UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

MÚLTIPLAS PROTEÍNAS ESTÃO ENVOLVIDAS NAS ATIVIDADES ANTIINFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO LÁTEX DA PLANTA MEDICINAL *Calotropis procera* (AIT.) R. Br

JEFFERSON SOARES DE OLIVEIRA

FORTALEZA-CE

2009

Esta dissertação foi apresentada ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontrar-se-á disposição na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feito de acordo com as normas da ética científica.

Jefferson Soares de Oliveira

Dissertação aprovada em: 17 / fevereiro / 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.
Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientador

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Deptº de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal do Ceará
Examinadora

Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo
Deptº de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal do Ceará
Examinadora

Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy
Instituto Superior de Ciências Biomédicas
Universidade Estadual do Ceará
Examinadora

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

MÚLTIPLAS PROTEÍNAS ESTÃO ENVOLVIDAS NAS ATIVIDADES ANTIINFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO LÁTEX DA PLANTA MEDICINAL *Calotropis procera* (AIT.) R. Br

JEFFERSON SOARES DE OLIVEIRA

Dissertação Submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

FORTALEZA-CE

2009

O45m Oliveira, Jefferson Soares de

Múltiplas proteínas estão envolvidas nas atividades antiinflamatória e antinociceptiva do látex da planta medicinal *Calotropis procera* (Ait.) R.Br / Jefferson Soares de Oliveira, 2009.

117 f. ; il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

Área de concentração: Bioquímica vegetal

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, 2009.

1. Proteínas laticíferas 2. Inflamação 3. Microscopia intravital I. Ramos, Márcio Viana (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Pós-graduação em Bioquímica III. Título

CDD 574.192

"...Contudo, socorre-nos aquela infantil história daquele passarinho – cujo comportamento imitamos –, que em incansáveis viagens apanhava água no lago e despejava-a no incêndio na floresta; perguntado se pretendia apagar o fogo, respondeu que estava fazendo apenas sua parte..."

Genética e Espiritismo

Euripeides Kühl

Dedico...

Aos meus Pais e Familiares:

Pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A ***Deus***, por sua infinita justiça e sabedoria;

Ao meu ***Orientador, Professor Dr. Márcio Viana Ramos***. Pelo exemplo de competência e pela sensatez que possui. Pelos conselhos e incentivos incessantes sempre tornando evidente a importância da dedicação aos estudos. Por confiar aos meus cuidados a execução deste projeto. Por me dar autonomia de trabalho permitindo assim o meu crescimento profissional e intelectual como futuro pesquisador. Pelos diálogos, pela amizade e pelos momentos em que se mostrou muito mais que um orientador durante estes 6 anos de convivência;

À ***Professora Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar*** por ter cedido o seu tempo e o espaço do laboratório, pela paciência e orientação no desenvolvimento de vários experimentos. Agradeço também pela realização dos ensaios de microscopia intravital e dosagem de óxido nítrico, e por, gentilmente, ter aceitado o convite para participar da banca examinadora deste trabalho de Mestrado;

À ***Professora Dra. Letícia Veras Costa Lotufo*** pela atenção que sempre demonstrou; por disponibilizar seu laboratório para execução de vários experimentos e por gentilmente aceitar participar da banca examinadora deste trabalho de Mestrado;

À ***Professora Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy*** por gentilmente aceitar participar da banca examinadora deste trabalho de Mestrado;

Ao Biotério Central da UFC pelo fornecimento dos ratos e camundongos utilizados nos experimentos;

Ao ***Neto***, técnico responsável pela limpeza e manutenção do biotério do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC), cuja ajuda foi indispensável para o crescimento e manutenção dos animais;

Aos ***Estudantes do Laboratório de Farmacologia e Bioquímica*** do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial à ***Jozi***, ao ***Flávio*** e à ***Ingrid***, pela ajuda incessante, pela paciência e auxílio no desenvolvimento e execução dos experimentos;

Ao ***Diego, Fabiano, Raquel, Mayara, Cleverson, Danielle, Eliane, Mariana,*** amigos do laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais do DBBM.

Pelos “bons” e “maus” momentos compartilhados, pela ajuda constante, apoio e companhia diária e por fazerem parte do meu crescimento pessoal e profissional;

Aos ***Professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular*** – UFC, pela importante participação que tiveram na minha formação;

Aos ***amigos do curso de Mestrado em Bioquímica***, em especial ao ***Elton*** e a ***Alexcyane***, amigos desde os tempos de graduação e futuros colegas de Doutorado, com os quais tive a felicidade de compartilhar a aprovação na seleção do Doutorado.

Aos ***amigos distribuídos nos diversos laboratórios (Thiago, Clark, Alysson, Daniel, Delano, Emerson, Ítalo)*** do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia pelos auxílios, gentilezas e paciência.

À minha namorada ***Irlaine*** pela paciência que demonstra frente aos meus momentos de ansiedade, pelas constantes palavras de apoio, por acreditar verdadeiramente em mim, por me permitir amá-la e por me fazer sentir amado.

E em especial à ***minha família*** pelo apoio incondicional. À minha Irmã ***Janyce*** pela atenção, pelo seu modo de demonstração de carinho. Ao Meu Irmão ***Jennyson***, meu melhor amigo, pelo apoio moral, pelos conselhos e incentivos edificantes e constantes. Ao meu Pai ***Jaime*** pelo esforço, pelo ser um exemplo de determinação, força de vontade e dedicação à família. À minha Mãe ***Emília*** pelo carinho, cumplicidade, pelo respeito, por ter sempre sido uma mãe dedicada e pela eterna demonstração de amor.

FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado com o suporte das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará:

- Através do Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
- Através do Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); IFS (International Foundation Society - N. 3070-2 M.V.R); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Ceará (FUNCAP); RENORBIO (Rede Nordeste de Biotecnologia) pelos financiamentos aos Projetos do Laboratório.

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) através da concessão de bolsa de Mestrado.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xiv
Abreviaturas e Definições	xv
Resumo	xvi
Abstract	xvii
I Introdução	1
Látex e laticíferos	1
Plantas laticíferas	1
Composição química do látex	2
Características e aspectos gerais da planta *Calotropis procera*	4
Potencial farmacológico da planta *Calotropis procera*	6
Histórico das atividades antiinflamatória, pró-inflamatória e antinociceptiva da planta *Calotropis procera*	9
Outras atividades biológicas relevantes referentes a planta *Calotropis procera*	11
Propriedades farmacológicas relacionadas a outras plantas produtoras de látex	12
Inflamação	13
Evento inflamatório	13
A resposta inflamatória é mediada por células	14
Mediadores químicos da resposta inflamatória	17
II Justificativa	18
III Objetivos	20

IV Materiais e Métodos..... 22
Reagentes e fármacos..... 22
Espécie vegetal..... 22
Coleta e fracionamento do látex..... 23
Cromatografia de dessalinização em coluna de PD-10..... 24
Tratamento proteolítico das frações PL e FD por pronase..... 26
Precipitação de PL com acetona..... 26
Fracionamento de proteínas do látex por cromatografia de troca iônica..... 27
Eletroforeses em presença de SDS..... 27
Eletroforese bidimensional..... 28
Inibição e ensaio de atividade de proteases cisteínicas de proteínas do látex de *C. procera*..... 30
Produção de anticorpos policlonais contra fração PL em coelho..... 30
Detecção imunológica de proteínas pertencentes à fração PL nas frações FD e B..... 31
Extração e caracterização dos extratos etanólicos de PL e FD..... 32
Ensaios Biológicos..... 33
Animais..... 33
Avaliação das atividades pró-inflamatória e antiinflamatória de frações do látex de *Calotropis procera*..... 33
Avaliação da atividade pró-inflamatória..... 34
Curva dose-resposta e curso-temporal da migração de leucócitos para cavidade peritoneal de ratos induzida por FD..... 35

Efeito de bloqueadores farmacológicos na migração de neutrófilos induzida por FD..... 36
Avaliação da atividade antiinflamatória..... 36
Inibição do estímulo pró-inflamatório induzido pela fração FD por PL e sub-frações cromatográficas..... 37
Determinação da ação de proteínas do látex de *C. procera* no rolamento e adesão de leucócitos através de ensaio de microscopia intravital..... 38
Dosagem de óxido nítrico no soro de animais tratados com proteínas do látex de *C. procera*..... 39
Avaliação da atividade antiinflamatória de frações do látex de *C. procera* administradas por via oral..... 40
Avaliação da toxicidade das proteínas do látex de *Calotropis procera* para ratos por via oral..... 41
Atividade antinociceptiva..... 41
Modelo de contorções abdominais induzida por ácido acético..... 41
Análise estatística..... 42
V Resultados..... 43
VI Discussão..... 75
VII Conclusões..... 89
VIII Referências..... 91

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
FIGURA 1	Aspectos gerais da planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.....	5
FIGURA 2	Modelo de migração celular.....	15
FIGURA 3	Esquema de obtenção da Fração Dialisável (FD), a fração proteínas do látex (PL) e Borracha (B) do látex de *Calotropis procera*.....	25
FIGURA 4	Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações do látex de *Calotropis procera*.....	44
FIGURA 5	Avaliação da atividade pró-inflamatória das frações do látex de *Calotropis procera*.....	45
FIGURA 6	Efeito pró-inflamatório do pico recuperado (PI) após etapa de dessalinização de FD em coluna de PD-10 em sua forma nativa ou submetido a tratamento térmico.....	47
FIGURA 7	Avaliação da atividade pró-inflamatória da fração FD submetido à tratamento enzimático por pronase.....	48
FIGURA 8	Curva curso-temporal (A) e dose-resposta (B) da atividade pró-inflamatória induzida pela fração FD em ratos.....	49
FIGURA 9	Efeito de bloqueadores farmacológicos na migração de neutrófilos induzida por FD.....	51
FIGURA 10	Avaliação da atividade antiinflamatória das frações do látex de *Calotropis procera*.....	52
FIGURA 11	Efeito antiinflamatório da fração PL do látex de *Calotropis procera* submetida a tratamento térmico enzimático com pronase.....	53
FIGURA 12	Atividade antiinflamatória e proteolítica do tipo cisteína da fração PL do látex de *Calotropis procera* submetida à precipitação com acetona.....	55
FIGURA 13	Avaliação da capacidade da fração PL inibir a resposta inflamatória induzida pela administração de FD na cavidade peritoneal de ratos.....	56

FIGURA 14 Detecção imunológica de proteínas da fração PL nas frações FD e B do látex de *C. procera* utilizando soro Anti-PL produzidos em coelho..... 57
FIGURA 15 Fracionamento e eletroforese de proteínas do lates de *C. procera*..... 59
FIGURA 16 Eletroforese bidimensional de proteínas do látex de *C. procera*..... 60
FIGURA 17 Avaliação da atividade antiinflamatória das frações cromatográficas obtidas após aplicação da fração PL em coluna de CM-Sepharose Fast Flow..... 62
FIGURA 18 Microscopia intravital revela que proteínas látex de *C. procera* inibem o rolamento de leucócitos induzido por carragenina..... 63
FIGURA 19 Microscopia intravital revela que proteínas látex de *C. procera* inibem a adesão de leucócitos induzido por carragenina..... 64
FIGURA 20 Efeito de proteínas do látex de *C. procera* na concentração de óxido nítrico (NO_3/NO_2) no soro de camundongos..... 65
FIGURA 21 Avaliação da atividade antiinflamatória de sub-frações cromatográficas da fração PL contra resposta pró-inflamatória induzida pela administração de FD na cavidade peritoneal de ratos..... 67
FIGURA 22 Estudo do envolvimento de proteases do tipo cisteínica na atividade antiinflamatória promovida pelo látex de *Calotropis procera*..... 68
FIGURA 23 Avaliação da atividade antiinflamatória da fração PL do látex de *C. procera* quando administrada por via oral em ratos..... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
TABELA 1	Efeito antinociceptivo de sub-frações cromatográficas de PL (PI, PII e PIII) sobre contorções abdominais induzida por ácido acético em camundongos.....	69
TABELA 2	Resumo dos resultados obtidos no presente trabalho.....	72
TABELA 3	Resumo dos relatos da atividade antiinflamatória presente no látex da planta *Calotropis procera*.....	87

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

ANOVA	Análise de Variância
B	Fração Borracha
Cel	Celecoxib
Cg	Carragenina
Dex	Dexametasona
E.P.M.	Erro padrão da média
FD	Fração Dialisável
Ind	Indometacina
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
kDa	Kilodalton
Da	Dalton
Mec	Meclizina
PL	Proteínas do Látex
Tal	Talidomida
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UI	Unidades internacionais
cav.	Cavidade
COX-2	Cicloxigenase 2
NO	Óxido Nítrico
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral

RESUMO

Título: Múltiplas proteínas estão envolvidas nas atividades antiinflamatória e antinociceptiva presentes no látex da planta medicinal *Calotropis procera* **(Ait.) R. Br**

A planta *Calotropis procera*, pertencente à família Apocinaceae, tem como uma de suas principais características a produção constitutiva de látex. Este fluido é amplamente utilizado na medicina popular, principalmente da Índia, por apresentar diversas propriedades curativas. Na literatura, o produto da extração do látex íntegro com solvente aquoso e/ou orgânico desta planta é citado por apresentar atividade antinociceptiva e antiinflamatória. Por outro lado, a mesma preparação do látex também é relatada por induzir processos inflamatórios. O presente trabalho teve como objetivo fracionar o látex da planta *Calotropis procera* para separar as atividades pró- e antiinflamatória; caracterizar estes mecanismos e avançar na identificação das moléculas envolvidas na atividade antiinflamatória e antinociceptiva. O látex coletado em água destilada (1:1; v/v) foi submetido às etapas de centrifugação e diálise e três frações foram obtidas (FD, PL e B) e inicialmente avaliadas quanto à presença de atividade pró- e antiinflamatória, utilizando o modelo de peritonite em ratos. A fração FD, rica em compostos de massa molecular inferior a 8.000 Da, não se mostrou antiinflamatória quando administrada por via endovenosa nos animais. Por outro lado, uma forte atividade pró-inflamatória foi observada quando esta foi injetada na cavidade peritoneal de ratos. A resposta inflamatória induzida por FD foi dependente de tempo e dose e parece estar relacionada com a presença de peptídeos detectados na fração, já que esta atividade foi diminuída quando a fração foi tratada com pronase durante 24 horas antes de sua administração nos ratos. A inflamação induzida por FD foi inibida por Dexametasona, Talidomida e Meclizina sugerindo um processo inflamatório induzido por vias de liberação de histamina e TNF-α. A fração PL, rica em proteínas, e a fração borracha (B) não foram pró-inflamatórias e apresentaram forte atividade antiinflamatória por via endovenosa. A atividade promovida por B parece estar relacionada à presença de proteínas pertencentes à fração PL, como observado em ensaio de detecção imunológica. PL inibiu o processo inflamatório induzido por FD. A atividade antiinflamatória promovida pela fração PL parece ser um evento promovido pela ação de proteínas, visto que a atividade antiinflamatória da fração foi perdida após aquecimento ou tratamento com pronase, e permaneceu ativa após precipitação com acetona. Três novas sub-frações (PI, PII e PIII) foram obtidas após aplicação da fração PL em coluna de troca iônica (CM-Sepharose Fast Flow) em pH 5,0. As sub-frações, distintas entre si, como observado através de eletroforese em gel de poliacrilamida, foram igualmente capazes de reverter a inflamação induzida por carragenina no modelo de peritonite em ratos, bem como reduzir as contorções abdominais induzidas por ácido acético, evidenciando o envolvimento de múltiplas proteínas na resposta antiinflamatória e antinociceptiva produzida pela fração PL. Ensaio de microscopia intravital revelou que PI, PII e PIII inibem o rolamento e a adesão leucocitária no mesentério de camundongos. Somente PI induziu intensa produção de óxido nítrico em ratos além de ter sido a única sub-fração capaz de reverter a resposta pró-inflamatória promovida pela fração FD, evidenciando diferentes mecanismos antiinflamatórios promovidos por diferentes proteínas do látex. A atividade antiinflamatória não foi observada quando a fração PL foi administrada por via oral nos animais. Este é o primeiro trabalho que confirma a presença de duas atividades antagonistas no látex de *C. procera* e que estas são promovidas por moléculas distintas passíveis de serem separadas com base em seu tamanho molecular. O conjunto de resultados aqui apresentados mostra que a atividade antiinflamatória e antinociceptiva do látex foram promovidas por moléculas protéicas.

