v.o com OVA ou PL nas doses de 2,5-10mg/kg e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente.

O aumento na produção de IgE e IgG₁ é característico de manifestações alérgicas, conseqüentemente a diminuição de ambas pode representar que houve indução da tolerância oral.

No dia 28, a produção de IgE foi praticamente constante para todos os grupos, exceto para o grupo controle OVA (Figura 33). Entretanto, no dia 49 os grupos controles aumentaram a produção de IgE de forma expressiva enquanto a produção dos grupos que receberam PL ou OVA por via oral foi atenuada. O grupo controle PL aumentou a produção de IgE em 180% no dia 49 em relação ao dia 28, já os grupos PL (2,5; 5, 10) aumentaram a produção em 112; 41,66 e 46,15%, respectivamente.

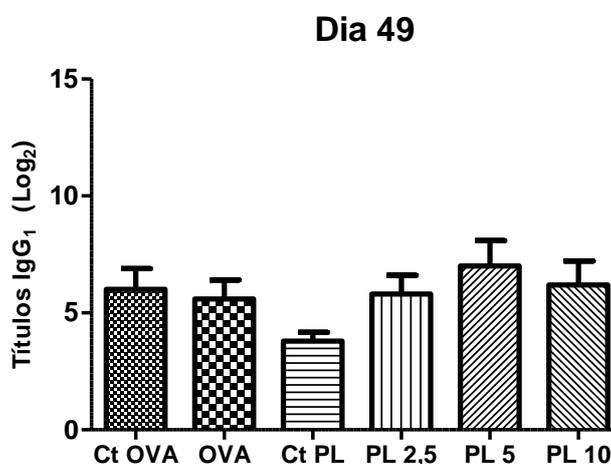
A menor produção de IgE nos grupos que receberam PL por via oral é indicativo de tolerância oral. Já em relação à produção dos títulos de IgG1 (Figura 34), a diminuição da sua produção em relação ao controle não foi observada.

Figura 33 - Nível de imunoglobulina IgE em camundongos tratados com OVA ou PL.



Dados apresentados como média \pm erro padrão (5 animais/ grupo). ($p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni comparado com Ct OVA (*) e Ct PL (#). Ct. OVA e Ct. PL: animais que não foram sensibilizados v.o e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente; OVA, PL 2,5, PL 5 e PL 10: animais que foram sensibilizados v.o com OVA ou PL nas doses de 2,5-10mg/kg e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente.

Figura 34 - Títulos de imunoglobulina IgG₁ de camundongos submetidos ao protocolo de tolerância oral.



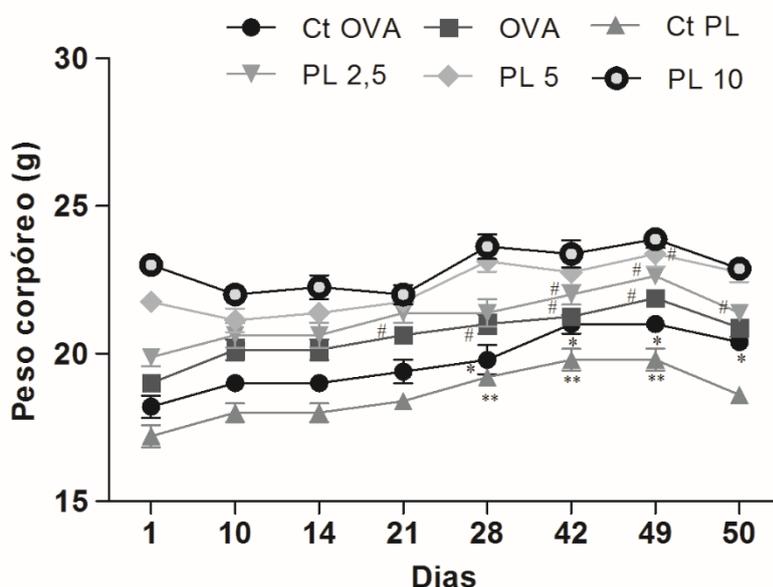
Dados apresentados como média \pm erro padrão (5 animais/ grupo). ($p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni comparado com Ct OVA (*) e Ct PL (#). Ct. OVA e Ct. PL: animais que não foram sensibilizados v.o e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente; OVA, PL 2,5, PL 5 e PL 10: animais que foram sensibilizados v.o com OVA ou PL nas doses de 2,5-10mg/kg e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente.

5.3.2 Parâmetros relacionados a manifestações alérgica

Ao longo do experimento de tolerância oral, os pesos corpóreos dos animais foram mensurados, assim como sinais clínicos de anafilaxia e temperaturas corpóreas antes e depois da imunização (dia 28) e desafio (dia 42).

Os pesos corpóreos dos animais dos diferentes grupos, de uma maneira geral, se mantiveram constantes, aumentando de forma significativa a partir do dia 28 e apresentando um leve declínio no último dia (Figura 35). Esta perda de peso é esperada devido à sangria realizada no dia anterior (dia 49). O ganho de peso dos animais ao decorrer dos 50 dias de experimento ocorreu de forma inversamente proporcional a dose. Este ganho, entre o intervalo do dia zero ao dia 49, foi de 2,75g; 1,63 g e 0,88g para os grupos PL 2,5; PL 5 e PL 10, respectivamente. Enquanto os demais grupos ganharam aproximadamente 3g de peso. A perda de peso é um dos sintomas relacionado a manifestações alérgicas. Neste experimento, os animais não perderam peso, entretanto a diminuição no ganho de peso pode indicar certo grau de toxicidade para PL em concentrações maiores.

Figura 35 - Pesos corpóreos de camundongos durante o experimento de tolerância oral.



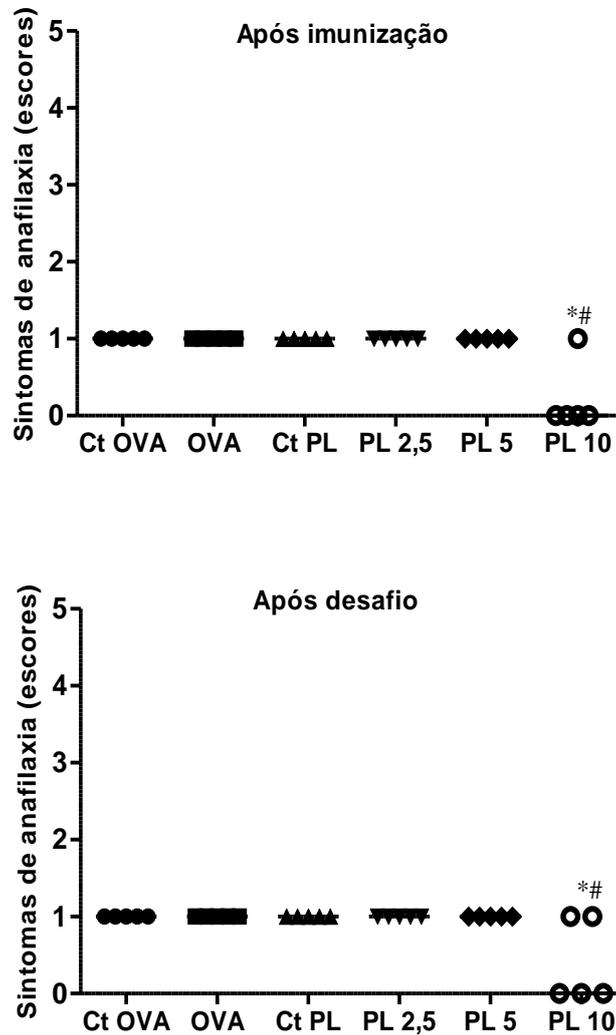
Dados apresentados como média \pm erro padrão (5 animais/grupo). ($p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni). Diferença em relação controle OVA (*), controle PL (**) e aos demais grupos OVA e PL (2,5-10) (#) em relação ao primeiro dia. Ct. OVA e Ct. PL: animais que não foram sensibilizados v.o e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente; OVA, PL 2,5, PL 5 e PL 10: animais que foram sensibilizados v.o com OVA ou PL nas doses de 2,5-10mg/kg e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente.

Sinais de anafilaxia foram avaliados logo após imunização e desafio (Figura 36). Coçar e esfregar em torno do focinho e da cabeça (escore 1) foram os mais observados para a maioria dos animais em todas as doses. Dos 5 animais que receberam PL na dose de 10 mg/kg, apenas 1 apresentou os sinais clínicos referentes ao escore 1 após imunização, e 2 animais de 5 apresentaram estes mesmos sinais após desafio.

Diminuição de temperatura corpórea é considerada também como sinal de anafilaxia. Todos os animais mantiveram sua temperatura constante após imunização e desafio (Figura 37).

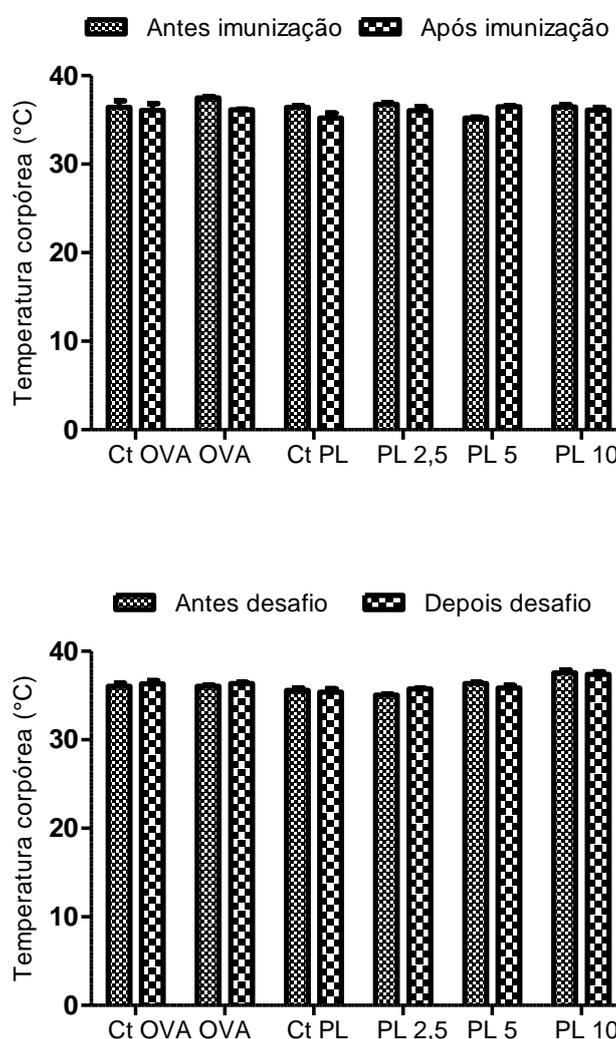
De acordo com a avaliação destes parâmetros, PL na dose de 10 μ g por via intraperitoneal não foi capaz de induzir anafilaxia e o grupo PL 10 que recebeu previamente PL por via oral na dose de 10 mg/kg parece ter amenizado os sinais de anafilaxia.

Figura 36 - Sinais de anafilaxia após imunização (dia 28) e desafio (dia 42) de animais durante o experimento de tolerância oral.



Dados apresentados como média \pm erro padrão (5 animais/grupo). ($p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni). Diferença em relação controle OVA (*) e controle PL (#). Ct. OVA e Ct. PL: animais que não foram sensibilizados v.o e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente; OVA, PL 2,5, PL 5 e PL 10: animais que foram sensibilizados v.o com OVA ou PL nas doses de 2,5-10mg/kg e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente.

Figura 37 - Temperatura corpórea antes e depois da imunização (dia 28) e desafio (dia 42) de animais durante o experimento de tolerância oral.



Dados apresentados como média \pm erro padrão (5 animais/grupo). ($p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni). Diferença em relação controle OVA (*) e controle PL (#). Ct. OVA e Ct. PL: animais que não foram sensibilizados v.o e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente; OVA, PL 2,5, PL 5 e PL 10: animais que foram sensibilizados v.o com OVA ou PL nas doses de 2,5-10mg/kg e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente.