Palavras chave: inflamação, látex, proteínas laticíferas

ABSTRACT

Title: Multiple proteins are involved in the anti-inflammatory and antinociceptive activities displayed by the latex of the medicinal plant *Calotropis procera* (Ait.) R. Br..

Latex is a general term used to describe fluid exudates from plants after mechanical injury. Latex from *Calotropis procera* is well known for its medicinal properties mainly in Indian traditional medicine. Moreover, it has been experimentally shown that it exhibits interesting biological activities such as anti-inflammation. However its latex has been reported to induce proinflammatory responses. In the present work, (1) the latex was fractionated to segregate pro- and anti-inflammatory activities; (2) assays were carried out to characterize the mechanism of action of active fractions and (3) attempts were done to identify molecules involved in anti-inflammatory and antinociceptive activities. First, the latex was collected in distilled water (1:1; v/v) and submitted to centrifugation and dialysis steps to obtain three different fractions (FD, PL and B). These fractions were evaluated to pro- and anti-inflammatory activities using peritonitis model in rats. FD, constituted by compounds with molecular mass lower than 8,000 Da, did not exhibited anti-inflammatory activity, however induced intense neutrophil migration into peritoneal cavity of rats. The inflammation induced by FD was time and dose dependent. Moreover, it was seen that previous injection of Dexamethasone, Thalidomide and Meclizine in animals inhibited FD inflammatory responses suggesting that inflammation triggered by this fraction occurs through histamine and TNF-α release. Peptides, present in FD as shown in electrophoresis, should be involved in inflammation responses displayed by FD since such activity was diminished after 24 hour pronase treatment. Fractions PL, and B did not induce inflammatory response when injected into peritoneal cavity of animals, however intravenous injection displayed strong anti-inflammatory activity against inflammation induced by carrageenan. The anti-inflammatory activity promoted by B seems to be related to PL proteins present in B. PL fraction inhibited neutrophil migration trigged by FD. PL anti-inflammatory activity ought to be related to proteins since such activity was completely abolished after heat or pronase treatment and it still remained after acetone precipitation. Three protein sub-fractions (PI, PII and PIII) were recovered after PL chromatography on ion-exchange column (CM-Sepharose Fast flow) at pH 5.0. In spite of the fact that PI, PII e PIII were seen to be different by electrophoresis they were equally able to inhibit neutrophil migration induced by carrageenan in rats as well as abdominal writhes stimulated by acetic acid in mice. Intravital microscopy assay revealed that, PI, PII and PIII inhibit both leucocyte rolling and adhesion in mice mesenteric tissues. In addition, PI was able to induce nitric oxid production and inflammation induced by FD. These results show that multiples proteins in PL display anti-inflammatory activity and they act at different pathway of inflammation. Several experiments were performed aiming to detect the anti-inflammatory activity of PL when it was administered by oral route however, we did not obtain success. This is the first report which confirms the presence of pro- and anti-inflammatory activities and it shows that such activities are displayed by compounds suitable to be fractionated on the basis of their molecular size. In addition, these results show that anti-inflammatory and antinociceptive activities are displayed by proteins present in the latex.

Key words: inflammation, latex, laticifer proteins

I - INTRODUÇÃO

Látex e laticíferos

O termo látex é freqüentemente utilizado para descrever uma secreção de aspecto leitoso liberada pelas plantas quando estas sofrem algum tipo de injúria mecânica (KEKWICK, 2001). É um fluido que pode apresentar aspecto esbranquiçado, amarelado, laranja, incolor ou ainda marrom (PICKARD, 2007). A produção de látex ocorre em mais de 12.000 espécies de plantas distribuídas entre mais de 900 gêneros, compreendendo aproximadamente 20 famílias, principalmente do grupo das dicotiledôneas (YEANG *et al*., 2002). O látex é exsudado das plantas a partir de estruturas denominadas laticíferos, que são células ou fileira de células especializadas. Os laticíferos podem ser classificados em articulados, quando formadas por fileiras de células bem definidas (como encontradas na *Hevea brasiliensis*), ou não articulados, quando uma única célula alongada se desenvolve através do crescimento intrusivo de modo semelhante a hifas de fungos (como encontradas em *Asclepias* spp. e *Cannabis* spp.) (KEKWICK, 2001; PICKARD, 2007).

Plantas laticíferas

Dentre a diversidade de plantas existentes produtoras de látex, a *Hevea brasiliensis* é a mais conhecida. Quando uma referência é feita à palavra látex, a seringueira, árvore nativa da Amazônia é imediatamente lembrada. A

borracha produzida pela planta é amplamente utilizada pela indústria na produção de vários utensílios tais como luvas, brinquedos, bico de mamadeira, chupeta, balões de festa, preservativos e etc. (SUSSMAN *et al.*, 2002). Como o látex de *H. brasiliensis* é intensamente explorado, a maior parte dos estudos bioquímicos já desenvolvidos com plantas produtoras de látex refere-se ao látex desta planta. Entretanto, milhares de espécies de plantas produzem constitutivamente algum tipo de látex. Entre as mais comuns e conhecidas estão espécies de Euphorbiaceae, Asclepiadaceae e Apocynaceae.

Composição química do látex

Além dos componentes celulares, fluidos laticíferos são constituídos por proteínas enzimáticas e não enzimáticas, terpenos, carbonatos, alcalóides, vitaminas, carboidratos, lipídios e aminoácidos (MORCELLE *et al.*, 2004).

Uma grande variedade de proteínas é encontrada em fluidos laticíferos, especialmente do látex de *Hevea brasiliensis*. Análise por eletroforese bidimensional do látex desta planta revelou a presença de mais de duzentos polipeptídeos, além de uma diversidade de atividades enzimáticas descritas (POSCH *et al.*, 1997; KEKWICK, 2001). Dentre as proteínas já identificadas temos beta-1,3-glucanases (CHEYE & CHEUNG, 1995), lisozimas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), glicosidases (GIORDANI & LAFON, 1993), lectinas, quitinases (JEKEL *et al.*, 1991), amilases (LYNN & CLEVETTE-RADFORD, 1987a), inibidores de proteinases (ARCHER, 1983; SRITANYARAT *et al.*, 2006) dentre outros.

Relata-se a ocorrência de inúmeras proteinases no látex de diversas espécies do gênero *Euphorbia*. Estas proteinases são classificadas como sendo do tipo serínicas (LYNN & CLEVETTE-RADFORD, 1987b). No látex de *Hevea brasiliensis*, relata-se também a ocorrência de proteases pertencentes a mesma classe (LYNN & CLEVETTE-RADFORD, 1986b) e o mesmo é constatado no látex de *Elaeophorbia drupifera* (LYNN & CLEVETTE-RADFORD, 1985). O látex de *Carica papaya*, também amplamente estudado, possui proteinases do tipo cisteínica, como a papaína (MCKEE & SMITH, 1986; JACQUET *et al*., 1989).

Várias moléculas também já foram identificadas no látex de *C. procera*. Análises químicas dos extratos brutos do látex de *C. procera* têm sido identificados compostos tais como cardenolideos ativos, enzimas proteolíticas, alcalóides e carboidratos (SEIBER *et al*., 1982), esteróides, triterpenos e carbonatos orgânicos (GALLEGOS-OLEA *et al*., 2002). Além disso, proteinases do tipo cisteínica, quitinases bem como enzimas relacionadas ao estresse oxidativo vegetal foram detectadas (FREITAS *et al*., 2007).

A diversidade molecular encontrada nos diferentes fluidos laticíferos estudados sugere que este tecido especializado deve estar ativamente envolvido em eventos biológicos distintos no vegetal que vão desde o acúmulo de carbonos nos polímeros de isopreno (borracha) até em aspectos defensivos traduzidos pela ocorrência de diversas proteínas caracterizadas como proteínas relacionadas à patogênese vegetal (KEKWICK, 2001). Esta diversidade de moléculas ainda pode estar estreitamente relacionada com eventos toxicológicos e até letais observados para mamíferos (EL-BADWI *et al.,* 1998).

Algumas proteínas presentes no látex da *H. brasiliensis* também são relatadas por estarem relacionadas a processos alérgicos em pessoas que são submetidas a contínuo contato com utensílios produzidos com o látex da planta, como por exemplo, luvas e preservativos (POSCH *et al*., 1997; SUSSMAN *et al*., 2002; KIMATA, 2005).

Características e aspectos gerais da planta *Calotropis procera*

A *Calotropis procera* pertence à família das Apocináceas onde estão inseridas mais de 2.000 espécies em aproximados 280 gêneros. Originária da Ásia e África encontra-se distribuída na região tropical do planeta. É uma planta perene, arbustiva ou arbórea, podendo chegar a atingir entre 3 e 4 metros de altura, mas geralmente ficando baixa em solo de pouca fertilidade. Apresenta como característica peculiar uma intensa produção de látex branco que flui abundantemente quando se rompem os tecidos, principalmente nas partes verdes da planta. Possui sistema radicular bem desenvolvido, folhas com limbos carnosos de formato ovalado e recobertas por cerosidade. As flores são hermafroditas e os frutos são folículos inflados ou globosos onde se encontram as sementes que estão ligadas a filamentos sedosos que facilitam sua dispersão (FERREIRA & GOMES, 1974; KISSMANN & GROTH, 1997) (FIGURA 1). No estado do Ceará esta planta é conhecida popularmente pelos nomes de Hortência, Ciúme ou Flor-de-seda.

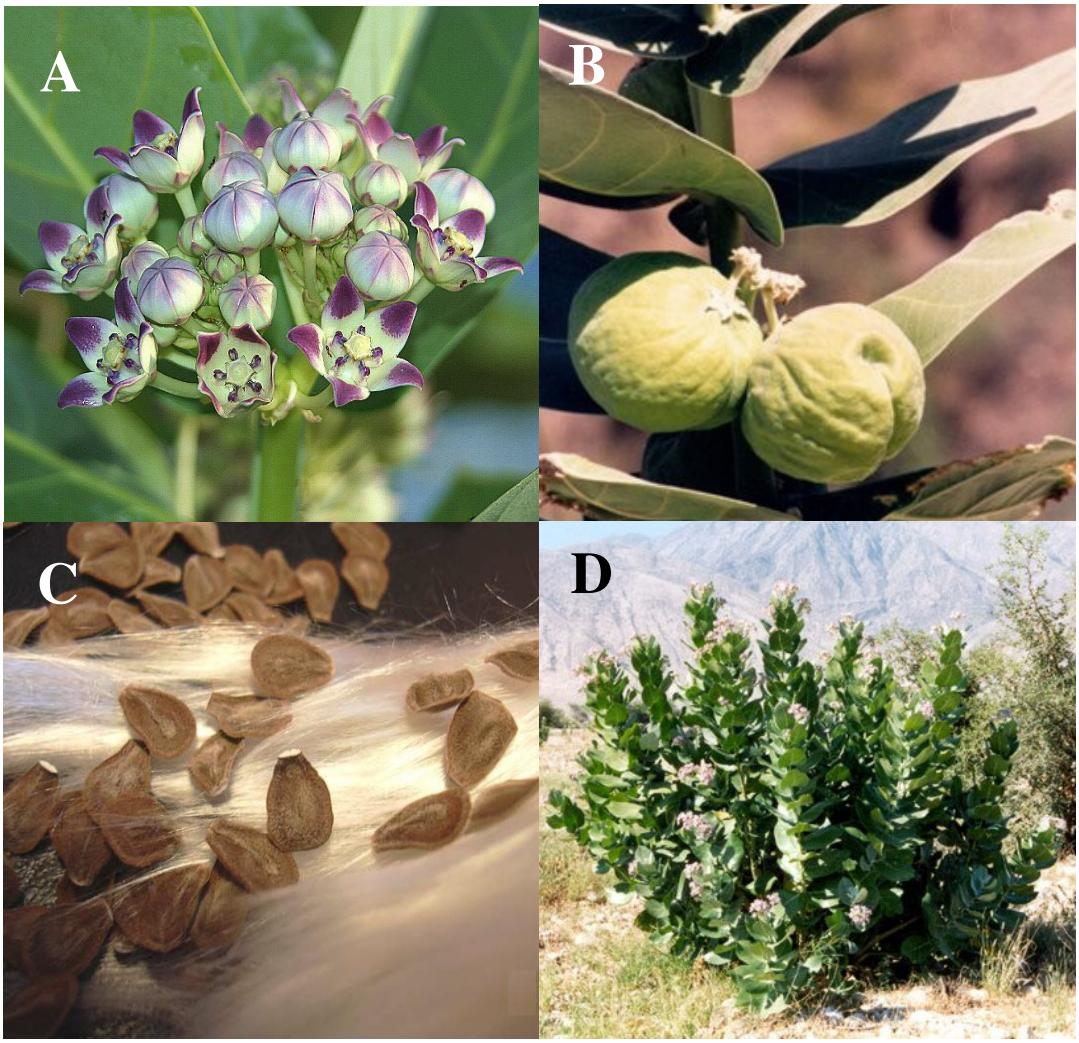

FIGURA 1 - Aspectos gerais da planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. A: Inflorescência (Fonte: www.kingsnake.com/westindian/ecosystemsgeographyorigins1); **B**: Fruto globoso e recoberto por cerosidade (Fonte: www.aiys.org/webdate/gtzrep.html); **C**: Sementes ligadas a fios de seda (Fonte: toptropicals.com/html/toptropicals/catalog/photo_db/C.html); **D**: Planta jovem de *C. procera* (Fonte: www.uochb.cas.cz/~natur/cerambyx/calotropis.html).