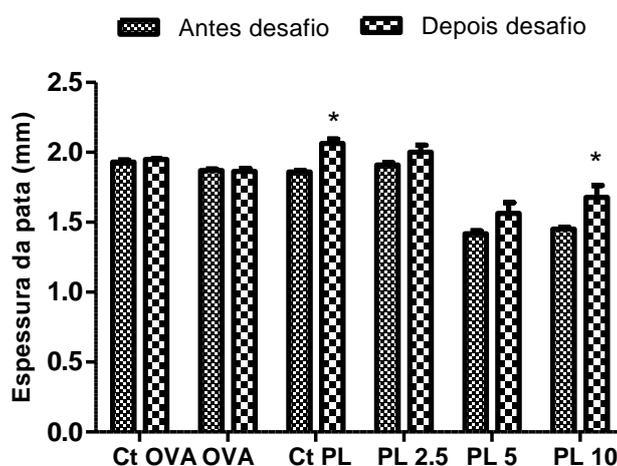
5.3.3 Reação de hipersensibilidade tardia (DTH)

A reação de hipersensibilidade do tipo tardia está relacionada com a resposta imune mediada por células, a qual se encontra atenuada em estado de tolerância oral.

Ao final do protocolo de tolerância oral, os animais foram desafiados por via subcutânea com PL na pata direita e a espessura da mesma foi medida antes e

24 horas após o desafio (Figura 38). O grupo controle PL teve aumento significativo de 11% na espessura da pata, enquanto os grupos PL 2,5 e 5 aumentaram respectivamente 4,7 e 9,8%, mas essa diferença não foi significativa. Já o grupo PL 10 teve um aumento significativo de espessura de 16%.

Figura 38 - Reação de hipersensibilidade do tipo tardia avaliada em animais submetidos ao protocolo de tolerância oral.



Dados apresentados como média \pm erro padrão (5 animais/grupo). ($p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni). Diferença em relação a 24 horas após o desafio (*). Ct. OVA e Ct. PL: animais que não foram sensibilizados v.o e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente; OVA, PL 2,5, PL 5 e PL 10: animais que foram sensibilizados v.o com OVA ou PL nas doses de 2,5-10mg/kg e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente.

5.3.4 Perfil de citocinas

Ao final do experimento, os animais foram necropsiados e os baços foram retirados para avaliação dos teores de citocinas como IL4, IFN- γ e IL10.

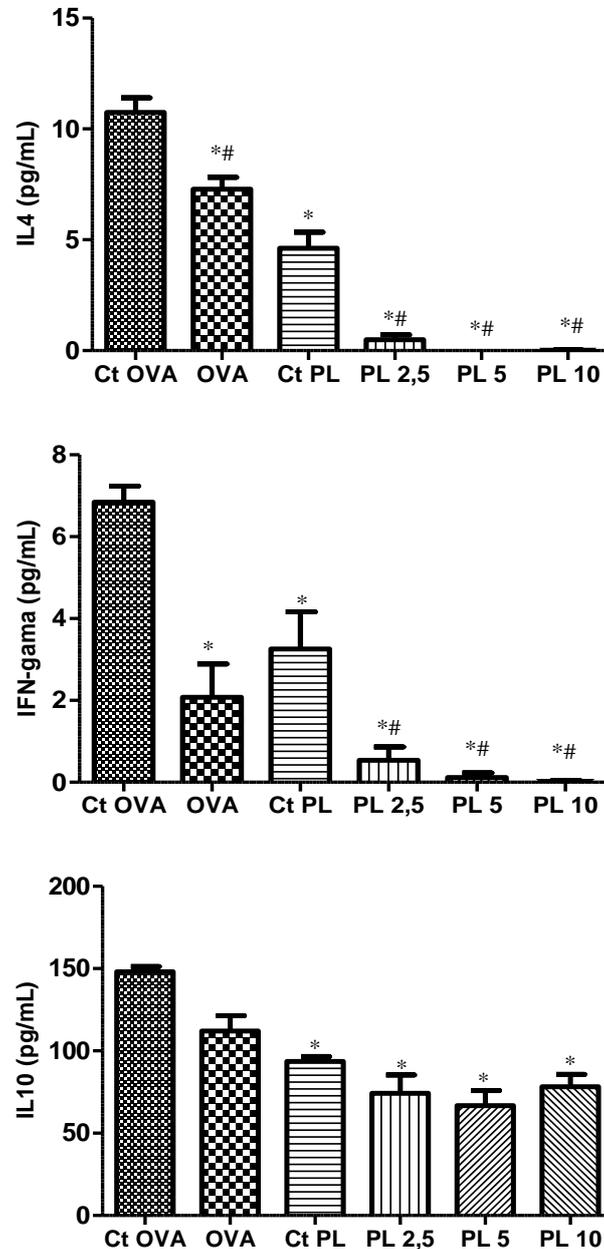
No estado de tolerância oral, os níveis destas citocinas estão mais baixos. Foi possível observar que para as citocinas IL4 e IFN- γ (Figura 39), os grupos que foram tratados oralmente com PL ou OVA apresentaram menores concentrações de ambas citocinas em relação aos seus controles, os quais só receberam salina por via oral.

Intensa redução de ambas citocinas foi observada para os grupos tratados oralmente com PL nas diferentes doses. Para IL4, observou-se uma

redução de 90, 100 e 99% nos grupos PL 2,5; PL 5 e PL 10, respectivamente em relação ao controle PL. Para IFN- γ a redução também foi intensa, com 84, 97 e 99% de redução nos grupos PL 2,5; PL 5 e PL 10, respectivamente. Entretanto, para a citocina IL10 o mesmo perfil não se repetiu. Os valores obtidos para os grupos tratados oralmente com PL ou OVA não reduziram de forma significativa.

A redução dos níveis de IL4 e IFN- γ nos grupos tratados oralmente com PL indica uma possível tolerância oral.

Figura 39 - Níveis de citocinas em homogenatos de baços de animais durante o experimento de tolerância oral



Dados apresentados como média \pm erro padrão (5 animais/grupo). ($p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni). Diferença em relação controle OVA (*) e controle PL (#). Ct. OVA e Ct. PL: animais que não foram sensibilizados v.o e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente; OVA, PL 2,5, PL 5 e PL 10: animais que foram sensibilizados v.o com OVA ou PL nas doses de 2,5-10mg/kg e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente.

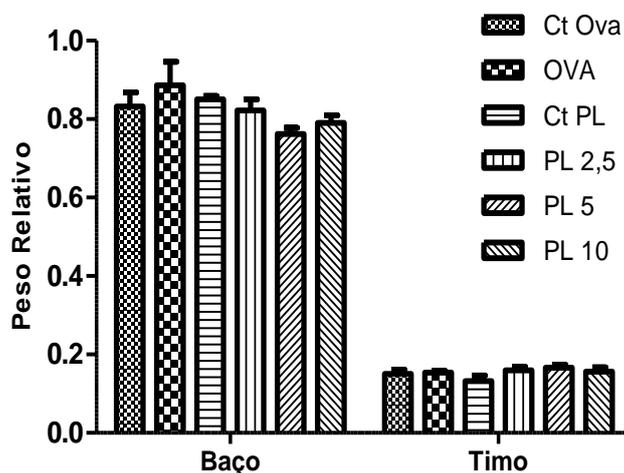
5.3.5 Pesos dos órgãos linfoides e histologia do intestino

Ao final do experimento, órgãos como baço, timo e intestino foram retirados. Órgãos linfoides, como baço e timo, foram pesados e o intestino delgado foi fracionado em três partes, sendo a parte central (jejuno) fixada em formol e encaminhada para análises histológicas.

Apesar dos pesos do baço e do timo poderem ser afetados em situações de desequilíbrio ou resposta imunológica, os pesos destes órgãos não foram afetados pelo experimento de tolerância oral realizado (Figura 40).

Nas manifestações alérgicas, o intestino delgado sofre um processo inflamatório com aumento de células mucíferas, produção de muco, presença de edemas, infiltrados celulares e aumento de recrutamento de eosinófilos. Os grupos que receberam PL por via oral apresentaram um discreto aumento na produção de células mucíferas e produção de muco com presença de edema, de maneira dose dependente (Figura 41).

Figura 40 - Pesos relativos dos órgãos linfoides, baço e timo de animais durante o experimento de tolerância oral.



Dados apresentados como média \pm erro padrão (5 animais/grupo). ($p < 0.05$, ANOVA – Teste Bonferroni). Diferença em relação controle OVA (*) e controle PL (#). Ct. OVA e Ct. PL: animais que não foram sensibilizados v.o e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente; OVA, PL 2,5, PL 5 e PL 10: animais que foram sensibilizados v.o com OVA ou PL nas doses de 2,5-10mg/kg e foram imunizados e desafiados ip com OVA e PL, respectivamente.

Figura 41 - Microestrutura do intestino delgado de animais tratados com PL 2,5; 5 e 10

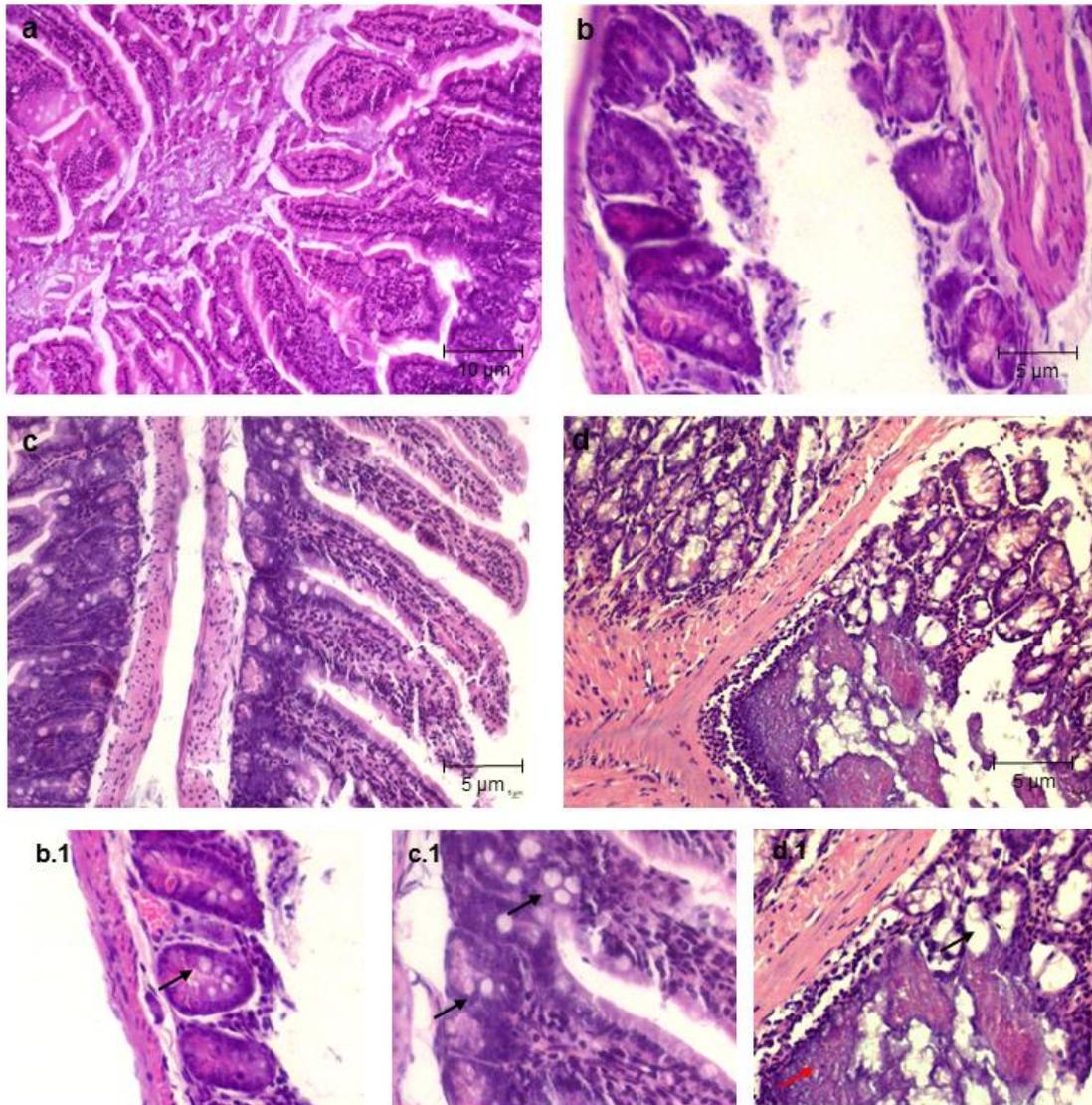


Foto representa o todo e detalhes (H&E 100 x e 200 x). Controle: animais que não foram sensibilizados v.o e foram imunizados e desafiados ip com PL; PL 2,5, PL 5 e PL 10: animais que foram sensibilizados v.o PL nas doses de 2,5-10mg/kg e foram imunizados e desafiados ip com PL, respectivamente. a. controle: sem alterações; b. PL 2,5: presença de células mucíparas em quantidades normais (b.1, setas pretas); c. PL 5: discreto aumento de células mucíparas (c.1, setas pretas); d. PL10: moderado aumento de células mucíparas (d.1, setas pretas) e aumento na produção de muco (d.2, setas vermelhas). obs.: setas pretas indicando observações.

6 DISCUSSÃO

Diversas propriedades farmacológicas documentadas cientificamente para a planta *Calotropis procera* validam suas aplicações na medicina tradicional. Várias partes de *C. procera* são utilizadas, principalmente na Ásia e no Norte da África, no combate de diferentes doenças, sendo o látex produzido pelos laticíferos provavelmente a principal fonte dos compostos ativos.

Estudos sobre as propriedades toxicológicas de *C. procera* foram relatados por El Badwi e colaboradores em 1998. Neste estudo, foi observada a morte de cabras que receberam látex de *C. procera* por via oral ou por via intravenosa. Efeitos tóxicos no coração e nos testículos de animais foram relatados recentemente por Ahmed et al. (2016), quando extratos etanólicos de folhas e látex de *C. procera* foram administrados por via oral. Estes efeitos também são de conhecimento popular, visto que há relatos na literatura em que *Calotropis procera* também é utilizada para práticas de suicídios pela população da zona rural da Índia (KOSARAJU et al., 2015).

De fato, a literatura dedicada aos aspectos toxicológicos desta planta vem sendo estabelecida (WAIKAR; SRIVASTAVA, 2015), apesar de ainda sofrer certo grau de limitação nas investigações em relação ao látex e de suas frações orgânicas. Ademais, a toxicologia das proteínas do látex ainda permanece não determinada.

Em estudos anteriores (FREITAS et al., 2007), realizados no laboratório de plantas laticíferas, com o látex de *C. procera*, foi determinado que a fração de borracha compreende mais de 90% da matéria-seca, e a fração de proteínas solúveis é inferior a 3%. Teores de outros compostos, tais como metabólitos secundários, ainda precisam ser estimados. Muitas propriedades químicas e atividades farmacológicas têm sido descritas na literatura para a fração proteica solúvel (FREITAS et al., 2012, OLIVEIRA et al., 2010, FREITAS et al., 2016). Por conseguinte, a toxicidade observada, pelo menos em parte, é ocasionada pela borracha presente no látex.

A remoção eficiente do conteúdo de borracha do látex não é um processo laborioso, portanto este procedimento não deve ser um empecilho para os usos farmacológicos indicados para esta planta. Após a coleta, os simples processos de centrifugações e diálises aos quais o látex é submetido, já garantem a recuperação

das proteínas laticíferas livres de borracha e componentes do látex (Alencar et al., 2006).

Apesar dos avanços na purificação de proteínas do látex e a descrição de suas propriedades funcionais e moleculares, dados relacionados às suas propriedades toxicológicas ainda não estão disponíveis. Esta é uma situação incoerente, desde que uma literatura robusta aponta as proteínas do látex como fortes candidatas a serem responsáveis pelas diversas propriedades farmacológicas atualmente conhecidas para o mesmo. Dentre estas propriedades, temos a supressão do crescimento tumoral, efeitos antiartríticos e antissépticos e prevenção da mucosite induzida por via oral e intestinal (OLIVEIRA *et al.*, 2010; KUMAR *et al.* 2006; CHAUDARY *et al.* 2016; OLIVEIRA *et al.* 2012; FREITAS *et al.* 2012; ALENCAR *et al.* 2016).

Embora a medicina tradicional tenha sua importância já reconhecida, frequentemente essas terapias são empíricas, sem definição de tempo de tratamento, dosagens diárias e uso específico. Portanto, esforços atuais foram direcionados para a compreensão da ação biológica das proteínas extraídas do látex de *C. procera*, levando em conta toda experiência anterior com as propriedades bioquímicas e farmacológicas da amostra, denominada PL.

As observações do grupo de pesquisa Proteínas Laticíferas, que trabalha há mais de uma década, indicam PL como detentora de uma forte atividade proteolítica, a qual se mantém perene e constante em todas nossas amostras após processamento. Esta atividade foi confirmada através de ensaios de atividade proteolítica total, antes que amostras de PL, ou de suas frações, fossem administradas nos ensaios *in vivo*.

Os dados apresentados neste estudo e outras observações não publicadas, nos permitem sugerir que essa atividade endógena, por um lado, tem efeito negativo quando PL é administrada intraperitonealmente a animais. Por outro lado, a atividade proteolítica desencadeia eventos inflamatórios iniciais que sinalizam e melhor direcionam a resposta imune adaptativa. Esse controle da imunidade adaptativa pela imunidade inata é atualmente um paradigma bem estabelecido (IWASAKI & MEDZHITOV, 2015).

Os efeitos desta atividade proteolítica podem explicar os danos ostensivos observados na cavidade peritoneal dos animais, a resposta de IgE e o aumento de mediadores pró-inflamatórios. No entanto, animais que receberam PL oralmente

mantiveram-se de forma saudável, talvez por esta atividade contribuir para uma digestibilidade parcial das proteínas alimentares.

As implicações da atividade proteolítica por via intravenosa (i.v) não foram aqui consideradas. No entanto, estudos mostram que PL, em baixas doses, 5 e 25 mg/kg i.v, diminui processo inflamatório causado por artrite (KUMAR *et al.*, 2014), atua como anti-inflamatório inibindo vários mediadores pró-inflamatórios (KUMAR *et al.*, 2015), além de promover melhorias em animais com quadro de mucosite intestinal, quando administrado nas doses de 5 e 50 mg/kg (ALENCAR *et al.*, 2016). Porém, avaliação de toxicidade aguda, com altas doses, por esta via, devem produzir resultados imprevisíveis, visto que a atividade proteolítica de PL apresentou tanta atividade fibrinogenolítica como fibrinolítica em ensaios *in vivo* (RAMOS *et al.*, 2012).

A administração oral de PL não ocasionou nenhum efeito adverso significativo quando administrada em altas doses (2000 e 5000 mg/kg). Teste limite (5000 mg/kg) é utilizado para substâncias não tóxicas ou que apresentem baixa toxicidade (MOH, 2003). Apesar de discretas alterações no perfil comportamental e aumento no número de monócitos, estas alterações não foram acompanhadas de mudanças nos demais parâmetros avaliados. O aumento de monócitos também foi observado nos estudos de Oliveira e colaboradores (2010), que mostraram *in vivo* inibição do crescimento tumoral, quando camundongos receberam PL por via oral. O aumento da contagem de monócitos sugere que PL, de fato, desencadeia estimulação imune. Em estudos mais recentes, PL foi denominado como fitomodulador devido à capacidade de ativar a resposta imune-inflamatória (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Logo PL, por via oral, para a dose limite testada, é considerada substância de baixa toxicidade e pode ser classificada na categoria 5 do Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas - GHS (OECD, 2008).

Enquanto a DL50 de PL, por via oral, está acima de 5000 mg/kg, a do látex e das folhas de *C. procera* foram determinadas em 1,3 mL /kg (FAHIM *et al.*, 2016) e 95,52 mg/kg (EL-SHAFFEY *et al.*, 2011), respectivamente. Estes dados sugerem que a toxicidade aguda / letal do látex, quando administrado por via oral, deve estar relacionada à borracha e às frações orgânicas.

Em relação à via intraperitoneal, nas maiores doses (300 e 150 mg/kg), PL ocasionou morte em 30 minutos a 1 hora após aplicação. A forte atividade proteolítica presente em PL, nestas concentrações, deve ser a principal responsável por sintomas de letargia, contorções intensas entre outros, assim como vermelhidão e hemorragias na cavidade peritoneal. Sintomas de letargia com diminuição da atividade locomotora já foram documentados, em camundongos, quando PL foi administrada i.p nas doses de 50 e 100 mg/kg (LIMA *et al.*, 2010), sugerindo um efeito depressor do sistema nervoso central. Ademais, a presença de vermelhidão e hemorragias na cavidade intraperitoneal pode ser resultado de um possível efeito vascular, elevando a pressão arterial e provocando a ruptura de vasos sanguíneos. Além disso, efeitos hemolíticos e anticoagulantes também podem estar envolvidos contribuindo para os efeitos observados.

A dose de 75 mg/kg, ainda ocasionou 20% de morte, entretanto quando PL foi inibida com iodoacetamida, houve 100% de sobrevivência. Adicionalmente, para confirmar a hipótese que a atividade proteolítica é o principal efeito responsável pela toxicidade da amostra, foram avaliadas as ações de PL-PI e PL-PII IAA na dose de 75 mg/kg. PL-PI é uma mistura complexa de isoformas de quitinases (Freitas *et al.*, 2016), não apresentando atividade proteolítica e PL-PII apresenta alta atividade proteolítica (RAMOS *et al.*, 2012), por isso foi inibida com iodoacetamida. Tanto PL-PI como PL-PII IAA não causaram morte aos animais, confirmando assim nossa hipótese de que a morte pode ter sido causada pela atividade proteolítica. Paralelamente, doses menores (35 e 15 mg/kg) foram avaliadas no intuito de obter a menor dose que não causasse efeitos adversos. Essas duas doses não causaram efeitos adversos significativos. Isto já era esperado visto que, trabalhos anteriores com doses semelhantes (5-30mg/kg), por via intraperitoneal, mostraram atuação benéfica de PL com efeitos farmacológicos como atividade anti-inflamatória, antitumoral e sobrevida de animais sépticos (ALENCAR *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2012).

Os animais sobreviventes dos diferentes tratamentos, por via i.p, apresentaram de forma geral perda de peso e alterações discretas nos parâmetros fisiológicos. A mortalidade é um sintoma óbvio de toxicidade, porém outras variáveis podem indicar efeitos adversos tais como perda de peso, diminuição ou aumento no consumo de água, ração e produção de fezes e urina (TRAESEL *et al.*, 2014). Alterações no consumo de ração e na produção de fezes foram observadas para

diferentes grupos que receberam PL i.p, entretanto estas alterações se mantiveram dentro dos parâmetros fisiológicos normais para espécie (ANDRADE *et al.*, 2002).

Variações no peso relativo de órgãos vitais também podem ser considerados sinais de toxicidade (CUNHA *et al.*, 2009). Os pesos relativos dos fígados de camundongos do grupo PL 15 diminuíram significativamente em relação ao controle, entretanto esta alteração não foi considerada sinal de toxicidade, desde que não foram observadas mudanças nos marcadores bioquímicos de danos no fígado (AST e ALT) e na avaliação histológica.