Potencial farmacológico da planta *Calotropis procera*

A *C. procera* é uma planta bem conhecida e bastante utilizada pela medicina popular, principalmente na Índia, por apresentar diversas propriedades curativas (KIRTIKAR & BASU, 1935; WARRIER *et al.*, 1994). Raízes, caules, flores, folhas bem como o látex foram relatadas por apresentarem propriedades biológicas relevantes (KIRTIKAR & BASU, 1935). Na Índia, extratos alcoólicos de folhas de *C. procera* foram eficientes no tratamento de febres intermitentes (KAPOOR & KAPOOR, 1980). Seus botões florais ingeridos juntamente com pimenta preta e sal são mencionados possuírem atividade antipirética (ANIS & IQBAL, 1986), enquanto que folhas e raízes moídas consumidas na forma de tabletes, como açúcar mascavo, são utilizados para aliviar os efeitos dos sintomas de febre amarela (SINGH & ALI, 1994). Além disso, o consumo de folhas secas na forma de cigarros tem sido reportado por reverter os efeitos desagradáveis de enxaqueca em humanos (PRASAD, 1985). Estudos preliminares mostram que extratos das flores de *C. procera* são capazes de aliviar crises asmáticas (UPADHYAY, 1979). O estudo da fração clorofórmica do extrato de raízes da planta mostrou significante atividade anti-úlcera contra ulcerações induzidas por diferentes drogas (SEN *et al.*, 1998). Este resultado foi acompanhado da diminuição do volume de secreção gástrica dos animais. Outros trabalhos também relatam a presença de atividade espermicida, antiimplantação do óvulo e abortiva em ratas fêmeas (PRAKASH *et al.*, 1978; GUPTA *et al.*, 1990; QURESHI *et al.*, 1991). Todos estes estudos foram conduzidos a partir de preparações (extratos) de partes da planta, sendo a maioria preparada em solventes de origem orgânica.

Dentre a diversidade de atividades biológicas na planta de *C. procera*, grande parte destas está relacionado ao seu látex. No que diz respeito ao uso da planta como fonte medicinal, no Estado do Ceará, o látex é comumente utilizado pela população de baixa renda e mencionado por apresentar potencial curativo contra doenças fúngicas e bacterianas de pele. Além do uso como fonte curativa, o látex é também utilizado como cola e por apresentar ação depilatória.

Estudos mostram que o produto da extração do látex de *C. procera* com solvente orgânico possui atividade antibacteriana (SHUKLA & KRISHNAMURTI, 1961; LARHSINI *et al*., 1999), antifúngica (LARHSINI *et al*., 1997), moluscicida (HUSSEIN *et al*., 1994) e esquistossomicida (SHARMA & SHARMA, 1999; SHARMA & SHARMA, 2000). Um estudo preliminar revelou ação antifúngica do látex extraído com solvente aquoso ou orgânico contra *Candida albicans* (SEHGAL *et al*., 2005). Efeito antipirético também foi observado em produto da extração do látex de *C. procera* com água (LARHSINI *et al*., 2002). Uma única dose dada por via oral do látex reduziu em mais de 70 % a diarréia em ratos induzida pela ingestão de óleo de mamona (KUMAR *et al*., 2001). Além da ação anti-diarréica, o látex reduziu o trânsito intestinal em mais de 30%. Também foi observado que a aplicação tópica diária do látex reduziu em 20% a área das feridas induzidas no dorso de animais, revelando que o látex de *C. procera* é detentor de ação cicatrizante (RASIK *et al*., 1999).

Um composto sintetizado a partir de um cardenolídeo extraído da casca da raiz de *C. procera* exibiu atividade citotóxica contra diferentes linhagens de células tumorais humanas (QUAQUEBEKE *et al*., 2005). Extratos de raízes de

C. procera são utilizados no combate a ulcera, lepra e tumores (KUMAR & ARYA, 2006). Recentemente um trabalho foi publicado onde o produto da extração do látex com metanol apresentou ação antitumoral *in vivo* contra hepatocarcinoma induzido em ratos bem como atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais (CHOEDON *et al*., 2006). A maioria das atividades acima descritas referentes ao látex de *C. procera* foram realizados de modo exploratório e utilizando o látex na forma íntegra ou produtos da extração do látex com solventes orgânicos, não contemplando um eficiente método de extração de proteínas.

Eventos toxicológicos e até letais são observados quando o látex de *C. procera*, na sua forma íntegra, é dado a mamíferos (EL-BADWI *et al.,* 1998). Por outro lado, animais que receberam uma fração rica em proteínas isoladas do látex de C.procera e ausente em borracha e compostos de massa molecular inferior a 8.000 Da durante 35 dias consecutivos adicionadas na água de beber não apresentaram mudanças nos parâmetros bioquímicos sanguíneos, renais e hepáticos, mantendo-se rigorosamente similares aos do grupo controle. A administração diária da fração protéica do látex não promoveu morte dos animais, não houve rejeição ao consumo da amostra ou ganho de peso. Nenhuma toxicidade aguda foi desenvolvida durante o período experimental (RAMOS *et al*., 2006).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA *et al.,* 2007) mostraram que uma fração solúvel em água do látex, rica em proteínas, possui atividade citotóxica contra células tumorais humanas, não apresentando toxicidade à células do sangue periférico de indivíduos saudáveis quando

avaliado na mesma concentração. A atividade ficou retida em uma fração protéica recuperada após cromatografia de troca iônica.

Histórico das atividades antiinflamatória, pró-inflamatória e antinociceptiva da planta *Calotropis procera*

A ocorrência de atividade antiinflamatória em *C. procera* foi primeiramente descrita em 1988 em uma fração solúvel em etanol obtida a partir da extração das flores da planta (MASCOLO *et al.,* 1988). Em 1991, BASU & CHAUDHURI (1991) mostraram a presença de atividade antiinflamatória em extratos de raízes. Posteriormente, esta atividade foi mostrada também no látex da planta (KUMAR & BASU, 1994). Uma única dose do extrato aquoso do látex foi capaz de reverter o edema de pata induzido por carragenina ou formalina. Na quase totalidade dos trabalhos publicados, a atividade antiinflamatória é observada quando extratos aquosos e/ou orgânicos obtidos a partir de uma preparação íntegra do látex são administrados por via oral nos animais (KUMAR & BASU, 1994; MAJUMDAR & KUMAR, 1997; ARYA & KUMAR, 2005).

Em paralelo a atividade antiinflamatória presente no látex de *C. procera*, o mesmo foi mostrado induzir processos inflamatórios. O primeiro relato da atividade pró-inflamatória do látex surgiu em um trabalho de SINGH e colaboradores (2000). O extrato salino aquoso do látex promoveu resposta pró-inflamatória quando administrado localmente, avaliadas nos modelos de edema de pata e bolsa de ar em ratos. A resposta inflamatória observada foi acompanhada pelo aumento na permeabilidade vascular. Em seguida, a

atividade pró-inflamatória promovida pelo látex foi mostrada estar envolvidas em vias de liberação de serotonina e histamina (SINGH *et al.,* 2000; SHIVKAR & KUMAR, 2003). Posteriormente, prostaglandinas também foram relacionadas na inflamação mediada pelo látex (KUMAR & SHIVKAR, 2004). Em todos estes trabalhos foi utilizada uma preparação obtida a partir do látex íntegro como amostra de análise e nenhuma investigação bioquímica quanto à natureza das substâncias envolvidas foi detalhada.

Em 2004, Alencar e colaboradores (ALENCAR *et al*., 2004) mostraram que a atividade antiinflamatória presente no látex de *C. procera* é observada em uma fração solúvel em água, rica em proteínas. Esta fração protéica do látex foi capaz de reverter a inflamação em diferentes modelos animais.

A atividade antinociceptiva do látex de *C. procera* foi inicialmente observada em produtos da extração de raízes com clorofórmio e de partes aéreas da planta com metanol (BASU & CHAUDHURI, 1991; MOSSA *et al*., 1991). As frações demonstraram forte potencial analgésico no modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético. Estudo desenvolvido por DEWAN e colaboradores (2000) mostraram que uma preparação obtida a partir da extração látex íntegro da planta *C. procera* possui propriedades antinociceptivas. Uma única dose do látex administrada por via oral foi mais eficiente em reduzir as contorções abdominais induzidas por ácido acético comparada a uma dose administrada de aspirina. Posteriormente, Soares e colaboradores (SOARES *et al*., 2005) mostraram que a mesma fração protéica previamente descrita por Alencar e colaboradores (ALENCAR *et* al., 2004) com habilidade em inibir a resposta inflamatória era detentora de forte propriedade antinociceptiva.

É importante destacar que a maioria dos resultados publicados é de natureza exploratória, sendo alguns ainda preliminares. Considerando-se as atividades descritas anteriormente, quase nenhuma caracterização dos princípios ativos foi descrita até o momento. A busca pela identificação da(s) molécula(s) envolvida(s) nas atividades observadas é um passo importante que vem sendo buscado pelo nosso grupo de pesquisa.

Outras atividades biológicas relevantes referentes à planta *Calotropis procera*

O látex de *C. procera* também foi descrito por apresentar intensa atividade inseticida (JAHAN *et al*., 1991; MESHRAM, 1995). Folhas extraídas com água, etanol, éter de petróleo ou acetona apresentaram intensa atividade contra larvas, pupas e adultos da mosca doméstica (MOURSY *et al*., 2001). O látex também apresenta forte potencial no controle de mosquitos vetores de algumas doenças, como *Aedes aegypti* (transmissor da dengue), *Anopheles stephensi* (transmissor da malária) e *Culex fatigan* (transmissor da febre amarela) (GIRDHAR *et al*., 1984). Ramos e colaboradores (RAMOS *et al*., 2006) mostraram que moléculas presentes no látex de *C. procera* produzem efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento larval e eclosão de ovos do mosquito transmissor da Dengue. As doses eficazes para promover completa mortalidade das larvas não apresentam efeitos tóxicos quando administradas por via intraperitoneal em animais experimentais (RAMOS *et al*., 2006). Em outro trabalho a proposta do látex atuar na defesa da planta é defendida (RAMOS *et al.,* 2007). Proteínas relacionadas à patogênese e estresse

oxidativo foram detectadas em uma fração protéica do látex além de diferentes proteinases (FREITAS *et al.,* 2007).

Propriedades farmacológicas relacionadas a outras plantas produtoras de látex

Outras plantas produtoras de látex também foram descritas por apresentar propriedades farmacológicas. Dentre estas podemos citar o látex de *Jatropha curcas*, pertencente à família das Euforbiáceas, relatado por apresentar atividade pró-coagulante (OSONIYI & ONAJOBI, 2003). Uma lectina obtida a partir do látex de *Synadenium carinatum* apresentou potencial contra desordens inflamatórias e alergênicas (ROGERIO *et al*., 2007). Extrato aquoso do látex de *Euphorbia royleana* demonstrou atividade antiinflamatória quando avaliada em modelos de inflamação aguda e crônica (BANI *et al*., 2000). Látex de *Euphorbia tirucalli* promoveu indução de resistência à formação de tumor e estimulação à mielopoese em camundongos (VALADARES *et al*., 2006). Conhecido popularmente pelo nome de aveloz, o látex desta planta também já foi mencionado por apresentar atividade anti-viral e atividade antiinflamatória em modelo de inflamação crônica (BETANCUR-GALVIS *et al*., 2002; BANI *et al*., 2007).

As atividades anti-ulcera e cicatrizantes foram observadas em animais tratados com o látex de *Carica candamarcensis* (MELO *et al*., 2008). Estas atividades foram atribuídas à proteases do tipo cisteínica. O extrato etanólico do látex de *Himatanthus drasticus*, uma planta pertencente a família das Apocináceas, apresentou atividade antinociceptiva em modelos de contorção

abdominal e placa quente (COLARES *et al.*, 2008). No látex de *Plumeria rubra*, as atividades moluscicida, anti-bacteriana (HAMBURGER *et al.*, 1991) e anti-viral (TAN *et al.*, 1991) foram detectadas. Atividade anti-viral também foi encontrada no látex de *Cryptostegia grandiflora* (VIJAYAN *et al.*, 2004). A administração por via oral dos látices de *Ficus insipida* e *Ficus carica* apresentou atividade anti-helmintica em camundongos (AMORIM *et al.*, 1999).

Inflamação

Evento inflamatório

Quando um tecido íntegro sofre uma agressão, seja de natureza infecciosa ou não, o tecido responde no sentido de restaurar a integridade perdida. Esta resposta complexa do organismo é denominada inflamação. A inflamação é, portanto, um mecanismo de defesa do organismo caracterizada fundamentalmente por manifestar-se de maneira estereotipada contra agressões. Isto é, a resposta obedece a um padrão semelhante, independente da natureza do estímulo. Apesar disso, podem ocorrer pequenas variações dependendo do agente lesivo, das características dos tecidos ou do órgão afetado e da coexistência de estados patológicos (SEDGWICK & WILLOUGHBY, 1985).

A reação inflamatória pode ser dividida em duas fases: a primeira denominada aguda e a segunda, denominada fase crônica. A fase aguda é caracterizada pela curta duração, exsudação de fluido e proteínas plasmáticas e migração de leucócitos, predominantemente neutrófilos. Esta fase é

caracterizada pela manifestação dos denominados pontos cardinais da inflamação: dor, rubor, calor, tumor e, eventualmente, perda da função (GALLIN *et al.*, 1982). A fase crônica está na dependência do processo ser ou não resolvido, isto é, do estímulo ser ou não eliminado durante a fase aguda. A fase crônica, em geral, é de longa duração e se caracteriza pela presença de linfócitos e macrófagos, como proliferação de vasos sangüíneos e de tecido conjuntivo (SEDGWICK & WILLOUGHBY, 1985; BROIDE, 1991).

A resposta inflamatória é mediada por células

Uma resposta efetiva do hospedeiro à infecção ou ao dano tecidual, requer um acúmulo de leucócitos local. Os leucócitos fagocitam agentes lesivos matam bactérias, degradam tecidos necróticos e antígenos estranhos (BEVILACQUA *et al.*, 1994).

Em condições normais, os leucócitos circulam através de todos os tecidos do organismo. Cada grupo celular possui um padrão característico de migração. Quando ocorre inflamação em determinado local ocorre uma reação de atração de leucócitos de diferentes populações para o tecido inflamado (HOLLAND & MIKOS, 2003). Segundo IMHOF & DUNON (1997), o mecanismo de migração celular do sangue para o local inflamado é dividido em quatro fases: rolamento, adesão firme, diapedese e migração (FIGURA 2).

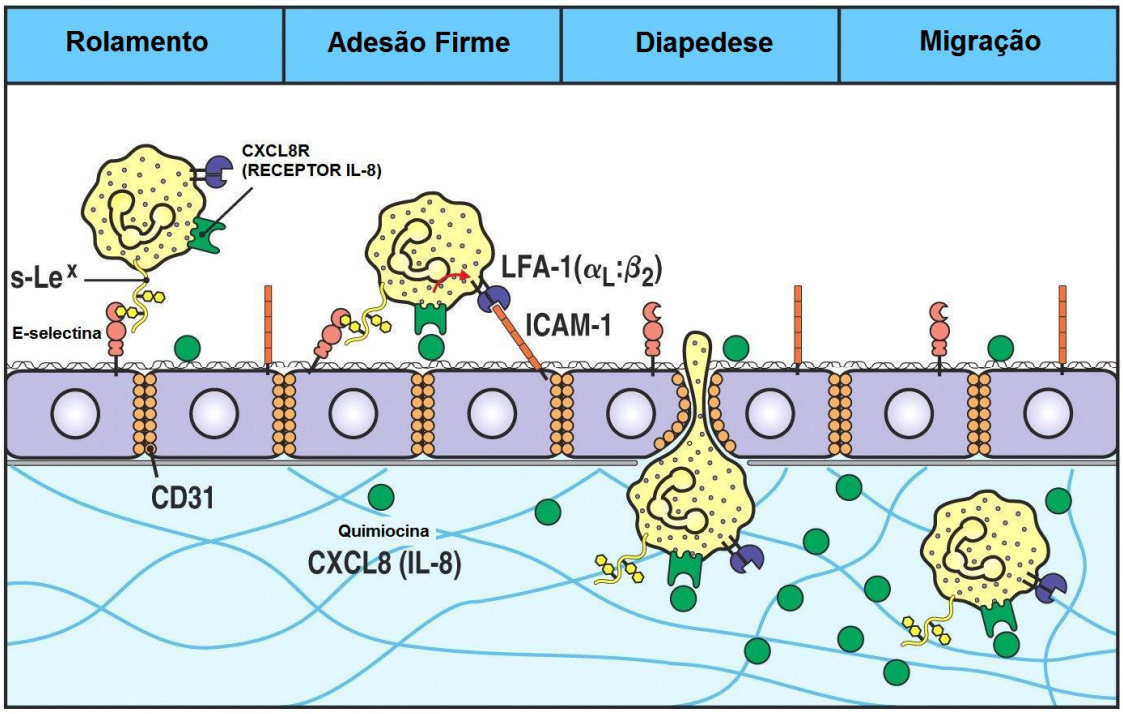

Figure 2-44 part 3 of 3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

FIGURA 2. Modelo de migração celular. Rolamento, adesão firme, diapedese e migração. Os leucócitos movimentam-se do capilar sangüíneo para o local de infecção através de interações entre proteínas de membrana, em um evento mediado por citocinas e quimiocinas. Fonte: traduzido de Immunobiology, 6ª Ed. 2005.

No local inflamado ocorre uma vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular, o que torna o fluxo sangüíneo local mais lento. Esta lentidão faz com que os leucócitos assumam uma posição periférica ao longo da superfície endotelial, o que é conhecido como marginação (ROBBINS *et al.*, 1994). Nesse momento, há o estabelecimento de uma adesão frouxa e transitória entre o leucócito e o endotélio. As selectinas, moléculas de adesão presentes nos leucócitos e no endotélio, participam desse retardamento dos leucócitos. Esse tempo de contato é necessário para preparar a etapa seguinte..

A nova etapa do processo consiste na ativação da função adesiva das integrinas que são moléculas presentes no endotélio e ativadas por TNF e IL-1 (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Na etapa seguinte da adesão firme, as integrinas desempenham sua função principal que é induzir a adesão dos leucócitos ao endotélio (ROBBINS *et al.*, 1994).

Na primeira fase da reação inflamatória, os neutrófilos, direcionados ao local da inflamação pela liberação de quimiocinas por células residentes ou células endoteliais, são os mais numerosos leucócitos a entrarem no local afetado, encarregando-se da fagocitose (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Os neutrófilos morrem durante o processo de destruição do invasor, constituindo a substância amarelada chamada pus. Outro efeito combinado de produtos de neutrófilos e endotoxinas bacterianas (pirogênicos) é a elevação da temperatura corporal, gerando o surgimento de febre. Outros leucócitos fagócitos, principalmente monócitos, entram secundariamente no local da inflamação (HOLLAND & MIKOS, 2003).

Mediadores químicos da resposta inflamatória

A histamina e a serotonina estão envolvidas na vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular no local da inflamação. A liberação de histamina pelos mastócitos e basófilos é desencadeada por injúria tecidual, complexo-anticorpo e pelo sistema complemento (YOKOYAMA & TANABE, 1989).

As citocinas são um tipo especial de mediadores que podem ser produzidos por quase todos os tipos, e atraem leucócitos (RISTIMKI *et al.*, 1994). Dentre as principais citocinas envolvidas no processo inflamatório temos Fator de Necrose tumoral (TNF-α), Interleucina 1 (IL-1), Quimiocinas, Interleucina 12 (IL-12), Interferon Tipo I (IFNs) e Interleucina 10 (IL-10) (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Receptores de citocinas específicos para IL-1, TNF-α, e IL-18 também funcionam como inibidores de citocinas pró-inflamatória (OPAL & DEPALO, 1999).

O ácido araquidônico é encontrado em fosfolipídios de membrana celulares em mastócitos, basófilos, macrófagos e células endoteliais. Os produtos gerados do metabolismo do ácido araquidônico são leucotrienos e prostaglandinas. As prostaglandinas agem na vasodilatação, inibição da agregação de plaquetas, potencializa a dor, vasoconstrição e modula a função dos macrófagos. Os leucotrienos promovem quimiotaxia, aumentando a permeabilidade vascular, agregação de leucócitos nas células endoteliais e vasoconstrição (DANNHARDT & KIEFER, 2000).

II - JUSTIFICATIVA

A planta *Calotropis procera*, conhecida localmente como ciúme ou flor de seda é vastamente distribuída na extensão territorial do Estado do Ceará. A planta é alvo de exploração pela população pobre para propósitos curativos e seu látex é utilizado para o combate a infecções de pele, dores de dente, entre outras aplicações. Por outro lado, poucos estudos são observados por grupos de pesquisa do Estado do Ceará ou do Brasil. A partir dos estudos iniciais e exploratórios do látex de *Calotropis procera* iniciados no Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais (UFC) foi possível evidenciar cientificamente diferentes propriedades do látex de *C. procera*.

O número de moléculas de origem vegetal já relatado na literatura como moléculas inibidoras e/ou interventoras de processos inflamatórios é bem relevante. Na verdade, foi esta observação que mais estimulou a busca de novos fármacos úteis à saúde humana em materiais vegetais. É relevante citar que a imensa ou quase totalidade das moléculas estudadas provém do metabolismo secundário das plantas e são compostos orgânicos, freqüentemente aromáticos. Esta característica direcionou intensamente o estudo fitoquímico baseado exclusivamente na estrutura e atividade destes compostos, ramo científico hoje denominado de “produtos naturais”.

Advindo destas observações, duas considerações podem ser feitas: (1) compostos secundários são fontes limitadas no contexto quantitativo e em termos industriais e não são passíveis de programas de biologia molecular para

síntese em laboratório; (2) com grande freqüência apresentam efeitos não desejados em adição a sua atividade benéfica, o que também limita sua utilização.

Outra vertente aparentemente menos explorada é a de que proteínas poderiam também produzir atividades benéficas e agirem como fármacos terapêuticos. Uma aparente desvantagem seria a de que proteínas seriam alvo de digestão por via oral e que poderiam produzir efeitos toxicológicos ou alergênicos. Por outro lado, uma proteína isenta de tais propriedades e com atividade benéfica poderia ser alvo de expressão e produção em sistema heterólogo.

A planta de estudo, *Calotropis procera*, é uma planta amplamente conhecida por suas propriedades farmacológicas e por ser uma rica fonte de proteínas. Desta forma, seu látex foi fracionado para obtenção de uma fração protéica passível de utilização na intervenção de processos inflamatórios e nociceptivos.

III – OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi fracionar o látex da planta *Calotropis procera* visando separar as atividades pró- e antiinflamatória; caracterizar os mecanismos pelos quais estas promovem seus eventos biológicos e avançar na identificação das moléculas envolvidas na atividade antiinflamatória e antinociceptiva de uma fração protéica do látex. Para tanto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Coletar e fracionar o látex de *C. procera* através de etapas de centrifugação e diálise com o objetivo de obter preparações mais purificadas;
- ✓ Caracterizar as frações através de eletroforese em uma e duas dimensões;
- ✓ Identificar diferenças entre as frações obtidas utilizando ensaio de detecção imunológica;
- ✓ Identificar as frações promotoras dos eventos pró- e antiinflamatórios e caracterizar o envolvimento de proteínas/peptídeos das frações nestas atividades;
- ✓ Fracionar proteínas do látex através de cromatografia de troca iônica para isolar as proteínas envolvidas na atividade antiinflamatória;
- ✓ Verificar a capacidade das sub-frações cromatográficas a inibir contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos;

- ✓ Caracterizar o mecanismo de ação pró-inflamatória utilizando fármacos antiinflamatórios específicos;
- ✓ Descrever o mecanismo de ação antiinflamatória através de ensaio de microscopia intravital e dosagem de óxido nítrico no soro de animais;
- ✓ Detectar atividade antiinflamatória do látex de *C. procera* por administração via oral.
- ✓ Avaliar a toxicidade de proteínas do látex quando administradas por via oral em animais.

IV - MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e fármacos

Reagentes para eletroforese, coluna de dessalinização PD-10 e outros reagentes de grau analítico foram adquiridos da Amersham Biosciences. Carragenina foi comprada da Sigma, USA. Dexametasona, Meclizina e Indometacina foram comprados da Sigma, USA. Talidomida foi obtida da Bioquímica Champion (São Paulo, Brasil) e Celecoxib (Celebra ®, Pfizer, Pharmacia, Brasil). Dexametasona e Celecoxib foram dissolvidos em salina estéril (NaCl 0,15 M); Indometacina em tampão Tris 0,1 M pH 8.0; Talidomida em dimetilsulfóxido e Meclizina foi inicialmente dissolvida em cremofor (não mais de 10 % do volume final) e o volume final completado com salina estéril (NaCl 0,15 M).

Espécie vegetal

Calotropis procera foi identificada pelo Professor Edson de Paula Nunes, taxonomista do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Uma exsicata de seu material encontra-se depositada sob o número 32.663 no Herbário Prisco Bezerra, pertencente ao mesmo departamento.

Esta planta é encontrada em abundância em várias localidades da cidade de Fortaleza, principalmente na área litorânea. A coleta do látex não

trás nenhum tipo de prejuízo aparente à planta, que apresenta excelente capacidade regenerativa.

Coleta e fracionamento do látex

A coleta do látex foi realizada através da quebra do ápice caulinar de plantas saudáveis. O material foi coletado em tubos com capacidade para 45 ml, onde foram colocados previamente 20 ml de água destilada. A quantidade de látex coletada por tubo mantinha sempre a proporção de 1:1 (v/v) com a água. A coleta de 20 ml pode ser obtida de um único exemplar da planta. Em média são obtidos aproximadamente 2 ml de látex por cada ápice caulinar. O procedimento de coleta do látex sobre água minimiza o efeito natural de "coagulação" que ocorre logo após sua coleta. Em sua forma *in natura*, após coleta, a secreção tende a sofrer reações de oxidação e claramente há formação de pedaços (flocos) de borracha, característica comum a látex de plantas.

Após a coleta do látex em água, a obtenção das frações do material biológico de estudo foi realizada segundo o protocolo esquematizado abaixo (FIGURA 3). No laboratório, o material foi submetido inicialmente à centrifugação a 5.000 x *g* durante 10 minutos a 10 ºC (FIGURA 3 [1]) e o precipitado, rico em borracha, foi congelado. O sobrenadante foi inicialmente submetido à diálise contra água destilada (1:1 v/v) durante 1 hora utilizando uma membrana com capacidade para retenção de moléculas com massa molecular superior a 8.000 Da (FIGURA 3 [2]). A água proveniente desta primeira hora de diálise foi recuperada, liofilizada e nomeada de Fração

Dialisável (FD). A etapa de diálise foi continuada contra água destilada (1:20 v/v) durante 60h, com trocas de água a cada 6 horas (FIGURA 3 [3]). Em seguida, o material foi novamente centrifugado nas mesmas condições, como descrito acima (FIGURA 3 [4]). O novo sobrenadante obtido, límpido e destituído de borracha, nomeado de Proteínas do Látex (PL), foi então liofilizado. O novo precipitado foi unido ao precipitado anterior, liofilizado e nomeado Borracha (B).

Cromatografia de dessalinização em coluna de PD-10

Para remover componentes de baixa massa molecular como íons e metabólitos secundários da fração dialisavel (FD), esta foi submetida a uma etapa cromatográfica de dessalinização em coluna de PD-10 (Amersham Biosciences) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Esta coluna é utilizada para separar componentes de alta massa molecular (PI - Mr > 5.000 Da) de componentes de baixa massa molecular (PII - Mr < 1.000 Da). A coluna foi previamente equilibrada com água destilada e 25 mg da FD dissolvidos em 2,5 ml de água destilada foram aplicados na coluna. Em seguida a coluna foi lavada com 2 ml de água destilada e o PI, constituído de compostos com massa molecular superior a 5.000 Da foi recuperado em tubos de ensaio após eluição da coluna com 4 mL de água destilada. O material obtido (PI PD-10) foi liofilizado e utilizado nos experimentos.