A avaliação histológica dos tecidos de animais tratados com PL (i.p) na dose de 150 mg/kg revelou intensa congestão e hemorragias no fígado e rins. Já na dose de 75 mg/kg, não foi possível observar qualquer efeito adverso. Entretanto, efeitos tóxicos discretos e isolados foram observados no fígado como congestão vascular (PL 35) e degeneração hidrópica (PL-PI) e retração da cápsula de Bowman, alterações na estrutura glomerular e células necróticas nos rins (PL 35 e PL 75 IAA).

Congestão vascular com presença de hemossiderose é um indicador de impacto negativo sobre a capacidade de reciclagem de ferro no fígado, o qual é liberado em excesso durante a hemólise (ALMANSOUR *et al.*, 2017). Já a degeneração hidrópica é caracterizada pela entrada de água nas células resultando em citoplasma pálido, núcleo desorganizado e deslocado para a periferia. Esta lesão citoplasmática pode resultar em perturbações das membranas dos hepatócitos que levam ao influxo maciço de água e Na⁺ (DEL MONTE, 2005).

Látex de *C. procera* quando administrado em ratos na dose de 1 mL/kg por via intraperitoneal, ocasionou a morte de todos os animais com até 2 horas de aplicação da amostra. Vasta degeneração hidrópica com congestão sinusoidal e depósito de hemossiderose foram observadas nos hepatócitos. O coração também foi fortemente afetado apresentando entre outros danos, necrose das fibras musculares, infiltrados de células inflamatórias, granulação basofílica e pertinente vacuolização do sarcoplasma (LIMA *et al.*, 2011). No presente estudo, tecidos do coração não foram afetados com administração de PL. Entretanto, congestão vascular foi observada nas maiores doses e degeneração hidrópica em baixa intensidade nos fígados dos animais do grupo PL-PI, porém não foram observadas no PL-P II.

Alterações nas estruturas dos glomérulos, assim como retração da cápsula de Bowman podem estar relacionadas com a diminuição de fluxo sanguíneo

para os glomérulos (DA SILVA *et al.*, 2008), que podem levar a quadros isquêmicos com presença de células necróticas. Desorganização nesta delicada anatomia, implicam na adaptação da função renal na tentativa de manter a homeostase, observada em quadros clínicos de hipertensão e diabetes (KAMBHAM *et al.*, 2001; DE PAULA *et al.*, 2006; KRIKKEN *et al.*, 2009).

Danos nos rins também foram observados quando uma dose de 132 $\mu\text{L}/\text{kg}$ de látex de *C. procera*, referente à 1/10 da DL50, por via oral, foi administrada em ratos por 8 semanas. Desorganização da arquitetura do rim, presença de vacuolização, congestão dos capilares, focos de necroses associados com infiltrações de células mononucleares, assim como apoptose do epitélio tubular renal foram mensurados (FAHIM *et al.*, 2016). Já a administração intraperitoneal de PL em baixas doses (75 e 35 mg/kg), no presente estudo, ocasionou alterações discretas e que não foram acompanhadas com aumento de creatinina e ureia (marcadores de danos renais), ou seja, alterou discretamente a morfologia mas não a função.

Estes dados sugerem, novamente, que o maior potencial de toxicidade se encontra na fração da borracha. A atividade proteolítica, presente em PL, está associada a danos ostensivos, entretanto, mesmo quando inibida, sinais marginais foram revelados pela histologia. Estes sinais estão, provavelmente, associados às proteínas presentes na fração PL-PI, que anteriormente, demonstrou ser citotóxica para diferentes células cancerosas com valores de IC50 abaixo de 3 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

De acordo com avaliação toxicológica aguda i.p, PL foi classificada na categoria 3 do sistema GHS, com LD50 entre 50-300mg/kg. A literatura relata inúmeros estudos de atividades farmacológicas de relevância clínica por via intraperitoneal. Estes estudos estabeleceram que PL é promissora em doses tão baixas como 5 mg/Kg. Conseqüentemente, as avaliações realizadas neste trabalho sugerem que PL pode ser administrada, com segurança, nessa concentração. Contudo, são necessários mais estudos e monitoramentos de dados, a fim de validar seu uso seguro em seres humanos.

Outra barreira é a alergenicidade que deve ser superada antes que as proteínas possam ser propostas como bioterapêuticas. A tolerância imunológica às proteínas de *C. procera* foi avaliada através de sua administração oral seguida de imunização/desafio por via intraperitoneal.

Estudo anterior de Ramos et al (2007) mostrou que animais que receberam PL por via oral praticamente não responderam imunologicamente, com uma discreta produção de IgG e ausência de produção de IgA e IgE. Entretanto, PL foi capaz de desencadear consistentes respostas de IgE, IgG, IgA e de anafilaxia. Um aumento expressivo na produção de IgE está relacionado a resposta alérgicas. Desde que PL vem demonstrando um grande potencial como fitoterápico, torna-se imprescindível o entendimento dos seus efeitos adversos.

A maioria das substâncias administradas por via oral tende a induzir uma tolerância imunológica como um processo fisiológico normal do organismo, no intuito de evitar reações alérgicas alimentares. Como PL por via oral não induziu uma expressiva resposta imunológica, surgiu o questionamento se teria ocorrido a indução de tolerância oral. Como observado nos resultados do presente trabalho, quando os animais foram expostos a um protocolo de administração oral de PL, induziu-se tolerância para estas proteínas. O delineamento experimental realizado foi estabelecido de acordo com estudos anteriores (SIMIONI *et al.*, 2004, Kim et al., 2013).

Ovalbumina é a proteína mais abundante (58%) na clara do ovo e é considerada o segundo alérgeno mais importante, depois da ovomucoide, envolvido em reações de hipersensibilidade ocasionadas por ovos (DHANAPALA *et al.*, 2015). Ela já vem sendo usada há tempos como modelo padrão de proteína para estudos de alergenicidade (KNIPPELS *et al.*, 1998). Alguns autores não consideram a OVA um alérgeno ideal para modelos de alergenicidade, pois costuma desencadear tolerância imunológica em camundongos em exposição crônica (GUALDI *et al.*, 2010). Conseqüentemente, vem sendo usada em protocolos de indução de tolerância oral, incluindo os trabalhos de Simioni et al. (2004) e Kim et al. (2013) que deram suporte ao desenho experimental deste trabalho. No presente estudo, o grupo OVA parece ter induzido tolerância com diminuição de IgE, IL-4, IFN- γ e ausência de DTH.

O perfil hematológico avaliado para os diferentes grupos tratados, não apresentou alterações no número de eosinófilos e basófilos. Eosinófilos e basófilos são células efetoras predominantes nas reações alérgicas (PEREIRA *et al.*, 2008) entretanto, no estado de tolerância essas células encontram-se em menores quantidades. A menor produção dos níveis de IgE em soro de camundongos tratados oralmente com PL sugeriu que a tolerância imunológica foi alcançada

(LABROSSE *et al.*, 2016). A diminuição de IgG e manutenção da produção de IgA também dão suporte a hipótese de tolerância oral.

A tolerância imunológica é manifestada pela inabilidade de um determinado organismo em produzir anticorpos ou ativar resposta celular, quando este é induzido, por administração oral, a antígenos inócuos. Imunoterapias direcionadas a pacientes com alergias alimentares utilizam o princípio de indução de tolerância oral para alcançar a dessensibilização, evitando os sintomas clínicos típicos de reações alérgicas (LEMON-MULE *et al.*, 2008; LEONARD *et al.*, 2012).

Protocolos de tolerância oral, aplicados às imunoterapias, têm se mostrado bastante efetivos, principalmente, na supressão da produção de IgE em respostas alérgicas (BAEK *et al.*, 2017). Destaca-se que imunoterapia oral para o tratamento de alergias ao leite, ovos e amendoim levou a uma diminuição de níveis séricos de IgE e dos números de mastócitos e basófilos determinados pelo teste cutâneo de alergia (Prick test) e teste de ativação de basófilos, respectivamente, após 3-6 meses de tratamento (MARTORELL *et al.*, 2011; GARCÍA RODRÍGUEZ *et al.*, 2011; JONES *et al.*, 2009). OVA irradiada com raios gama induziu tolerância oral em camundongos BALB/c quando administrada oralmente e posteriormente por via i.p, diminuindo os níveis séricos de IgE e Igs totais (IgG+ IgM + IgA) (YANG *et al.*, 2016).

IgA, produzida em resposta de mucosa, é um importante fator regulatório de possíveis quadros de alergia, uma vez que sua produção inibe respostas anafiláticas induzidas por ingestão de antígenos/alérgenos (STRAIT *et al.*, 2011). Neste estudo, a diminuição de IgE e IgG foi acompanhada de uma produção constante de IgA nos grupos tratados oralmente com PL, contribuindo para a manutenção da homeostasia imunológica e possível redução da alergenicidade já relatada para PL.

A indução de tolerância oral pode ser tipicamente mensurada pela redução na produção de citocinas, proliferação de células T e no sistema de hipersensibilidade do tipo tardia (PAST; MOWAT, 2012). Os níveis reduzidos de IL-4 e IFN- γ suportam a hipótese de indução da tolerância. IL-4 atua diretamente sobre os mastócitos impulsionando sua proliferação intestinal e aumentando a suscetibilidade à anafilaxia em modelos murinos de alergia (BURTON *et al.*, 2013). Enquanto IFN- γ é a principal citocina ativadora de macrófagos e exerce funções críticas na imunidade inata e na imunidade adaptativa mediada por células

(MINCIULLO *et al.*, 2016). A produção e proliferação de IL4 e IFN- γ foram reduzidas em esplenócitos de camundongos tratados por 28 dias com clara de ovo em pó submetida a tratamento térmico, sugerindo que a alimentação a longo prazo com clara de ovo pode induzir tolerância mediada por células T (WATANABE *et al.*, 2014). Ademais, Simioni e colaboradores (2004) mostraram que células dendríticas isoladas de camundongos tolerantes foram pouco eficientes na indução da proliferação de IFN- γ , IL-4 e IL-10.

IL-10 é uma citocina imunossupressora que tem como prioridade a manutenção da tolerância, apresentando diferentes ações sobre as respostas celulares e humorais (WAMBRE *et al.*, 2012). Em vários trabalhos, cita-se um aumento dos níveis de IL-10 (CABRERA; URRÁ, 2015, VICKERY *et al.*, 2010, JONES *et al.*, 2009). Contudo, como observados nos resultados, IL-10 manteve-se inalterada. Todavia, outros estudos também mencionaram a baixa produção de IL-10 em estados estabelecidos de tolerância oral (TOBAGUS *et al.*, 204; YAMASHITA *et al.*, 2012; SIMIONI *et al.*, 2004).

Quando observados os resultados da resposta de hipersensibilidade tardia (DTH), não há um aumento significativo nos animais tratados com 2,5 ou 5,0 mg/Kg de PL, mas sim nos tratados com 10 mg/Kg. DTH é parâmetro de interesse na avaliação de indução de tolerância oral (KUMAR *et al.*, 2014), tendo sido totalmente suprimida em estudo de tolerância induzida por OVA (KARLSSON *et al.*, 2010). No presente trabalho isto não foi observado para a dose de 10 mg/kg. Como IL-10 é uma citocina anti-inflamatória envolvida na regulação negativa da resposta celular (MÜLLER *et al.*, 2002), a baixa produção de IL-10 pode explicar a não supressão da DTH (hipersensibilidade do tipo IV) na concentração de 10mg/kg de PL. Wang e colaboradores (2016) também mostraram a relação da produção de IL10 e TGF- β na supressão da resposta DTH induzida por ovalbumina. Por outro lado, os sinais clínicos de anafilaxia (hipersensibilidade do tipo I) foram reduzidos em animais quando PL foi administrada a 10 mg/Kg.

As reações alérgicas afetam vários parâmetros relacionados com o peso e temperatura corpórea, peso de órgãos linfoides como baço e timo. No estado de tolerância imunológica, essas reações devem ser inibidas ou enfraquecidas (GOMES-SANTOS *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2014; YAMASHITA *et al.*, 2012). O ganho de peso dos animais ao longo dos 50 dias de experimento foi considerado discreto, talvez por aversão à substância alérgica. Esta aversão foi relatada no

trabalho de Gomes-Santos e colaboradores (2015) em animais sensibilizados e desafiados com proteínas do soro do leite. Este fenômeno envolve mudança de comportamento animal ativando áreas cerebrais relacionadas com os níveis séricos de IgE (BASSO *et al.*, 2003). Os demais parâmetros, como temperatura e peso dos órgãos, não apresentaram maiores alterações.

O intestino é exposto continuamente a uma vasta quantidade de materiais antigênicos provenientes da alimentação (PAST; MOWAT, 2012). A superfície gastrointestinal tem naturalmente a capacidade de induzir tolerância contra estes antígenos exógenos (TSUJI; KOSAKA, 2014). Falhas na indução de tolerância a proteínas podem desencadear quadros de reações alérgicas (MERESSE *et al.*, 2009).

Fortalecendo a hipótese de que PL foi capaz de induzir tolerância quando administrada previamente por via oral, observou-se que PL não desencadeou perfil inflamatório típico de alérgenos. PL desencadeou um leve processo inflamatório de maneira dose-dependente, apresentando aumento na produção de células mucíparas assim como na produção de muco e formação de edema para as doses de 5 e 10 mg/kg. Entretanto, nenhum tratamento foi capaz de induzir infiltrados celulares e aumento de eosinófilos.

Diferentes relatos na literatura mostram aumento de infiltrado inflamatório induzido pelo contato com alérgenos como no trabalho de Gomes-Santos *et al.* (2015) que mostrou que camundongos sensibilizados com proteínas do leite apresentaram edema com aumento de infiltração de células inflamatórias no intestino. Como parte dessa reação inflamatória, houve aumento de 10 vezes no número de eosinófilos na mucosa do intestino, enquanto animais tolerantes tratados com proteínas do soro hidrolisadas tiveram estes sintomas atenuados (GOMES-SANTOS *et al.*, 2015). Também foi relatada a hiperplasia de células mucíparas em intestino delgado, porção jejuno, de animais modelos de alergia que foram sensibilizados com proteínas de sementes de arroz (CHEN *et al.*, 2011).

Adicionalmente, camundongos modelo de alergia alimentar (que expressam receptores de células T específicos para epítopos de OVA) foram submetidos a uma dieta com clara de ovo e apresentaram vários sinais inflamatórios no intestino delgado, incluindo hiperplasia de células mucíparas, atrofia nas vilosidades, excesso de infiltrados celulares na lâmina própria e espessamento da camada muscular. Entretanto, quando os animais foram alimentados com clara de

ovo submetida a tratamento térmico (100°C), apresentaram somente um aumento no número de células mucíperas, sem observações de outros sintomas inflamatórios. Watanabe e colaboradores (2014) concluíram, juntamente com outros parâmetros avaliados, que o tratamento térmico aplicado a clara de ovo não somente reduziu sua alergenicidade, como também induziu tolerância em animais responsivos a OVA. A fração proteica (PL) de *Calotropis procera*, em nosso estudo, alcançou resultados semelhantes ao de Watanabe e colaboradores (2014), sem necessidade de tratamento térmico. No entanto, para o estabelecimento do uso seguro de PL, mais estudos devem ser abordados.

7 CONCLUSÃO

As proteínas do látex de *Calotropis procera* apresentam baixa toxicidade e imunogenicidade por via oral, evidenciadas pelos ensaios de toxicidade aguda e de tolerância oral. A atividade proteolítica foi o principal efeito adverso apresentado por PL pela via intraperitoneal. Entretanto, a tolerância oral foi induzida nas diferentes doses estabelecidas pelo protocolo experimental.

Embora PL seja considerada uma fonte promissora de proteínas bioterapêuticas, a identificação de moléculas individuais envolvidas nos efeitos desejados continua sendo o melhor caminho antes de apresentar estratégias para superar pontos-limite da amostra. Para o estabelecimento do uso seguro de PL, mais estudos devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

- ABHISHEK, D.; MOHIT, C.; ASHISH, G.; AMEETA, A. Medicinal utility of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. as used by natives of village Sanwer of Indore District, Madhya Pradesh. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**, v. 1, p. 188-190, 2010.
- AGAR, E.; BOSNAK, M.; AMANVERMEZ, R.; DEMIR, S.; AYYILDIZ, M.; CELIK, C. The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat. **Neuroreport**, v. 10, p.1799-1801, 1999.
- AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: modelo for understanding mechanisms, ecology and evolution plant defense against herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 40, p.311-331, 2009.
- AHMED, O. M.; FAHIM, H. I.; BOULES, M. W.; AHMED, H. Y. Cardiac and testicular toxicity effects of the latex and ethanolic leaf extract of *Calotropis procera* on male albino rats in comparison to abamectin. **SpringerPlus**, v. 5, p.1644, 2016.
- AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Therapeutic manipulation of immune tolerance in allergic disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 645–660, 2009.
- ALBUQUERQUE, T. M.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, J. G.; et al. Vascular permeability, neutrophil migration and edematogenic effects induced by the latex of *Cryptostegia grandiflora*. **Toxicon**, v. 53, p. 15–23, 2009.
- ALENCAR, N. M. N.; BITENCOURT, F. DA S.; FIGUEIREDO, I. S. T.; LUZ, P. B.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; ARAGÃO K. S.; MAGALHÃES, P. J. C.; BRITO, G. A. DE C.; RIBEIRO, R. A.; FREITAS, A. P. F.; RAMOS, M. V. Side-Effects of Irinotecan (CPT-11), the Clinically Used Drug for Colon Cancer Therapy, Are Eliminated in Experimental Animals Treated with Latex Proteins from *Calotropis procera* (Apocynaceae)‡. **Phytotherapy Research**,v. 31, p. 312–320, 2016.
- ALENCAR, N. M. N.; OLIVEIRA, J. S.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; VALE, M. R.; ETHELLETS, J. P.; FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V. Pro- and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflammation Research**, v. 55, p. 559–564, 2006.
- ALENCAR, N. M. N.; PINHEIRO, R. S. P.; FIGUEIREDO, I. S. T.; LUZ, P. B.; FREITAS, L. B. N.; SOUZA, T. F. G.; DO CARMO, L. D.; MARQUES, L. M.; RAMOS, M. V. The Preventive Effect on Ethanol-Induced Gastric Lesions of the Medicinal Plant *Plumeria rubra*: Involvement of the Latex Proteins in the NO/cGMP/KATP Signaling Pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 10, 2015.
- ALMANÇA, C. C. J.; SALDANHA, S. V.; SOUSA, D. R.; TRIVILIN, L. O.; NUNES, L. C.; PORFÍRIO, L. C.; MARINHO, B. G. Toxicological evaluation of acute and sub-chronic ingestion of hydroalcoholic extract of *Solanum cernuum* Vell. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 508–512, 2011.

ALMANSOUR, M. I.; ALFERAHB, M. A.; SHRAIDEHC, Z. A.; JARRARD, B. M. Zinc oxide nanoparticles hepatotoxicity: Histological and histochemical study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**.v.17, p. 46-7.2017.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório – criação e experimentação**. Editora Fiocruz, 2002.

AOKI, Y.; TAKAHASHI, S.; TAKAYAMA, D.; OGATA, Y.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; ASAWATRERATANAKUL, K.; WITITSUWANNAKUL, D.; WITITSUWANNAKUL, R.; SHIBATA, D.; KOYAMA, T.; NAKAYAMA, T. Identification of laticifer-specific genes and their promoter regions from a natural rubber producing plant *Hevea brasiliensis*. **Plant Science**, v. 225, p.1-8, 2014.

ASERO, R. Lipid transfer protein cross-reactivity assessed in vivo and in vitro in the office: pros and cons. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v 21, p. 129–136, 2011.

ASLANI, M.R.; MOVASSACHI, A.R.; MOHRI, M.; ABBASIAN, A.; ZAREHPOU, M. Clinical and pathological aspects of experimental oleander (*Nerium oleander*) toxicosis in sheep. **Veterinary Research Communications**. v. 28, p. 609–616, 2004.

BAEK, J. O.; ROH, J. Y.; JUNG, Y. Oral tolerance inhibits atopic dermatitis-like type 2 inflammation in mice by modulating immune microenvironments. **Allergy**, v.3, p.397-406, 2017.

BANDARA, V.; WEINSTEIN, S. A.; WHITE, J.; EDDLESTON, M. A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. **Toxicon**, v. 56, p. 273–281, 2010.

BASSO, A.S.;PINTO, F. A.; RUSSO, M.; BRITTO, L. R.; DE SÁ-ROCHA, L. C.; PALERMO NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology** v. 140, p. 69–77, 2003.

BITU, V. DE C. N.; BITU, V. DE C. N.; MATIAS, E. F. F.; DE LIMA, W. P.; PORTELO, A. DA C.; COUTINHO, H. D. M.; DE MENEZES, I. R. A. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.172, p. 265–272, 2015.

BLUESTONE, J. A. Mechanisms of tolerance. **Immunological Reviews**, v. 19, p. 241-5, 2011.

BONIFACE, P. K.; SINGH, M.; MAURYA, A. K.; PAL, A. Acute and sub-chronic toxicity of HPLC fingerprinted extract of *Conyza sumatrensis* (Retz.) E.H. Walker in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 833-837, 2013.

BOUSQUET, J.; FLAHAULT, A.; VANDENPLAS, O.; AMEILLE, J.; DURON, J. J.; PECQUET, C.; CHEVRIE, K.; ANNESI-MAESANO, I. Natural rubber latex allergy

among health care workers: a systematic review of the evidence. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, p. 447-54, 2006.

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

BREITENEDER, H.; MILLS, E. N. C. Molecular properties of food allergens. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 115, p. 14-23, 2005.

BRITO, A. S. **Manual de Ensaio Toxicológicos *in vivo***. Campinas: Unicamp. 122p, 1994.

BUENO, V.; PACHECO-SILVA, A. Tolerância oral: uma nova perspectiva no tratamento de doenças autoimunes. **Revista da Associação Médica Brasileira** , v. 1, p. 79-85, 1999.

BURTON, O. T, DARLING, A. R, ZHOU, J. S.; Noval-Rivas, M.; Jones, T. G.; Gurish, M. F.; Chatila, T. A.; Oettgen, H. C. Direct effects of IL-4 on mast cells drive their intestinal expansion and increase susceptibility to anaphylaxis in a murine model of food allergy. **Mucosal Immunology**, v. 4, p. 740–750, 2013.

CABRERA, C. M.; URRÁ, J. M. Food Allergy and the Oral Immunotherapy Approach. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v. 63, p. 31–39, 2015.

CERUTTI, A. The regulation of IgA class switching. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 421–434, 2008.

CHAUDHARY. P.; RAMOS, M. V.; VASCONCELOS, M. DA S.; KUMAR, V. L. Protective Effect of High Molecular Weight Protein Sub-fraction of *Calotropis procera* Latex in Monoarthritic Rats. **Pharmacognosy Magazine**, v.12, p. 147-151, 2016.

CHAUDHARY, P.; VIANA, C. A., RAMOS, M. V. ; KUMAR, V. L. Antiedematogenic and antioxidant properties of high molecular weight protein sub-fraction of *Calotropis procera* latex in rat. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 6, p 69-73, 2015.

CHEN, X.-W.; LAU, K. W.-K.; YANG, F.; SUN, S. S.-M.; FUNG, M.-C. An adjuvant free mouse model of oral allergenic sensitization to rice seeds protein. **BMC Gastroenterology**, v. 62, p. 1-7, 2011.

CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI, L. L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O.G.; SENA, A. A. S., LINO JUNIOR, R. S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólicos das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 19, p. 403-411, 2009.