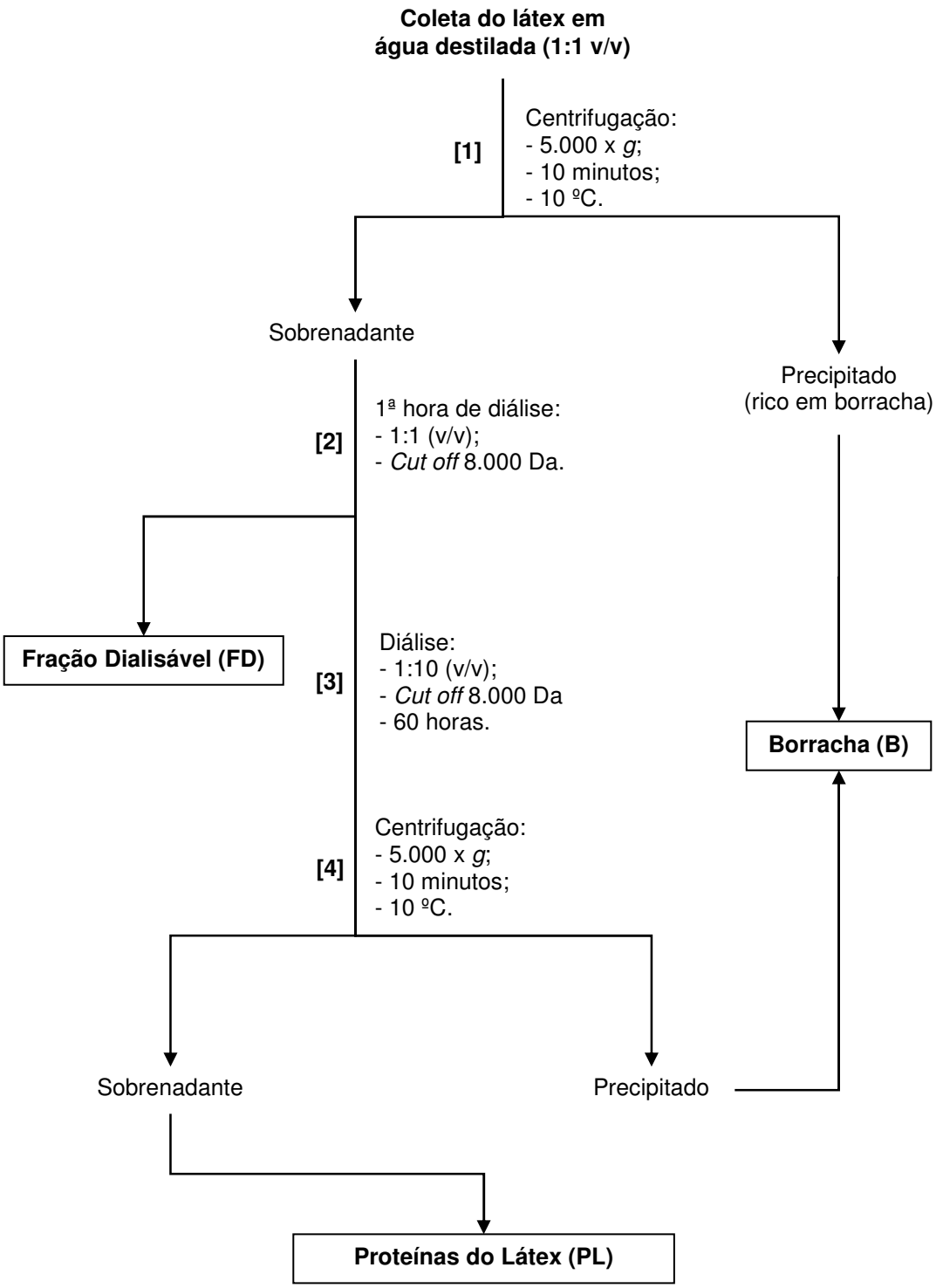

FIGURA 3 – Esquema de obtenção da Fração Dialisável (FD), a fração proteínas do látex (PL) e Borracha (B) do látex de *Calotropis procera*. As etapas [1],[2],[3] e [4] são detalhadamente descritas no texto acima.

Tratamento proteolítico das frações PL e FD por pronase

Tanto a fração PL quando FD foram submetidas a tratamento enzimático utilizando pronase, uma enzima proteolítica obtida de *Streptomyces griseus* (SIGMA P-5147), que promove hidrólise de ligações peptídicas de forma não específica. PL (50 mg) e FD (50 mg) foram solubilizadas em tampão PBS 0,1 M pH 7,4 e centrifugadas a 10.000 x *g* durante 5 minutos a 25º C. Aos sobrenadantes foram adicionados a pronase (1:50 m/m) por três vezes, correspondendo aos tempos zero, 12 e 18 horas de digestão, sendo o material deixado em banho-maria a 37 ºC desde o tempo zero até a 24 h de digestão. Após 24 horas, as amostras foram aquecidas a 60 ºC durante 10 min para inativar a enzima. As frações PL e FD submetidas a digestão foram posteriormente avaliadas quanto a presença das atividades farmacológicas.

Precipitação de PL com acetona

Objetivando remover quaisquer outros compostos diferentes de proteínas na fração PL, esta foi submetida a etapa de precipitação de proteínas com acetona gelada (-20 ºC). Para tanto, 50 mg de PL foram solubilizados em 5 ml de água destilada e em seguida centrifugado a 10.000 x *g*; 10 ºC durante 10 minutos. O sobrenadante obtido foi precipitado com 4 volumes de acetona gelada durante 12 horas à temperatura de -20 ºC e centrifugado a 10.000 x *g* durante 20 minutos. O precipitado obtido foi seco à vácuo em um dessecador acoplado a uma bomba a vácuo. Este material foi posteriormente avaliado quando a presença da atividade antiinflamatória.

Fracionamento de proteínas do látex por cromatografia de troca iônica

As proteínas do látex (PL) foram submetidas à cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose Fast Flow previamente equilibrada com tampão acetato 50 mM pH 5,0. Para tanto, 80 mg da fração PL foram dissolvidas em 8 ml de tampão acetato 50 mM pH 5,0. O material foi centrifugado a 10.000 x *g*; 10 ºC durante 10 minutos e o sobrenadante foi aplicado à coluna. Frações de 5 ml/tubo foram coletadas a um fluxo de 30 ml/h e as absorbâncias determinadas em 280 nm. Após lavagem da coluna tampão acetato 50 mM pH 5,0, foi aplicada à coluna tampão acetato 50 mM pH 5,0 contendo 0,2 M e 0,3 M, seqüencialmente. Este procedimento gerou três novas sub-frações (PI, PII e PIII) que foram analisadas por eletroforese e avaliadas quanto a presença das atividades antiinflamatória e antinociceptiva.

Eletroforeses em presença de SDS

Eletroforeses em gel de poliacrilamida (12,5 %) em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) foram desenvolvidas para avaliar o perfil protéico de proteínas presentes na fração PL, PL submetida à tratamento com pronase, fração borracha (B) e picos cromatográficos (PI, PII e PIII) utilizando o método previamente descrito por LAEMMLI (1970). A fração dialisável (FD) e o PI PD-10 recuperado da coluna de PD-10 foram analisados utilizando eletroforese para peptídeos em gel de poliacrilamida 17 % de acordo com a metodologia descrita por SCHAGGER & JAGOW (1987). As bandas protéicas/peptídicas foram observadas após coloração dos géis com solução de Coomassie Brilliant

Blue R-350 0,05 % em água: ácido acético: metanol (8:1:3,5 v/v/v) durante 4 horas seguido da remoção do corante não ligado às proteínas/peptídeos com a mesma solução na ausência do corante.

Eletroforese bidimensional

Para a realização da primeira dimensão, tiras de gel linear Immobiline DryStrip, com faixa de pH variando de 4-7 ou 3-10 apresentando 11cm de comprimento, foram hidratadas com solução de hidratação contendo a fração PL ou sub-frações cromatogáficas. A solução de hidratação é composta por 8M uréia, 2M tiouréia, 1% de CHAPS, 0,5% de IpG Buffer apresentando anfólitos com pH variando de 3-10, 2,8% de DTT e traços de Azul de Bromofenol. Amostras de 200µl contendo 300µg de proteínas foram depositados em um dos poços do Immobiline DryStrip Reswelling onde as tiras de Immobiline DryStrip foram gentilmente deitadas sobre as amostras de tal foram que o lado da tira que contém o gel ficasse voltado para baixo, em íntimo contato com a amostra, para que essa fosse incorporada pelo gel. As tiras foram cobertas com óleo mineral para evitar o ressecamento das tiras e empurrar a amostra para a região da tira que contém o gel. As tiras foram deixadas re-hidratando durante 16 horas à temperatura ambiente.

Após este período de re-hidratação foi realizada a Focalização Isoelétrica das proteínas. As tiras foram posicionadas no aparelho focalizador Multiphor II ligado a um sistema refrigerado e as tiras foram submetidas as seguintes condições de corrida: 50 µA e 5W a 200V/1h, 500V/2h, 5000V/2h,

10000V até atingir 18000 VhT de forma não linear (steps). A focalização foi realizada a uma temperatura de 18ºC.

Após a etapa de focalização, as tiras foram submersas em tampão de corrida para se retirar o excesso de Cover Fluid e em seguida tratadas durante 15 minutos em uma solução de Tris-HCl pH 8,8 contendo 2% SDS, 6M de uréia, 30% de glicerol (v/v), 0,002% Azul de Bromofenol contendo 0,1% DTT. Em seguida as tiras foram tratadas com a mesma solução na ausência de DTT e presença de 0,25 % de iodoacetamida (IAA). Este tratamento preparou as tiras para a realização da segunda etapa eletroforética, onde as proteínas são separadas por suas massas moleculares.

As tiras foram deitadas sobre géis de poliacrilamida 12,5% contendo SDS (0,1%) montado em sistema de placas verticais. O sistema foi selado com agarose 1,5% contendo Azul de Bromofenol para facilitar a visualização da frente de migração. A corrida eletroforética foi desenvolvida a 180V e 40mA por placa e realizada à temperatura ambiente usando-se como tampão de corrida, Tris 0,025M pH 8,3 contendo glicina 0,192M e SDS 0,1%. O tempo de corrida variou entre 6 e 7 horas.

Após o processo eletroforético, os géis foram fixados durante 1 hora em etanol, ácido acético e água (4:1:5/v:v:v). Posteriormente os géis foram corados com uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-350 0,1% (PhastGel Blue R) em água: ácido acético: metanol (8:1:3,5/ v:v:v) durante 4 horas e em seguida descoradas com a mesma solução na ausência do corante, permitindo assim a visualização dos spots de proteínas.

Inibição e ensaio de atividade de proteases cisteínicas de proteínas do látex de *C. procera*

O látex de *C. procera* foi coletado em água destilada (1:1; v/v) contendo 20 mM de iodoacetamida (IAA). Em seguida a fração PL foi obtida segundo metodologia descrita acima (FIGURA 3). A presença de atividade de proteases cisteínicas foi realizada utilizando substrato específico para proteases cisteínicas (BANA). Alíquotas de 200 µl de PL, tratado ou não com iodoacetamida (1 mg/ml), foram dissolvidas em tampão acetato 50 mM pH 5,0. As amostras foram então pré-incubadas com 40 µl de tampão contendo 3 mM de DTT durante 10 minutos a 37 ºC para ativação das proteases e em seguida, adicionados 200 µl de BANA (1 mM). Trinta minutos depois, a reação foi parada pela adição de 500 µl de etanol contendo 2 % de HCl e 500 µl de 4-(dimetil-amino)cinamaldeido a 0,06 %. Depois de 40 minutos, as absorbâncias das amostras foram avaliadas em 540 nm. Os resultados foram expressos como atividade enzimática por micrograma de proteína.

Produção de anticorpos policlonais contra fração PL em coelho

Anticorpos policlonais contra a fração PL foram estimulados em um coelho da raça Nova Zelândia. A sensibilização foi induzida após administração intramuscular de uma dose inicial (dia 0) da fração PL (10 mg) em 500 µl de salina estéril e 500 µl de adjuvante completo de Freund. Doses de reforço de 10 mg de PL em 1 ml de salina estéril, sem o adjuvante completo de Freund foram administradas por via subcutânea nos dias 21, 35 e 42.

Amostras sanguíneas foram coletadas, a partir da veia marginal da orelha do animal antes da imunização inicial e doses de reforço. As amostras sanguíneas foram deixadas coagular em estufa a 37 ºC, em seguida centrifugadas, e os anti-soros obtidos foram congelados e posteriormente utilizados.

Detecção imunológica de proteínas pertencentes à fração PL nas frações FD e B

Objetivando descartar a possibilidade das proteínas que constituem a fração PL estarem presentes na fração FD e confirmar a presença destas na fração B, foi realizado ensaio de detecção imunológica utilizando membrana Hybond-C (Amersham LifeScience). Para tanto, alíquotas de 2 µl da fração FD (50 mg/ml) e da fração B (10 mg/ml) foram depositadas sobre a membrana nas diluições de 1:1; 1:100 e 1:1000 (v/v) e deixadas secar a temperatura ambiente (25 ºC). Em seguida, a membrana foi incubada com solução bloqueadora, composta de tampão TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,15 M, Tween20 0,05 %, pH 7,5) contendo 5% de leite em pó desnatado, sob agitação durante 60 minutos. Em seguida, a solução bloqueadora foi descartada e a membrana foi incubada com o anti-soro de coelho estimulado contra a fração PL (dia 42) diluída em solução bloqueadora (1:5000) durante 60 minutos. Após esta etapa, a membrana foi exaustivamente lavada com tampão TBS para remoção completa do anti-soro. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo Anti-IgG de coelho (SIGMA-A3687) conjugado a enzima fosfatase alcalina na diluição de 1:10000 em solução bloqueadora. Após 60 minutos de incubação, a solução

contendo o anticorpo foi removida e a membrana foi novamente lavada exaustivamente com tampão TBS.

A reação positiva foi observada após formação de uma tonalidade violeta quando da reação da fostafase alcalina sobre o substrato 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate Nitro Blue Tetrazolium (BCIP/NBT) (SIGMA). As membranas foram cobertas com a solução contendo o substrato, deixadas sob agitação lenta e monitoradas até que a reação positiva atingisse a intensidade desejada, quando então a membrana foi transferida para uma placa de Petri com água destilada para parar a reação.

Extração e caracterização dos extratos etanólicos de PL e FD

Inicialmente, 1 g de PL ou FD foram extraídos com 30 ml de álcool etílico P.A (95 %) durante 30 minutos a 25 ºC e sob agitação constante em agitador magnético. Em seguida as preparações foram centrifugadas a 5.000 x *g* durante 10 minutos; 25 ºC. O sobrenadante proveniente da extração de FD foi concentrado até o volume final atingir aproximadamente 2 ml. O concentrado foi diluído (10 vezes) em água destilada, congelado e então liofilizado. O precipitado da extração de PL foi re-extraído em etanol e novamente centrifugado, por mais duas vezes e os sobrenadantes provenientes das três extrações foram reunidos e concentrados até o volume final atingir aproximadamente 2 ml. O material foi então diluído (10 vezes) em água destilada, congelado e liofilizado. Uma alíquota foi recuperada imediatamente após extração das frações PL e FD com etanol para dosagem de proteínas solúveis através do método descrito por BRADFORD (1976).

Após a etapa de extração, os extratos etanólicos foram submetidos a análises espectroscópicas de Massa (EM) no departamento de Química da Universidade do Ceará.

Ensaios Biológicos

Animais

Ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus* 150-200 g) e camundongos machos Swiss (*Mus musculus* 20-30 g) adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará foram mantidos sob temperatura controlada (25 ºC) e com acesso à comida e água *ad libitum*. Um coelho (Oryctolagus cuniculus) da raça Nova Zelândia foi comprado no coelhario do Departamento de Zootecnia da UFC e mantido com livre acesso a água e comida. Os experimentos e manuseio dos animais foram realizados de acordo com o código ético de experimentação animal (HOWARB-JONES, 1995) e Comissão de Ética em pesquisa Animal da UFC.

Avaliação das atividades pró-inflamatória e antiinflamatória de frações do látex de *Calotropis procera*

O modelo de peritonite em ratos foi utilizado para avaliar a habilidade das frações obtidas do látex de *Calotropis procera* em induzir resposta pró-inflamatória e/ou antiinflamatória. Para os ensaios de atividade antiinflamatória foi utilizado carragenina, um agente inflamatório amplamente

utilizado para avaliar a ação fármacos antiinflamatórios e cujos eventos inflamatórios envolvem o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (LO *et al.*, 1982).

Avaliação da atividade pró-inflamatória

Para avaliar a capacidade das frações PL, FD e B induzirem migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de animais, 5 mg de cada fração foi solubilizada em 1 ml de solução salina estéril (NaCl 0,15 M) e administradas por via intraperitoneal em diferentes grupos de ratos. Quatro horas após administração das frações do látex, os animais foram sacrificados por overdose de Halotano® e 10 ml de salina estéril (NaCl 0,15 M) contendo 5 UI/ml de heparina foi injetado na cavidade peritoneal de cada animal. Os abdomens dos animais foram, então, gentilmente massageados e as células presentes na cavidade peritoneal foram recuperadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur, através de uma incisão no abdômen dos animais. Contagens, total e diferencial, de leucócitos foram feitas conforme metodologia descrita por SOUZA e FERREIRA (1985). Neste procedimento, 20 µl do fluido peritoneal coletado de cada animal foi diluído em 380 µl do reagente de Turk e posteriormente usado para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células foi realizada através de esfregaços corados em lâminas. Para tanto, 50 µl dos exsudados foram centrifugados em citocentrífuga a 1.500 x *g*, durante 10 min e após este processo os esfregaços foram corados utilizando o corante HEMA 3 que segue o mesmo método de coloração de hematoxilina-eosina.

As frações FD submetida à tratamento térmico (100 ºC durante 30 minutos), FD submetida a tratamento proteolítico por pronase e o PI recuperado após etapa de dessalinização da fração FD também foram avaliadas quanto a capacidade de induzir migração de neutrófilos para cavidade peritoneal dos animais. Para tanto, 5 mg de cada amostra foi solubilizada em 1 ml de solução salina estéril (NaCl 0,15 M) e administradas na cavidade intraperitoneal dos animais. Quatro horas depois foi realizada a contagem de células presente no lavado peritoneal assim como descrito acima. A resposta pró-inflamatória foi avaliada pelo aumento na quantidade de neutrófilos na cavidade peritoneal dos animais comparados ao de animais controle que receberam somente salina estéril (1 ml) por via intraperitoneal.

Curva dose-resposta e curso-temporal da migração de leucócitos para cavidade peritoneal de ratos induzida por FD

Para avaliar a relação dose-resposta da atividade pró-inflamatória induzida por FD, ratos receberam 1 ml de solução salina estéril (NaCl 0,15 M) por via intraperitoneal contendo FD em concentrações variando de 0,16 a 40 mg/ml. Quatro horas após a administração de FD, os animais foram sacrificados e a contagem total e diferencial de leucócitos foi realizada.

Em seguida, objetivando determinar o tempo em que a migração de neutrófilos e células mononucleares para cavidade peritoneal de ratos induzidas pela FD eram máximas, contagem total e diferencial de leucócitos foi realizada no peritoneal dos animais em diferentes tempos (2, 4, 8, 12, 24, ou 48 h) após administração por via intraperitoneal de 1 ml de salina estéril contendo

5 mg de FD. Os resultados obtidos foram comparados ao de animais que receberam somente salina estéril por via intraperitoneal.

Efeito de bloqueadores farmacológicos na migração de neutrófilos induzida por FD

Para o estudo do mecanismo de ação pelo qual a FD induz resposta pró-inflamatória no modelo em estudo, ratos foram pré-tratados com fármacos cujos respectivos mecanismos de ação sobre a resposta inflamatória são bem compreendidos. Para tanto, animais receberam 5 mg de FD em 1 ml de solução salina estéril (NaCl 0,15 M) por via intraperitoneal 1 hora depois da administração, por via subcutânea, de Dexametasona (4 mg/kg), Talidomida (200 mg/kg), Indometacina (10 mg/kg) e Celecoxib (30 mg/kg); ou 30 minutos após injeção de Meclizina (40 mg/kg). Quatro horas depois da administração de FD, o lavado peritoneal dos animais foi recuperado e a contagem de leucócitos realizada. Os resultados obtidos foram comparados aos dos animais do grupo controle que receberam 1 ml de salina estéril 1 hora antes do tratamento com 5 mg de FD por via intraperitoneal.

Avaliação da atividade antiinflamatória

Para avaliar a habilidade das frações do látex em inibir a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal dos ratos, diferentes grupos de animais receberam 200 µl de salina estéril contendo 10 mg/kg das frações PL, FD ou B por via endovenosa. Trinta minutos depois, 1 ml de solução salina estéril (NaCl

0,15 M) contendo 700 µg de carragenina (Cg) foi administrada por via intraperitoneal nos animais. Quatro horas depois da administração do estímulo inflamatório, os animais foram sacrificados por overdose de Halotano® e feita a coleta do lavado peritoneal para contagem total e diferencial de leucócitos foram conduzidas como descrito anteriormente.

Para investigar o envolvimento de proteínas na atividade antiinflamatória, 10 mg/kg de PL submetida a tratamento proteolítico por pronase, PL submetido a tratamento térmico (100 ºC por até 60 minutos) ou PL submetida à precipitação com acetona foram avaliadas utilizando o mesmo modelo experimental descrito acima.

Posteriormente, as sub-frações (PI, PII e PIII) recuperadas após aplicação de PL em cromatografia de troca iônica, foram avaliadas quanto a habilidade em inibir a migração de neutrófilos induzida por carragenina.

Em todos os experimentos, a resposta antiinflamatória foi avaliada pela observação da diminuição no número de neutrófilos na cavidade peritoneal dos animais que receberam as frações em comparação aos de ratos que receberam somente carragenina (700 µg) por via intraperitoneal. Um grupo controle negativo foi conduzido com animais recebendo salina estéril tanto por via endovenosa quanto por via intraperitoneal.

Inibição do estímulo pró-inflamatório induzido pela fração FD por PL e sub-frações cromatográficas

PL, PI, PII e PIII foram desafiados reverter o estímulo pró-inflamatório induzido pela fração FD. Para tanto, animais receberam 200 µl de salina estéril

(NaCl 0,15 M) por via endovenosa contendo 10 mg/kg de PL ou sub-frações cromatográficas. Trinta minutos depois, 5 mg da fração FD em 1 ml de salina estéril foi injetada em cada animal por via intraperitoneal. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical quatro horas depois de receberem FD e realizada contagem total e diferencial de leucócitos presentes no lavado peritoneal. Os resultados obtidos foram comparados aos dos animais controle que receberam somente FD (5 mg/animal) por via intraperitoneal.

Determinação da ação de proteínas do látex de *C. procera* no rolamento e adesão de leucócitos através de ensaio de microscopia intravital

O rolamento e a adesão de leucócitos foram examinados segundo metodologia previamente descrita (BAEZ, 1969; RHODIN, 1986; FORTES *et al*. 1991). Camundongos receberam PL ou sub-frações cromatográficas (PI, PII ou PIII) (10 mg/kg) por via endovenosa. Trinta minutos depois, a migração de leucócitos foi induzida pela administração de carragenina (500 µg) na cavidade peritoneal dos animais. Depois de 2 horas, os animais foram anestesiados com tribromo etanol (250 mg/kg). O mesentério dos animais foi exteriorado através de uma incisão lateral cutânea na cavidade abdominal dos camundongos para a observação da microcirculação *in situ*. A preparação foi mantida úmida e aquecida através da irrigação com solução de Ringer-Locke ou salina estéril a 37 ºC. A preparação foi mantida sobre o charriot de um microscópio óptico tri-ocular, ao qual estão acoplados um fototubo, com sistema de lentes ampliadoras superpostas, um monitor de computador e um vídeo que permite a

projeção e gravação de imagem com aumento final de 3.400 vezes (BAEZ, 1969) para avaliação.

Os vasos selecionados para o estudo foram vênulas pós-capilares com diâmetro variando 10 a 18 µm. Duas horas após o estímulo inflamatório (Cg), o rolamento dos leucócitos foi avaliado em uma extensão de 10 µm durante 5 minutos, e o número dos leucócitos aderidos ao endotélio em uma extensão de 10 µm de vênula foi avaliado após 4 horas do mesmo estímulo. Esta extensão é definida na tela do monitor: 10 µm no tecido correspondem a 3,4 cm na tela (FORTES *et al.,* 1991), portanto os resultados foram expressos em rolamento celular/10 µm/minuto e células aderidas/10 μm^2. Foram considerados os leucócitos que permaneceram aderidos ao endotélio vascular por mais de 30 segundos (GRANGER *et al.,* 1989). Duas determinações numéricas foram feitas por animal, estimando-se o resultado como média de ambos.

Dosagem de óxido nítrico no plasma sanguíneo de animais tratados com proteínas do látex de *C. procera*

Ratos receberam PL, PI, PII ou PIII (10 mg/kg) por via endovenosa 30 minutos antes da indução do estímulo inflamatório por via intraperitoneal (700 µg carragenina). Quatro horas depois, os animais foram anestesiados e amostras de sangue foram coletadas em tubos de eppendorf a partir do plexo retro-orbital, utilizando capilar. Em seguida as amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção do soro. Os níveis de oxido nítrico no soro dos animais foram determinados indiretamente pelos níveis de nitrito (NO_2^-) de acordo com FENG *et al.* (2001). Para tanto, 100 µl do soro dos animais foi

incubado com 100 µl do reagente de Griess (1 % Sulfanilamida em H_3PO^4 1 %/ 0,1 % de N-1-naftil-etilenodiamina dihidrocloreto/H_3PO^4 1 %/água destilada, 1:1:1:1;v/v) em temperatura ambiente (25 ºC), durante 10 minutos. Em seguida, a densidade óptica das amostras foi obtida após leitura a 540 nm em um leitor de placas. A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão realizada com $NaNO_2$.

Avaliação da atividade antiinflamatória de frações do látex de *C. procera* administradas por via oral

Ratos em jejum de 6 horas receberam através de gavagem a fração PL (12,5, 25, 50, 100 ou 1000 mg/kg) em 1 ml de solução salina estéril (NaCl 0,15M) contendo 1 % de amido. Uma hora depois, 700 µg de carragenina em 1 ml de salina estéril em foi administrada por via intraperitoneal em cada animal. Quatro horas depois da administração do estímulo inflamatório, os animais foram sacrificados e feita a coleta para contagem total e diferencial de leucócitos.

Em outro protocolo, animais em jejum receberam 1 ml do látex na sua forma *in natura*, ou seja, o sobrenadante obtido após a primeira centrifugação do látex (FIGURA 3 [1]). Uma hora depois, o estimulo inflamatório foi induzido por carragenina (700 µg / animal). Após 4 horas,foi feita a contagem de células. Os resultados obtidos foram comparados aos dos animais que receberam salina estéril por via oral seguida da injeção de carragenina (700 µg) por via intraperitoneal.

Avaliação da toxicidade aguda das proteínas do látex de *C. procera* para ratos por via oral

A fração PL foi avaliada nos animais por via oral, através de gavagem. Para tanto, uma dose de 5.000 mg/kg em solução salina estéril (NaCl 0,9 %), foi administrada em seis animais (grupo contendo três machos e três fêmeas). Os animais tiveram livre acesso à água e comida e foram mantidos no laboratório a 25 °C. Os ratos foram observados quanto a alterações comportamentais e padrões fisiológicos de defecação e micção durante 72 h.

Atividade antinociceptiva

PL e as sub-frações cromatográficas foram testada em um modelo de avaliação de substâncias analgésicas que atuam de modo inespecífico utilizando camundongos.

Modelo de contorções abdominais induzida por ácido acético

O modelo de contorção abdominal foi conduzido a partir de uma adaptação da metodologia descrita por KOSTER e colaboradores (1959). Camundongos machos receberam (100 µl/10 g) de salina estéril (NaCl 0,15 M) contendo PL, PI, PII ou PIII (5, 12,5 ou 50 mg/kg) por via intraperitoneal. Trinta minutos depois, os animais receberam ácido acético 0,6 % (100 µl/10 g) por via intraperitoneal. Dez minutos após injeção de ácido acético, o número de contorções abdominais foi registrado por 20 minutos. Os resultados obtidos

foram comparados ao de animais controle que receberam somente salina estéril (100 µl/10 g). Morfina (5 mg/Kg) administrado por via subcutânea 30 minutos antes da indução das contorções abdominais, foi utilizada como droga de referência.

Análise estatística

Para os ensaios de atividade antiinflamatória (*n=5*) e para o modelo de contorção abdominal (*n=8*), os experimentos foram calculados como média ± E.P.M. de um número de eventos em cada grupo. As diferenças estatísticas entre os grupos foram obtidas através da análise de variância (ANOVA) e teste de Bonferonni ($p < 0,05$) para ensaios de atividade antiinflamatória e Neuman-Keuls ($p < 0,001$) para ensaio de contorções abdominais. Valores inferiores a p foram considerados para indicar uma significância estatística.

V - RESULTADOS

As etapas de centrifugação e diálise realizadas originaram três frações. A primeira, insolúvel em água, é constituída principalmente por borracha (B). A segunda é constituída por moléculas com massa molecular inferior a 8.000 Da (FD), e a terceira, é uma fração rica em proteínas solúveis em água (PL) e que apresentam massa molecular superior a 8.000 Da.

Inicialmente, o perfil protéico da fração FD foi avaliado através de eletroforese para peptídeos em gel contendo 17 % de poliacrilamida (FIGURA 4 - A). Na fração FD, foi observada a presença de pelo menos quatro bandas peptídicas. Estas quatro bandas também foram visualizadas no PI obtido após etapa cromatográfica da fração FD em coluna PD-10 (Sephadex G-25).

As frações borracha (B) e proteínas do látex (PL) também foram analisadas quanto ao perfil protéico, no entanto, utilizando metodologia de eletroforese para proteínas em gel contendo 12,5 % de poliacrilamida (FIGURA 4 - B). Através deste procedimento, foi possível observar que as frações B e PL apresentam similaridade nos seus conteúdos protéicos.

As frações foram investigadas quanto a presença de atividade pró-inflamatória. Contagem diferencial de leucócitos de animais que PL, B e FD monstrou que as frações PL e B não promoveram alterações nos valores de neutrófilos (1.522 ± 313 e 1455 ± 434,2 x 10^3 neutrófilos/ml, respectivamente) quando comparados a animais controle (1.143 ± 265,4 x 10^3 neutrófilos/ml) enquanto que a fração FD induziu intensa migração de neutrófilos (4.523 ± 263,5 x 10^3 neutrófilos/ml), mostrando que esta fração induz resposta pró-inflamatória (FIGURA 5).