DA SILVA, G.V.; GONÇALVES, A.B.; ORTEGA, K.C. MION JR, D. Alterações renais na hipertensão arterial sistêmica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 2, p. 175-81, 2008.

DEARMAN, R. J.; KIMBER, I. Animal models of protein allergenicity: potential benefits, pitfalls and challenges. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, p. 458–468, 2009.

DEL MONTE, U. Swelling of hepatocytes injured by oxidative stress suggests pathological changes related to macromolecular crowding. **Medical Hypotheses**, v. 4, p. 818–825, 2005.

DE PAULA, R.B. Obesidade, síndrome metabólica e progressão da lesão renal. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 23, p. 12-17, 2006.

DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V. L. Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 307–311, 2000.

DHANAPALA, P.; DE SILVA, C.; DORAN, T.; SUPHIOGLU, CENK. Cracking the egg: An insight into egg hypersensitivity. **Molecular Immunology**, v. 66, p. 375–383, 2015.

EL BADWI, S. M. A.; ADAM, S. E.; SHIGIDI, M. T.; HAPKE, H. J. Studies on laticiferous plants: toxic effects in goats of *Calotropis procera* latex given by different routes of administration. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 105, p. 425-427, 1998.

EL-SHAFFEY, A. A. M.; EL-MAHROUKY, F.; GABR, W. M.; KANDIL, R. A. Some Physiological and Biochemical Effects of Oshar Extract and Abamectin Biocide on Male Albino Rats. **Journal of American Science**, p. 254-261, 2011.

EL SHEIKH, H. A.; ALI, B. H.; HOMEIDA, A. M.; HASSAN, T.; IDRIS, O. F.; HAPKE, H. J. The activities of drug-metabolizing enzymes in goats treated orally with the latex of *Calotropis procera* and the influence of dieldrin pretreatment. **Journal of Comparative Pathology**, v. 104, p. 257-268, 1991.

FAHIM, H. I.; AHMED, O. M.; BOULES, M. W.; AHMED, H. I. Nephrotoxic Effects of Abamectin and *Calotropis procera* Latex and Leaf Extract in Male Albino Rats. **American Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 6, p. 73-86, 2016.

FAITH, A.; RICHARDS, D. F.; VERHOEF, A.; LAMB, J. R.; LEE, T. H.; HAWRYLOWICZ, C. M. Impaired secretion of interleukin-4 and interleukin-13 by allergen-specific T cells correlates with defective nuclear expression of NF-AT2 and jun B: relevance to immunotherapy. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 33, p. 1209–1215, 2003.

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

FLORINDO, M. I.; ARAGÃO, M. E. F.; SILVA, A. C. M.; OTOCH, M. L.; FERNANDES DE MELO, D.; LIMA, J. A. A.; SILVA LIMA, M. G. Immune response

induced in mice by oral immunization with cowpea severe mosaic virus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 827-835, 2002.

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

FREITAS, C. D. T.; CRUZ, W. T.; SILVA, M. Z. R.; VASCONCELOS, I. M.; MORENO, F. B. M. B.; MOREIRA, R. A. MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; ALENCAR, L. M. R.; SOUSA, J. S.; ROCHA, B. A. M.; RAMOS, M. V. Proteomic analysis and purification of an unusual germin-like protein with proteolytic activity in the latex of *Thevetia peruviana*. **Planta**, v. 243, p. 1115–1128, 2016.

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

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

FREITAS, C.D.T.; SOUZA, D.P.; ARAUJO, E.S.; CAVALHEIRO, M.G.; OLIVEIRA, L.S.; RAMOS, M.V. Anti-oxidative and proteolytic activities and protein profile of laticifer cells of *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra* and *Euphorbia tirucalli*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, p.11-22, 2010.

GARCÍA RODRÍGUEZ, R.; URRÁ, J. M.; FEO-BRITO F et al. Oral rush desensitization to egg: efficacy and safety. **Clinical & Experimental Allergy** v.41, p.1289–1296, 2011.

GUALDI, L. P.; PEREIRA, A. C.; MASIERO, L.; NUÑEZ, N. K.; CAO, R.; PITREZ, P. M. C. Murine models for asthma research: An updated critical analysis. **Scientia Medica**, v. 20, p. 236-242, 2010.

GOMES-SANTOS, A. C.; FONSECA, R. C.; LEMOS, L.; REIS, D. S.; MOREIRA, T. G.; SOUZA, A. L.; SILVA, M. R.; SILVESTRE, M. P. C.; CARA, D. C.; FARIA, A. M. C. Hydrolyzed whey protein prevents the development of food allergy to β -lactoglobulin in sensitized mice. **Cellular Immunology**, v. 298, p. 47-53, 2015.

GÓMEZ-CASADO, C.; DÍAZ-PERALES, A. Allergen-Associated Immunomodulators: Modifying Allergy Outcome. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v. 64, p. 339–347, 2016.

GOULD, H. J.; SUTTON, B. J. IgE in allergy and asthma today. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 205–217, 2008.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p. 1-93, 2006.

HELI, H.; AMANI, M.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; JABBARI, A.; FLORIS, G.; MURA, A. Electroactive centers in *Euphorbia* latex and lentil seedling amine oxidases. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.78, p.29-36, 2008.

HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 218–230, 2008.

IWASAKI, A.; MEDZHITO, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature Immunology**, v. 4, p. 343–353, 2015.

JONES, S. M.; PONS, L.; ROBERTS, J. L.; Scurlock, A. M.; Perry, T. T.; Kulis, M.; Shreffler, W. G.; Steele, P.; Henry, K. A.; Adair, M.; Francis, J. M.; Durham, S.; Vickery, B. P.; Zhong, X.; Burks, A. W. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, p.292–300, 2009.

JUCÁ, T. L.; RAMOS, M. V.; MORENO, F. B. M. B.; MATOS, M. P. V.; MARINHO-FILHO, J. D. B.; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. DE O. Insights on the Phytochemical Profile (Cyclopeptides) and Biological Activities of *Calotropis procera* Latex Organic Fractions. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

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

KAKKAR, A.; VERMA, D. R.; SURYAVANSHI, S.; DUBEY, P. Characterization of chemical constituents of *Calotropis procera*. **Chemistry of Natural Compounds**, v.48, p. 155–157, 2012.

KAMBHAM, N.; MARKOWITZ, G. S.; VALERI, A. M.; LIN, J.; D'AGATI, V. D. Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. **Kidney International**, v. 59, p.1498-1509, 2001.

KARLSSON, M. R.; JOHANSEN, F. E.; KAHU, H.; MACPHERSON, A.; BRANDTZAEG, P. Hypersensitivity and oral tolerance in the absence of a secretory immune system. **Allergy**, v. 65, p. 561–570, 2010.

KIM, K.; KIM, H.; SEO, K. H.; LEE, H.; KANG, B. Y.; IM, S. Cholera toxin breakdowns oral tolerance via activation of canonical NF- κ B. **Cellular Immunology**, v. 285, p. 92–99, 2013.

KNIPPELS, L. M.; PENNINKS, A. H.; SPANHAAK, S.; HOUBEN, G. F. Oral sensitization to food proteins: a Brown Norway rat model. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 28, p.368–375, 1998.

KOHL, S.; SCHOLZ-BÖTTCHER, B. M.; TESKE, J.; ZARK, P.; RULLKÖTTER, J. Cardiac glycosides from Yellow Oleander (*Thevetia peruviana*) seeds. **Phytochemistry**, v. 75, p. 114-27, 2012.

KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1510–1530, 2011.

KOSARAJU, S. K. M.; VADLAMANI, L. N.; BASHIR, M. S. M.; KALASAPATI, L. K.; RAO, G. L. V. C.; RAO, G. P. Risk Factors for Suicidal Attempts Among Lower Socioeconomic Rural Population of Telangana Region. **Indian Journal of Psychological Medicine**, v. 1, p. 3730–35, 2015.

KRIKKEN, J.A.; BAKKER, S. J. L.; NAVIS, G. J. Editorial Comment: Role of renal haemodynamics in the renal risks of overweight. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, p. 1708–1711, 2009.

KRITIKAR, K. R.; BASU, B. D. *In: Indian Medicinal Plants*, International Book Distributors, Dehradun, India, v. 3, p. 1610, 1999.

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

KUMAR, S.; SHARMA, A.; NEELABHB, SINGH, G.; VERMA, A. K.; ROY, R.; GUPTA, R.; MISRA, A.; TRIPATHI, A.; ANSARI, K. M.; DAS, M.; SHANKER, R.; DWIVEDI, P. D. Allergenic responses of green gram (*Vigna radiata L. Millsp*) proteins can be vitiated by induction of oral tolerance due to single acute dose in BALB/c mice. **Food Research International**, v. 57, p. 130–141, 2014.

KUMAR, S.; VERMA, A. K.; DAS, M.; DWIVEDI, P. D. Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy. **International Immunopharmacology**, v. 13, p. 432–439, 2012.

KUMAR, V. L.; BASU, N. Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, p. 123-125, 1994.

KUMAR, V. L.; GURUPRASAD, B.; CHAUDHARY, P.; FATMI, S. M. A.; OLIVEIRA, R. S. B.; RAMOS, M. V. Protective effect of proteins derived from *Calotropis procera* latex against acute inflammation in rat. **Autonomic and Autocoid Pharmacology**, v. 35, p.1–8, 2015.

KUMAR, V.L.; SHIVKAR, Y.M. In vivo and in vitro effect of latex of *Calotropis procera* on gastrointestinal smooth muscles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 377-379, 2004a.

KUMAR, V.L.; SHIVKAR, Y.M. Involvement of prostaglandins in inflammation induced by latex of *Calotropis procera*. **Mediators of Inflammation**, v. 13, p. 151-155, 2004b.

LABROSSE, R.; GRAHAM, ROCHES, A. D.; BÉGIN, P. The Use of Omalizumab in Food Oral Immunotherapy. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, 2016.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 - 685, 1970.

LARHSINI, M.; MARKOUK, M.; JAOUHARI, J.T.; BEKKOUICHE, K.; LAZREK, H.B.; JANA, M. The antipyretic activity of some Moroccan medicinal plants. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 97-98, 2002.

LEMON-MULE, H.; SAMPSON, H. A.; SICHERER, S. H.; SHREFFLER, W. G.; NOONE, S.; NOWAK-WEGRZYN, A. Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.122, p. 977-83, 2008.

LEONARD, S. A.; MARTOS, G.; WANG, W.; NOWAK-WEGRZYN, A.; BERIN, M. C. Oral immunotherapy induces local protective mechanisms in the gastrointestinal mucosa. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.129, p.1579-87, 2012.

LI, H.; CHEHADE, M.; LIU, W.; XIONG, H.; MAYER, L.; BERIN, M. C. Allergen-IgE complexes trigger CD23-dependent CCL20 release from human intestinal epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 133, p.1905–15, 2007.

LIMA, J. M.; FREITAS, F. J. C.; AMORIM, R. N. L.; CÂMARA, A. C. L.; BATISTA, J. S.; SOTO-BLANCO, B. Clinical and pathological effects of *Calotropis procera* exposure in sheep and rats. **Toxicol**, v. 57, p. 183–185, 2011.

LIMA-FILHO, J. V.; PATRIOTA, J. M.; SILVA, A. F. B.; NICODEMOS, T. F.; LIVEIRA, R. S. B.; ALENCAR, N. M. N.; RAMOS, M. V. Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Ethnopharmacology**, v.129, p. 327–334, 2010.

LIMA, R.; LIMA, N.; CHAVES, E.; LEAL, L.; PATROCÍNIO, M.; LOBATO, R.; RAMOS, M.; SOUSA, F. C. F.; CARVALHO, K.; VASCONCELOS, S. Central Nervous System Activity of Acute Administration of Latex Proteins from *Calotropis procera* in Mice. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v.7, p. 1-12, 2010.

LIMA, R. C. S.; SILVA, M. C. C.; AGUIAR, C. C. T.; CHAVES, E. M. C.; DIAS, K. C. F.; MACÊDO, D. S.; SOUSA, F. C. F.; CARVALHO, K. M.; RAMOS, M. V.; VASCONCELOS, S. M. M. Anticonvulsant action of *Calotropis procera* latex proteins. **Epilepsy & Behavior**, v. 23, p. 123–126, 2012.

LING, E. M.; SMITH, T.; NGUYEN, X. D.; PRIDGEON, C.; DALLMAN, M.; ARBERY, J.; CARR, V. A.; ROBINSON, D. S. Relation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. **Lancet**, v. 363, p. 608–615, 2004.

LIPSCOMB, M. F.; WILDER, J. A.; MASTEN, B. J. Dendritic cells and their role in linking innate and adaptive immune responses. **The biology of dendritic cells and HIV infection**, p. 45–84, 2007.

LUCETTI, D. L.; LUCETTI, E. C. P.; BANDEIRA, M. A. M.; VERAS, H. N. H.; SILVA, A. H.; LEAL, L. K. A. M.; LOPES, A. A.; ALVES, V. C. C.; SILVA, G. S.; BRITO, G. A.; VIANA, G. B. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Journal of Inflammation**, v. 7, p. 60, 2010.

MAHMOUD, O. M.; ADAM, S. E. I.; TARTOUR, G. The effects of *Calotropis procera* on small ruminants. II. Effects of administration of the latex to sheep and goats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 89, p. 251-263, 1979.

MARTORELL, A.; DE LA HOZ, B.; IBANEZ, M. D. Oral desensitization as a useful treatment in 2-year-old children with cow's milk allergy. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 41, p.1297–1304, 2011.

MATOS, M. P. V.; OLIVEIRA, R. S. B., DE ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; OLIVEIRA, J. S.; DOS SANTOS, B. J. A.; NISHI, B. C.; RAMOS, M. V. Ethnopharmacological Use and Pharmacological Activity of Latex from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **International Journal of Indigenous Medicinal Plants**, v. 29, p. 2051-4263, 2013.

MAYORAL, M.; CALDER'ON, H.; CANO, R.; LOMBARDERO, M. Allergic rhinoconjunctivitis caused by *Cannabis sativa* pollen. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 18, p. 73–74, 2008.

MELO, K. M.; CARVALHO, B. T. C. T regulatory cell: mechanism of action and function in human diseases. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**. v. 9, p. 184-5, 2009.

MERESSE, B. ; RIPOCHE , J. ; HEYMAN , M. ; CERF-BENSUSSAN , N . Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis . **Mucosal Immunology**. v. 2, p. 8 – 23, 2009.

MILLS, E. N. C.; JENKINS, J.; MARIGHETO, N.; BELTON, P. S.; GUNNING, A. P.; MORRIS, V. J. Allergens of the cupin superfamily. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 925–929, 2002.

MINCIULLO, P. L.; CATALANO, A.; MANDRAFFINO, G.; CASCIARO, M.; CRUCITTI, A.; MALTESE, G.; MORABITO, N.; LASCO, A.; GANGEMI, S.; BASILE, G. Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**. v. 64, p.111–126, 2016.

MOH, 2003. Procedures for Toxicological Assessment of Food. **GB 15193.1-2003**.Ministry of Health, PR China.

MOUSINHO, K. C.; OLIVEIRA, C. DE C.; FERREIRA, J. R. DE O.; CARVALHO, A. A.; MAGALHÃES, H. I. F.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P. N. N.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; MATOS, M. P. V.; RAMOS, M. V.; MORAES, M. O. Antitumor effect of laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel – Apocynaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p. 421– 426, 2011.

MUEEN AHMED, K.K.; RANA, A.C.; DIXIT, V.K. Effect of *Calotropis procera* latex on isoproterenol induced myocardial infarction in albino rats. **Phytomedicine**, v. 11, p. 327-330, 2004.

MÜLLER, G.; Müller, A.; Tüting, T.; Steinbrink, K.; Saloga, J.; Szalma, C.; Knop, J.; Enk, A. H. Interleukin-10-Treated Dendritic Cells Modulate Immune Responses of Naive and Sensitized T Cells In Vivo **Journal of Investigative Dermatology**, v. 119, p. 836-841, 2002.

NAKAJIMA-ADACHI, H.; EBIHARA, A.; KIKUCHI, A.; ISHIDA, T.; SASAKI, K.; HIRANO, K.; WATANABE, H.; ASAI, K.; TAKAHASHI, Y.; KANAMORI, Y.; SHIMOJO, N.; MATSUDA, H.; KOHNO, Y.; HACHIMURA, S.; KAMINOGAWA, S. Food antigen causes TH2-dependent enteropathy followed by tissue repair in T-cell receptor transgenic mice. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.117, p. 1125-32, 2006.

NASCIMENTO, D. C. DE O.; RALPH, M. T.; BATISTA, J. E. C.; SILVA, D. M. F.; GOMES-FILHO, M. A.; ALENCAR, N. M.; LEAL, N. C.; RAMOS, M. V.; LIMA-FILHO, J. V. Latex protein extracts from *Calotropis procera* with immunomodulatory properties protect against experimental infections with *Listeria monocytogenes*. **Phytomedicine**, v. 23, p. 745–753, 2016.

NOURSADEGHI, M.; TSANG, J.; HAUSTEIN, T.; MILLER, R.F.; CHAIN, B.M.; KATZ, D.R. Quantitative imaging assay for NF- κ B nuclear translocation in primary human macrophages. **Journal of Immunological Methods**, v.329, p.194-200, 2008.

OECD.- Organization for Economic Cooperation and Development. **Acute Toxic Class Method** (Guideline 423), 2001.

OECD.- Organization for Economic Cooperation and Development. **Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents** (Guideline 407), 2008.

OLIVEIRA, J. S.; BEZERRA, D. P.; FREITAS, C. D. T.; MARINHO FILHO, J. D. B.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; RAMOS, M. V. In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1563–1573, 2007.

OLIVEIRA, J. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BEZERRA, D. P.; ALENCAR, N. M. N.; MARINHO-FILHO, J. D. B.; FIGUEIREDO, I. S. T.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ALVES, A. P. N. N.; RAMOS, M. V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 382, p. 139–149, 2010.

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

PABST, O.; MOWAT, A. M. Oral tolerance to food protein. **Nature**, v. 5, p. 232-239, 2012.

PAHWA, R.; CHATTERJEE, V. C. The toxicity of Indian *Calotropis procera* R.Br latex in the black rat, *Rattus rattus* Linn. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 30, p. 305-308, 1988.

PEREIRA, A. C. DA SILVA.; MOURA, S. M.; CONSTANT, P. B. L. Food allergy: system immunologic and main food involved, **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, p. 189-200, 2008.

RAMOS, M. V.; AGUIAR, V. C.; MELO, V. M. M.; MESQUITA, R. O.; SILVESTRE, P. P.; OLIVEIRA, J. S.; OLIVEIRA, R. S. B.; MACEDO, N. M. R.; ALENCAR, N. M. N. Immunological and allergenic responses induced by latex fractions of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 115–122, 2007a.

RAMOS, M. V.; AGUIAR, V. C.; XAVIER, A. A. DA S.; LIMA, M. W.; BANDEIRA, G. P.; ETCHELLS, J. P.; NOGUEIRA, N. A. P.; ALENCAR, N. M. N. Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested upon in vitro enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material. **Fitoterapia**, v. 77, p. 251–256, 2006.

RAMOS, M. V.; ALENCAR, N. M. N.; OLIVEIRA, R. S. B.; FREITAS, L. B. N. ARAGÃO, K S.; ANDRADE, T. A. M.; FRADE, M. A. C.; BRITO, G. A. C.; & FIGUEIREDO, I. S. T. Wound healing modulation by a latex protein-containing polyvinyl alcohol biomembrane. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, p. 747–756, 2016.

RAMOS, M. V.; ARAÚJO, E. S.; OLIVEIRA, R. S. B.; et al. Latex fluids are endowed with insect repellent activity not specifically related to their proteins or volatile substances. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 23, p. 57–66, 2011.

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

RAMOS, M. V.; GRANGUEIRO, T. B.; FREIRE, E. A.; SALES, M. P.; SOUSA, D. P.; ARAÚJO, E. S.; FREITAS, C. D. T. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 4, p 57-67, 2010.

RAMOS, M. V.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S.; ROUGÉ, P. Structural similarities among Diocleae lectins. **Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry**, v. 11, p. 44 -49, 1996.

RAMOS, M. V.; PEREIRA, D. A.; SOUZA, D. P.; ARAÚJO, E. S.; FREITAS, C. D. T.; CAVALHEIRO, M. G.; MATOS, M. P. V.; CARVALHO, A. F. U. Potential of laticifer fluids for inhibiting *Aedes aegypti* larval development: evidence for the involvement of proteolytic activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 6, p. 805-812, 2009.

RAMOS, M. V.; VIANA, C. A.; SILVA, A. F. B.; FREITAS, C. D. T.; FIGUEIREDO, I. S. T.; OLIVEIRA, R. S. B.; ALENCAR, N. M. N.; LIMA-FILHO, J. V. M.; KUMAR, V. L. Proteins derived from latex of *C. procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, p. 455–463, 2012.

RASIK, A.M.; RAGHUBIR, R.; GUPTA, A.; SHUKLA, A.; DUBEY, M.P.; SRIVASTAVA, S.; JAIN, H.K.; KULSHRESTHA, D.K. Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 261-266, 1999.

ROSIDAH, Y. M. F.; SADIKUN, A.; AHMAD, M.; AKOWUAH, G. A.; ASMAWI, M. Z. Toxicology evaluation of standardized methanol extract of *Gynura procumbens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 244–249, 2009.

ROY, R.; KUMAR, S.; VERMA, A. K.; SHARMA, A.; CHAUDHARI, B. P.; TRIPATHI, A.; DAS, M.; DWIVEDI, P. D. Zinc oxide nanoparticles provide an adjuvant effect to ovalbumin via a T_H2 response in Balb/c mice. **International Immunology**, v.26, p. 159-172, 2013.

ROY, S.; SEHGAL, R.; PADHY, B.M.; KUMAR, V.L. Antioxidant and protective effect of latex of *Calotropis procera* against alloxan-induced diabetes in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 470-473, 2005.

RUTTEN, A. M.; STATIUS VAN EPS, L.W. Poisoning with toxic plants in Curacao in 1766. **Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde**, v. 142, p. 2796-2798, 1998.

SAAD, B.; AZAIZEH, H.; ABU-HIJLEH, G.; SAID, O. Safety of traditional Arab herbal medicine. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine** v.3, p. 433–439, 2006.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J.; WOOLF, C. J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 115, p. 1265-75, 1995.

SAKAI, T.; KOGISO, M.; MITSUYA, K.; KOMATSU, T.; YAMAMOTO, S. Defect of oral tolerance in NC/Nga mice. **The Journal of Medical Investigation**, v.33, p. 53-29, 2006.

SAMANTA, J.; BHATTACHARYA, S.; RANA, C. A. Antifertility activity of *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum leaf in female *Sprague-Dawley* rat. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 6, p. 669–674, 2016.

SANTOS, A.; VAN REE, R. Profilins: Mimickers of allergy or relevant allergens? **International Archives of Allergy and Immunology** v.155, p.191-204, 2011.

SCHIJNS, V. E. Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants. **Critical Reviews in Immunology**, v. 21, p. 75–85, 2001.

SHARMA, R.; THAKUR, G. S.; SANODIYA, B. S.; SAVITA, A.; PANDEY, M.; SHARMA, A. Therapeutic potential of *Calotropis procera*: a giant milkweed. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.4, p. 42-57, 2012.

SHREFFLER W.G.; WANICH, N. MOLONEY, M.; NOWAK-WEGRZYN, A.; SAMPSON, H. A. Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, p. 43–52, 2009.