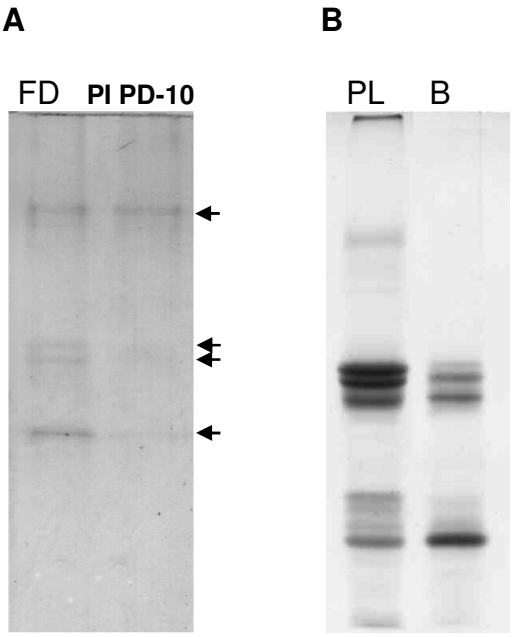

FIGURA 4**.** Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações do látex de *Calotropis procera.* **A:** Eletroforese em gel contendo 17 % de poliacrilamida. PI PD-10 são peptídeos presentes na FD e recuperados após etapa cromatográfica de dessalinização. **B:** Eletroforese em gel contendo 12,5 % de poliacrilamida. PL representa o principal conteúdo protéico presente no látex da planta e B proteínas extraídas da borracha.

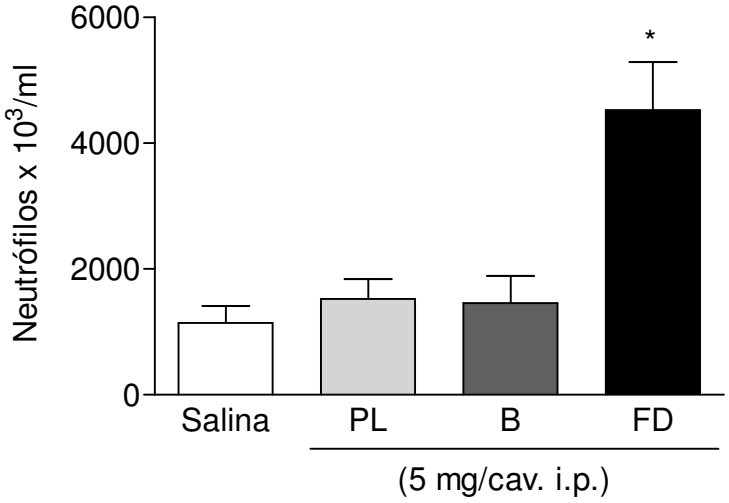

FIGURA 5**.** Avaliação da atividade pró-inflamatória das frações do látex de *Calotropis procera*. A resposta pró-inflamatória foi avaliada pelo aumento no número de neutrófilos na cavidade peritoneal dos animais. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. (*n=5*). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo controle que recebeu salina estéril por via intraperitoneal (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

Intensa atividade pró-inflamatória também foi observada quando o PI recuperado após etapa cromatográfica em coluna de PD-10 foi administrado por via intraperitoneal nos animais (1.707 ± 145,3 x 10^3 neutrófilos/ml) quando comparados a animais controle (175,8 ± 142,7 x 10^3 neutrófilos/ml) (FIGURA 6). Esta atividade pró-inflamatória promovida pelo PI PD-10 permaneceu mesmo após tratamento térmico da fração a 100 °C durante 30 minutos antes da sua administração nos animais (1.802 ± 128,8 x 10^3 neutrófilos/ml). Por outro lado, a atividade pró-inflamatória desempenhada pela fração FD foi reduzida em 50 % quando submetida a tratamento enzimático com durante 24 horas antes da administração nos ratos, sugerindo o envolvimento de peptídeos na resposta induzida pela fração (FIGURA 7). A migração de neutrófilos induzida pela fração FD foi pelo menos duas vezes maior que a

Em poder destas informações, um estudo detalhado foi conduzido para determinar o tempo e a dose em que a resposta pró-inflamatória promovida pela fração FD era máxima. A contagem de leucócitos a partir do lavado peritoneal de ratos que receberam uma única dose de FD por via intraperitoneal revelou que o pico de migração de neutrófilos para cavidade peritoneal dos animais se dá por volta da 4ª hora após sua administração (FIGURA 8 - A). O retorno aos níveis normais de neutrófilos foi observado após 48 horas enquanto, acompanhado de um aumento de mononucleares, caracterizando uma resposta inflamatória aguda. Em outro protocolo, quando diferentes doses de FD foram administradas por via intraperitoneal nos ratos, foi observado que a resposta pró-inflamatória da fração é dependente de dose (FIGURA 8 - B).

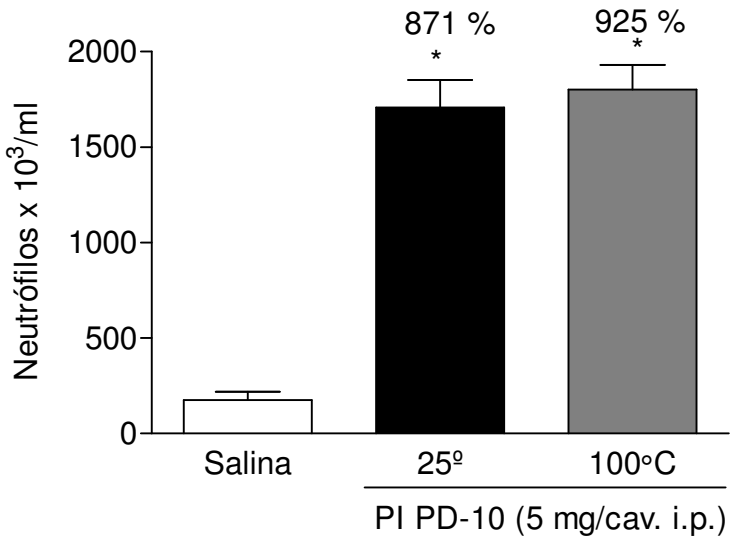

FIGURA 6**.** Efeito pró-inflamatório do pico recuperado (PI) após etapa de dessalinização de FD em coluna de PD-10 em sua forma nativa (25 ºC) ou submetido a tratamento térmico (100 ºC). A resposta pró-inflamatória foi avaliada pelo aumento no número de neutrófilos na cavidade peritoneal dos ratos. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. (*n=5*). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com grupo controle que recebeu salina estéril por via intraperitoneal (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni). O percentual indica o aumento no número de neutrófilos quando comparado com o grupo salina.

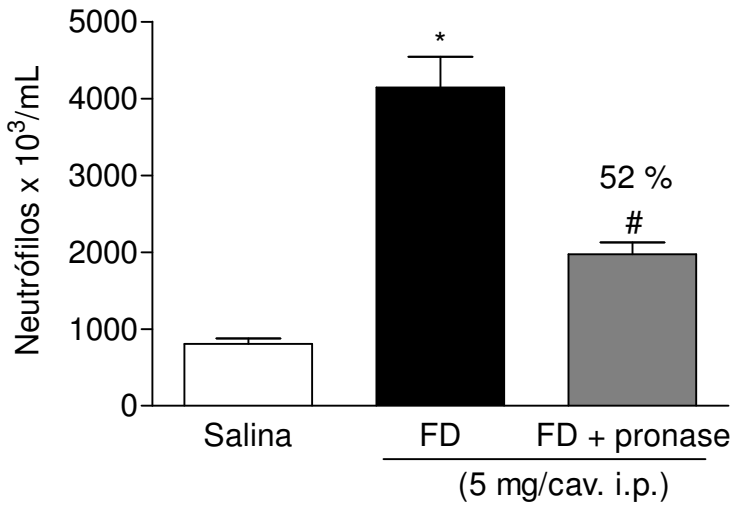

FIGURA 7**.** Avaliação da atividade pró-inflamatória da fração FD submetido à tratamento enzimático por pronase. A resposta pró-inflamatória foi avaliada pelo aumento no número de neutrófilos na cavidade peritoneal dos ratos. Os valores são expressos como média ± E.P.M. (*n=5*). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo controle salina e # $p < 0,05$ comparado com animais injetados com FD (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni). O percentual indica a diferença de neutrófilos quando comparado ao grupo FD.

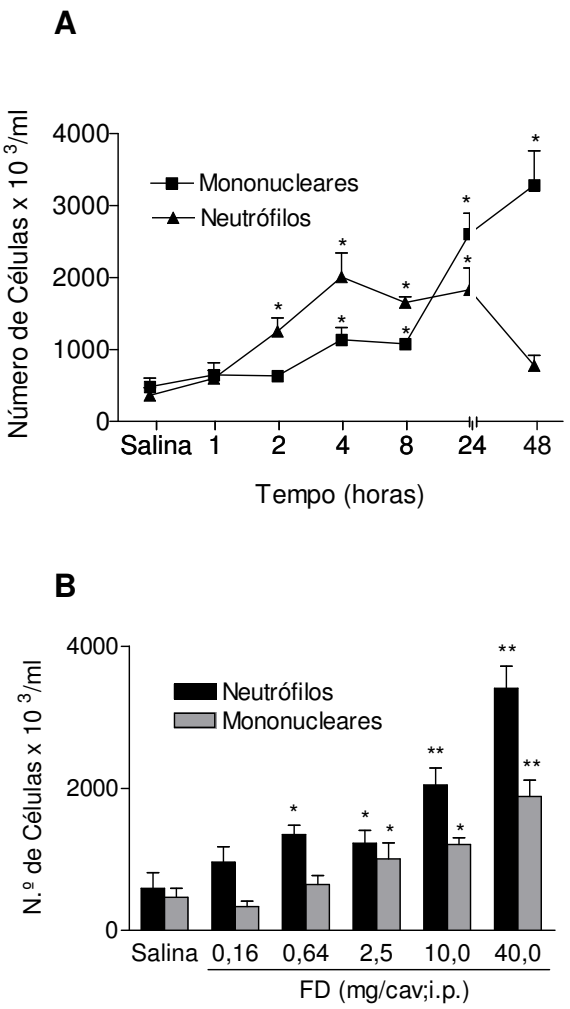

FIGURA 8**.** Curva curso-temporal (**A**) e dose-resposta (**B**) da atividade pró-inflamatória induzida pela fração FD em ratos. A resposta pró-inflamatória foi avaliada pelo aumento na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal dos animais. Foi utilizada uma dose de 5mg/cav i,p para o ensaio curso-temporal. No ensaio dose-resposta, a resposta pró-inflamatória foi avaliada quatro horas depois da administração de FD. Os valores são expressos como média ± E.P.M. (*n=5*). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ indicam diferença estatística comparados ao grupo controle salina (1 ml de salina estéril/cavidade) (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

Uma dose de 0,64 mg de FD administrado na cavidade peritoneal do animal (1.267 ± 142,3 x 10^3 neutrófilos/ml) é capaz de induzir migração de neutrófilos de modo estatisticamente significante quando comparado ao grupo controle (691 ± 122,8 x 10^3 neutrófilos/ml) (FIGURA 8 - B).

Com o intuito de investigar o mecanismo pelo qual FD induz resposta pró-inflamatória, animais foram tratados com diferentes fármacos moduladores da atividade inflamatória. Dentre os cinco fármacos testados, Dexametasona (859,1 ± 85,3 x 10^3 neutrófilos/ml), Talidomida (876 ± 146,4 x 10^3 neutrófilos/ml) e Meclizina (731 ± 83,6 x 10^3 neutrófilos/ml) foram capazes de diminuir de modo significativo a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais induzida por FD (1.503 ± 138,3 x 10^3 neutrófilos/ml) (FIGURA 9).

Posteriormente, as três frações obtidas do látex de *Calotropis procera* (PL, B e FD) também foram avaliadas quanto a habilidade de inibir a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de animais induzida pela administração de carragenina. O tratamento prévio dos animais com as frações PL ou borracha (B) reduziu em mais de 70 % a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal dos animais, o que não foi observado quando os animais foram previamente tratados com FD (FIGURA 10).

A Figura 11 - A mostra que a administração de carragenina induziu intensa migração de neutrófilos (6.818 ± 138,3 x 10^3 neutrófilos/ml) quando comparados ao grupo controle (1.022 ± 85.7 x 10^3 neutrófilos/ml). A atividade antiinflamatória promovida pela fração PL foi completamente abolida quando submetida a 100 ºC por mais de 15 minutos (4.085 ± 98,7 x 10^3 neutrófilos/ml) (FIGURA 11 - A) ou quando submetida à digestão proteolítica por pronase (4.176 ± 129 x 10^3 neutrófilos/ml) (FIGURA 11 – B).

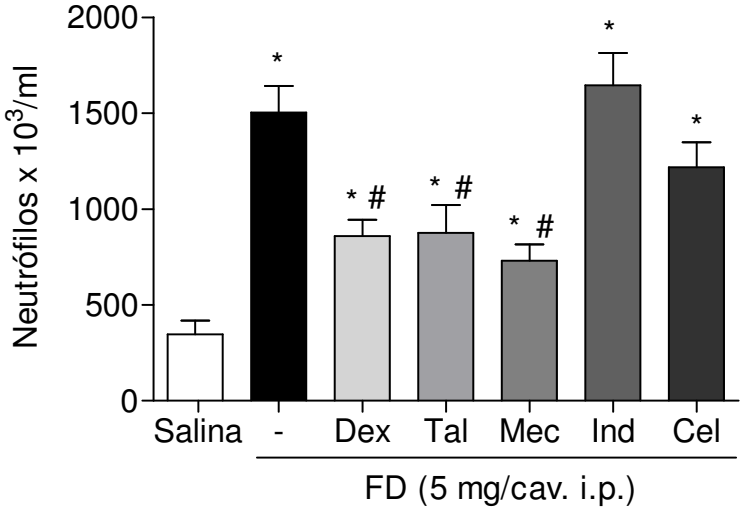

FIGURA 9**.** Efeito de bloqueadores farmacológicos na migração de neutrófilos induzida por FD. A capacidade do fármaco inibir a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal dos ratos induzida pela administração de FD foi avaliada. Os valores são expressos como média ± E.P.M. (*n=5*). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo controle salina (1 ml de salina estéril/cavidade) e # $p < 0,05$ comparado com animais tratados com FD sem tratamento prévio (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni). Dex: Dexametasona; Tal: Talidomida; Mec: Meclizina; Ind: Indometacina; Cel: Celecoxib.