SIMIONI, P. U.; FERNANDES L. G. R.; GABRIEL, D. L.; TAMASHIRO, W. M. S. C. Induction of Systemic Tolerance in Normal but not in Transgenic Mice Through Continuous Feeding of Ovalbumin. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 60, p. 257–266, 2004.

SINGH, H.; KUMAR, S.; DEWAN, S.; KUMAR, V. L. Inflammation induced by latex of *Calotropis procera* - a new model to evaluate anti-inflammatory drugs. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 43, p. 219-224, 2000.

SINGHAL, A.; KUMAR, V. L. Effect of aqueous suspension of dried latex of *Calotropis procera* on hepatorenal functions in rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 172–174, 2009.

SINHA, M.; SINGH, R. P.; KUSHWAHA, G. S.; IQBAL, N.; SINGH, A.; KAUSHIK, S.; KAUR, P.; SHARMA, S.; SINGH, T. P. Current Overview of Allergens of Plant Pathogenesis Related Protein Families. **The Scientific World Journal Volume**, ID 543195, p. 19, 2014.

SO, J. S.; LEE, C. G.; KWON, H. K.; YI, H. J.; CHAE, C. S.; PARK, J. A. Lactobacillus casei potentiates induction of oral tolerance in experimental arthritis. **Molecular Immunology**, v.1, p.172–80. 2008.

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

SOJKA, D. K.; HUANG, Y. H.; FOWELL, D. J. Mechanisms of regulatory T cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. **Immunology**, v. 1, p. 13-22, 2008.

SOUZA, D. P.; FREITAS, C. D. T.; PEREIRA, D. A.; NOGUEIRA, F. C.; SILVA, F. D. A.; SALAS, C. E.; RAMOS, M. V. Laticifer proteins play a defensive role against hemibiotrophic and necrotrophic phytopathogens. **Planta** v. 234, p.183–193, 2011.

STRAIT, R T.; MAHLER, A.; HOGAN, S.; KHODOUN, M.; SHIBUYA, A.; INKELMAN, F. D. Ingested allergens must be absorbed systemically to induce systemic anaphylaxis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.127, p. 982-989, 2011.

STRID, J.; THOMSON, M.; HOURIHANE, J.; KIMBER, I; STROBEL, S. A Novel model of sensitization and oral tolerance to peanut protein. **Immunology**, v. 113, p. 293–303, 2004.

TANG, M. L. K.; HSIAO, K. An update on oral immunotherapy for the treatment of food allergy. **Paediatrics and Child Health**, v. 26, p. 7, 2016.

TANG, M. L. K.; MARTINO, D. J. Oral immunotherapy and tolerance induction in childhood. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 24, p. 512–520, 2013.

TOBAGUS, I. T.; THOMAS, W. R.; HOLT, P. G. Adjuvant Costimulation during Secondary Antigen Challenge Directs Qualitative Aspects of Oral Tolerance Induction, Particularly during the Neonatal Period. **The Journal of Immunology**. v.4, p. 2274-85, 2004.

TRAESEL, G. K.; DE SOUZA, J. C.; DE BARROS, A. L.; SOUZA, M.A.; SCHMITZ, W. O.; MUZZI, R. M.; OESTERREICH, S. A. ARENA, A. C. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology**. v.74, p. 320-325, 2014.

TSUJI, N. M.; KOSAKA, A. Oral tolerance: intestinal homeostasis and antigen-specific regulatory T cells. **Food Research International**, v. 57, p. 130-141, 2014.

UPADHYAY, R. K. Plant latex: A natural source of pharmaceuticals and pesticides. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 5, p. 169-80, 2011.

VAN DIE, J. A comparative study of the particle fractions from *Apocynaceae latices*. **Annales Bogorienses**, v. 2, p. 1-124, 1955.

VAN WIJK F.; KNIPPELS, L. Initiating mechanisms of food allergy: Oral tolerance versus allergic sensitization. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, p. 8-20, 2007.

VIANA, C. A. **Caracterização Bioquímica da Atividade pró-coagulante de Proteases de Fluidos Laticíferos**. Dissertação submetida à coordenação do curso de pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, 2011.

VIANA, C. A.; OLIVEIRA, J. S.; FREITAS, C. D.; ALENCAR, N. M.; CARVALHO, C. P.; NISHI, B. C.; RAMOS, M. V. Thrombin and plasmin-like activities in the latices of *Cryptostegia grandiflora* and *Plumeria rubra*. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v. 4, p. 386-92, 2013.

VICKERY, B. P.; PONS, L.; KULIS, M.; STEELE, P.; JONES, S. M.; BURKS, A. W. Individualized IgE-based dosing of egg oral immunotherapy and the development of tolerance. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 105, p. 444–450, 2010.

WAIKAR, C. S.; SRIVASTAVA, B. V. K. *Calotropis* induced ocular toxicity. **Medical Journal Armed Forces India (MJAFI)**, v. 71, p. 92-94, 2015.

WALDHOER, M.; BARTLETT, S. E.; WHISTLER, J. L. Opioid receptors. **Annual Review of Biochemistry**, v.73, p.953–990, 2004.

WAMBRE, E.; JAMES, E. A.; KWOK, W. W. Characterization of CD4⁺ T cell subsets in allergy. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, p. 700–706, 2012.

WANG, X.; WANG, JUN.; LIANG, Y.; NI H.; SHI, LIANG.; XU, C.; ZHOU, Y.; SU, Y.; MOU, X.; CHEN D.; MAO, C. Schistosoma japonicum HSP60-derived peptide SJMHE1 suppresses delayed-type hypersensitivity in a murine model. **Parasites & Vectors**, v.9, p.147, 2016.

WATANABE, H.; TODA, M.; SEKIDO, H.; WELLNER, A.; FUJII, T.; HENLE, T.; HACHIMURA, S.; NAKAJIMA-ADACHI, H. Heat treatment of egg white controls allergic symptoms and induces oral tolerance to ovalbumin in a murine model of food allergy. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, p. 394–404, 2014.

WEINER, H. L.; DA CUNHA, A. P.; QUINTANA, F.; WU, H. Oral tolerance. **Immunological Reviews**, v. 241, p.241–259, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine**, Switzerland. 2000.

YAMASHITA, H.; TAKAHASHI, K.; TANAKA, H.; NAGAI, H.; INAGAKI, N. Overcoming food allergy through acquired tolerance conferred by transfer of Tregs in a murine model. **Allergy**, v. 67, p. 201–209, 2012.

YANG, H.; LEE, J.; SEO, J. H.; OH, K. H.; CHO, Y. H.; YOO, Y. C. Induction of Oral Tolerance by Gamma-Irradiated Ovalbumin Administration. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 36, p. 14-18, 2016.

YUNGINGER, J.; ADKINSON, Jr. N. F. B. B.; BUSSE, W. W.; HOLGATE, S. T.; LEMANSKE, Jr. R. F.; SIMONS, F. E. R. **Natural rubber latex allergy**. 7^o edição, Editora: Philadelphia, 2009.

ANEXO A – Parâmetros de *screening* hipocrático utilizados nos ensaios toxicológicos (BRITO, 1994).

Parâmetro	Sinais de toxicidade	Escores
Atividade geral	Avaliação da atividade geral do animal na gaiola após estímulo. Dentre os sinais estão locomover, levantar, farejar, ficar parado, etc.	0 – não se move 1 – dá um passo 2 - meia-volta na gaiola 3 - duas voltas na caixa ou movimentos de alerta (padrão) 4 - anda com agilidade
Sistema sensorial		
Frêmito vocal	Emissão de som vindo da região torácico-abdominal sem estímulo ou toque.	0 – ausente 1- presente
Irritabilidade	Resposta do animal após toque e sopro na face.	0 – ausente 1 - presente
Reflexo auricular	Posição da orelha após vários estalos consecutivos; quanto mais próxima da cabeça menor será o reflexo.	0 – ausente, orelha colada à cabeça 1 – orelha ligeiramente colada na cabeça 2 – orelha em pé pela metade 3 - orelha em posição usual (padrão) 4 - orelha totalmente em pé
Reflexo corneal	Reflexo dos olhos após a aproximação lenta de uma pinça, mas sem o toque.	0 – olhos ficam abertos 1 – quase não se movem 2 – movem-se pouco e lentamente 3 - fecham pela metade

		quando a pinça se aproxima
		4 - fecham totalmente quando a pinça se aproxima (padrão)
Aperto de cauda	Resposta ao aperto intenso da extremidade da cauda com uma pinça.	0 – não se move 1 – move-se lentamente 2 – move-se rápido 3 - move-se e pula (padrão) 4- move-se, pula e corre
Resposta ao toque	Resposta ao toque prolongado (mais de 15 segundos) com uma pinça.	0 – não se move 1 – pouco movimento 2 – dá um passo 3- anda com dificuldade 4- anda com agilidade (padrão)

Parâmetro	Sinais de toxicidade	Escores
Sistema psicomotor		
Contorção	Movimento vermiforme do corpo	0 – ausente (padrão) 1- presente
Trem posterior	Verificar se a postura das patas traseiras (trem posterior) está caída ou arrastando	0 – ausente (padrão) 1- queda do trem posterior pouco visível 2 - queda do trem posterior visível; animal anda com lentidão 3 - queda do trem posterior visível; animal anda com dificuldade 4 - queda do trem posterior visível; animal anda com dificuldade e arrasta o trem posterior
Reflexo de endireitamento	Resposta do animal para voltar à posição normal quando é colocado com o dorso sobre uma superfície (máximo 15 s)	0 – não se move 1 - volta lentamente e com dificuldade 2 - volta lentamente 3 – volta rápido 4 - volta imediatamente e com agilidade (padrão)
Tônus corporal	Verificar se o corpo está normal (presente) ou não.	0 – ausente 1 – presente (padrão)
Força para agarrar	Intensidade com que o animal se agarra a uma grade quando esta tem sua posição levemente modificada.	0 – não se agarra 1 – se agarra, mas em seguida larga a grade 2 – segura por um tempo, mas cai 3 - segura firmemente, mas não suporta e cai

		4 - segura firmemente e não cai (padrão)
Ataxia	Movimentos desordenados devido a oscilações entre estados de consciência e inconsciência.	0 - ausente (padrão) 1 - presente

Parâmetro	Sinais de toxicidade	Escore
Sistema nervoso central		
Tremores	Observar presença ou não.	0 – ausente (padrão) 1 - presente
Convulsões	Observar presença ou não.	0 – ausente (padrão) 1 - presente
Straube tail (cauda ereta)	Verificar se a cauda está ereta ou normal.	0 – normal (padrão) 1 - ereta
Hipnose	Animal quieto e sem movimento, mas se tocado abre os olhos e responde ao estímulo.	0 – ausente (padrão) 1 - presente
Anestesia	Ausência de resposta ao estímulo doloroso com perda do reflexo de endireitamento.	0 – ausente (padrão) 1 - presente
Sistema nervoso autônomo		
Ptose	Pálpebras fechadas ou semifechadas mesmo após estímulo.	0 – ausente (padrão) 1 – ligeiramente fechado 2 - semifechado 3 - quase totalmente fechado 4 - fechado
Lacrimação	Presença ou ausência.	0 – ausente (padrão) 1 - presente
Micção	Número de micções.	Número de poços de urina.
Defecação	Número de bolos fecais.	Número de pellets de excreta.
Piloereção	Ereção dos pelos corpóreos.	0 – ausente (padrão) 1 – ereção leve 2 - grau ligeiramente maior que o anterior 3 - visível, mas não

		totalmente ereto
		4 - totalmente ereto
Hipotermia	Temperatura do corpo do animal abaixo do normal (avaliar sobretudo as extremidades).	0– ausente (padrão) 1– ligeiramente frio 2 - frio 3 - gelado 4 - gelado e com cianose
Respiração	Normal, hiper ou hipoventilação	0 – normal (padrão) 1– ligeiramente acelerado 2 - mais acelerado 3 - muito acelerado 4 - ofegante