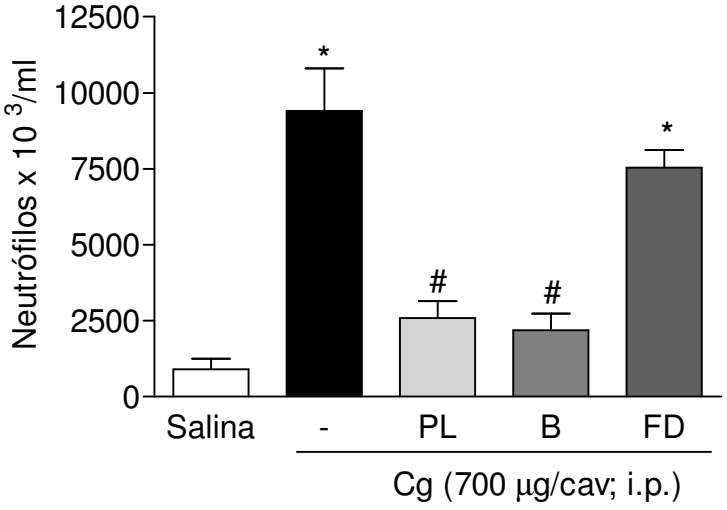

FIGURA 10**.** Avaliação da atividade antiinflamatória das frações do látex de *Calotropis procera*. As frações do látex (10 mg/kg) foram administradas por via endovenosa nos ratos. A resposta antiinflamatória foi avaliada pela diminuição no número de neutrófilos na cavidade peritoneal dos animais induzida pela administração de carragenina (Cg). Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (*n=5*). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo controle salina (1 ml/cavidade intraperitoneal) e # $p < 0,05$ comparado aos animais que receberam Cg sem prévio tratamento (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

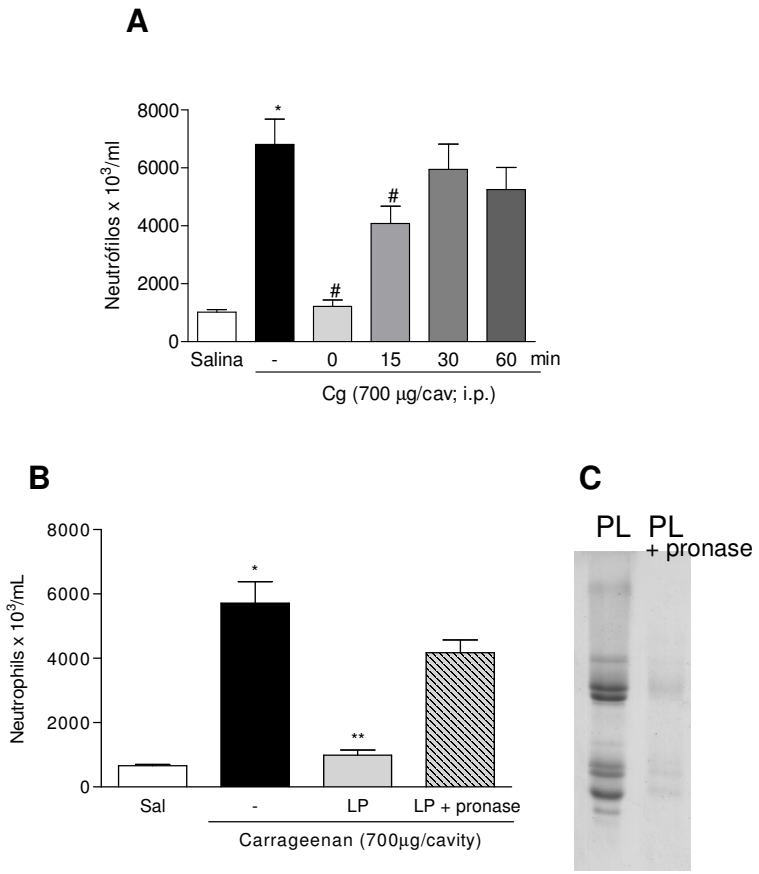

FIGURA 11**.** Efeito antiinflamatório da fração PL do látex de *Calotropis procera* submetida a tratamento térmico ou enzimático com pronase. PL (10 mg/Kg) foi aquecido por 15, 30 ou 60 minutos a 100º C (**A**) ou submetida a tratamento com pronase durante 24 horas antes da administração por via endovenosa nos ratos (**B**). Os valores são expressos como média ± E.P.M. (*n=5*). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo controle salina, # $p < 0,05$ comparado aos animais que receberam Cg sem prévio tratamento (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni). A digestão proteolítica de PL pelo tratamento por pronase foi observado por eletroforese em gel de poliacrilamida (**C**). 1: fração PL e 2: PL após tratamento com pronase. Foram aplicados 10 µl de uma solução 1 mg/ml de amostra por poço.

A perda da atividade antiinflamatória promovida pela fração PL foi acompanhada da digestão das proteínas, como observado por eletroforese em gel de poliacrilamida (FIGURA 11 – C). Também foi observado que a atividade antiinflamatória promovida pela fração PL não foi alterada quando submetida à precipitação com acetona gelada durante 12 horas antes da administração nos animais (FIGURA 12 – A). Ensaio positivo para atividade do tipo protease cisteínica na fração PL precipitada por acetona mostra que este procedimento não promoveu perda da integridade das atividades biológicas promovida pela fração (FIGURA 12 – B).

Depois de observado que a atividade pró-inflamatória do látex de *C. procera* está presente na fração FD, a fração PL foi desafiada reverter a resposta pró-inflamatória promovida por esta fração (FIGURA 13). A administração da fração PL por via endovenosa nos ratos foi capaz de inibir de modo significativo a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal dos animais induzida pela fração FD (Salina 401,2 ± 62,3 x 10^3; FD 2.847 ± 218 x 10^3; PL 576 ± 84,3 x 10^3 neutrófilos/ml).

Em ensaio de detecção imunológica, anticorpos policlonais produzidos em coelho contra a fração PL não detectaram proteínas pertencentes a fração PL na fração FD, como previsto (FIGURA 14 - A). Por outro lado, foi interessante observar que anticorpos Anti-PL foram capazes de detectar PL na fração B (FIGURA 14 - B). Estes resultados mostram que as atividades pró-inflamatória e antiinflamatória observadas no látex de *C. procera* são promovidas por moléculas distintas.

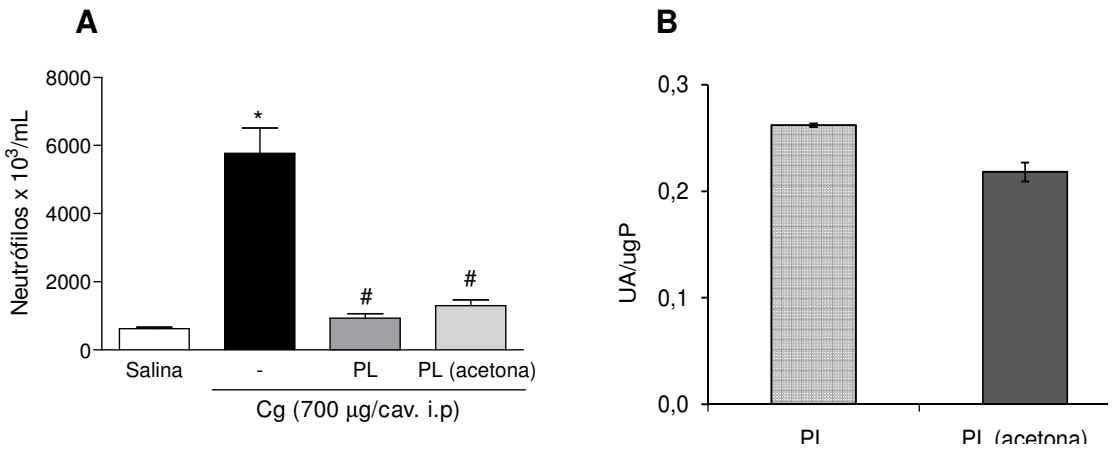

FIGURA 12**.** Atividade antiinflamatória e proteolítica do tipo cisteína da fração PL do látex de *Calotropis procera* submetida à precipitação com acetona. PL (10 mg/kg) submetida à precipitação com acetona durante 12 horas foi administrada por via endovenosa nos ratos (**A**). A resposta antiinflamatória foi avaliada pela diminuição no número de neutrófilos na cavidade peritoneal dos animais induzida pela administração de carragenina. Valores são expressos como média ± E.P.M (*n=5*). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparada com o grupo salina e # $p < 0,05$ comparado aos animais que receberam carragenina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni). A manutenção da atividade proteolítica do tipo cisteínica foi investigada em PL após precipitação com acetona, utilizando BANA como substrato (**B**).

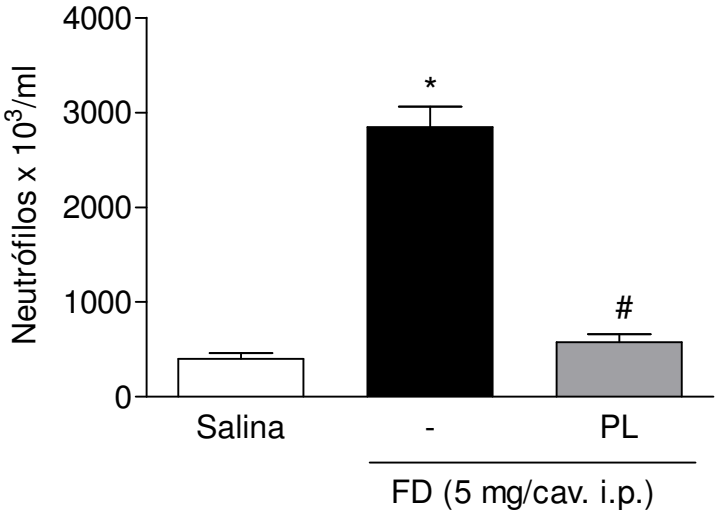

FIGURA 13**.** Avaliação da capacidade da fração PL inibir a resposta inflamatória induzida pela administração de FD na cavidade peritoneal de ratos. A inibição do evento pró-inflamatório induzido por FD foi avaliado pela capacidade da fração PL (10 mg/kg) inibir a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal dos ratos. Valores são expressos como média ± E.P.M. (*n=5*). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo controle salina e # $p < 0,05$ comparado aos animais tratados com FD sem tratamento prévio (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

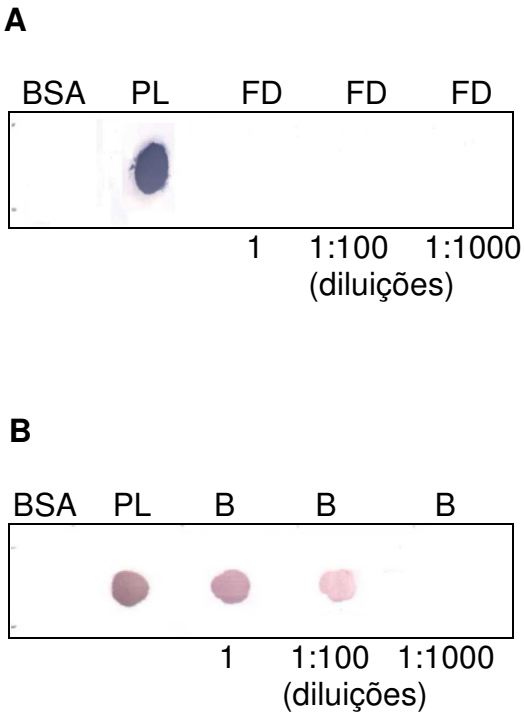

FIGURA 14**.** Detecção imunológica de proteínas da fração PL nas frações FD e B do látex de *C. procera* utilizando soro Anti-PL produzidos em coelho. **A** e **B** mostram resultado da detecção imunológica de Anti-PL (1:5000 v/v) em FD (2µl – 50 mg/ml) e na fração B (2µl – 10 mg/ml), respectivamente. BSA (5µl – 1 mg/ml) foi utilizada como controle para interação inespecífica do anticorpo.

A que a atividade antiinflamatória promovida pela fração B pode estar relacionada a presença de proteínas da fração PL que co-precipitaram com a borracha durante a etapa de centrifugação do látex.

Proteínas solúveis não foram detectadas nos extratos etanólicos obtidos após a extração das frações PL e FD. A extração de 1 g de PL gerou uma massa seca de 1 mg enquanto que a extração de 1 g de FD gerou uma massa de 90 mg. Neste, foi evidenciada a presença de compostos com cadeias carbônicas insaturadas. O perfil obtido para o produto da extração da fração PL com etanol não detectou a presença de nenhum composto químico (Dados não mostrados). Picos referentes à presença de proteínas solúveis não foram detectadas nos extratos etanólicos de ambas as frações.

Objetivando avançar na identificação da proteína envolvida na atividade antiinflamatória e antinociceptiva promovida pelo látex, a fração PL foi aplicada em uma coluna de troca iônica (CM-Sepharose Fast Flow) previamente equilibrada com tampão acetato pH 5,0. Este procedimento gerou três novas sub-frações que foram obtidas após eluição da coluna com tampão acetato pH 5,0 (PI) seguido da lavagem da coluna com tampão contendo NaCl 0,2 M (PII) e NaCl 0,3M (PIII) (FIGURA 15). O perfil protéico das três novas frações cromatográficas foi avaliado por eletroforese unidimensional (FIGURA 15 - B) e bidimensional (FIGURA 16).

A fração PL apresenta proteínas com massa molecular variando dede 14 kDa a 97 kDa e proteínas com ponto isoelétrico variando em grande intervalo de pH (3-10) (FIGURA 16 – A).

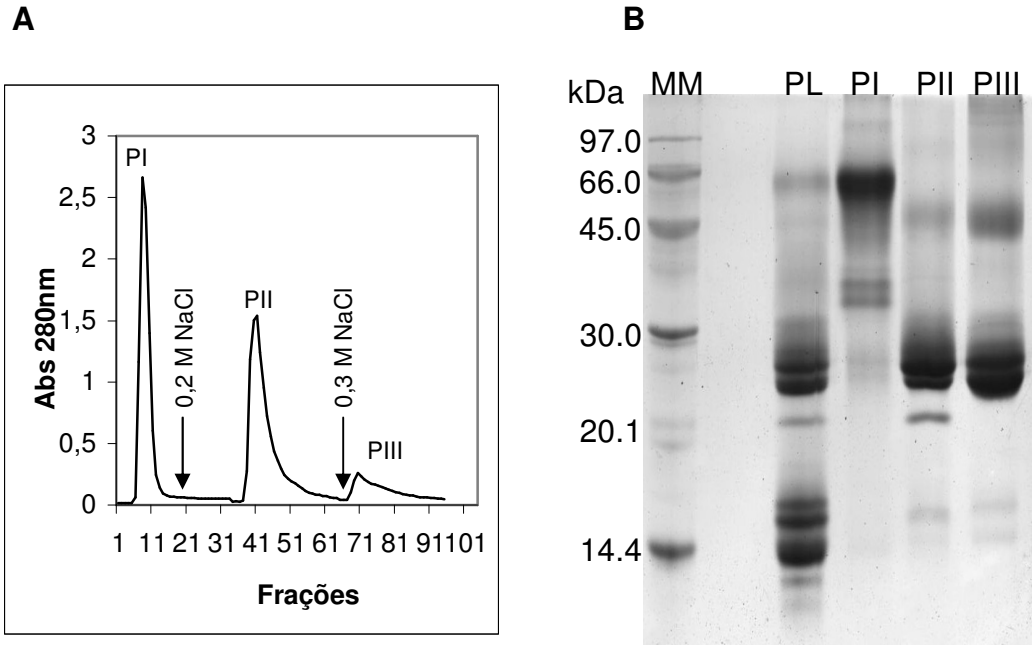

FIGURA 15. Fracionamento e eletroforese de proteínas do latex de *C. procera*. Cromatografia de troca iônica da fração PL em coluna de CM-Sepharose Fast Flow em pH 5,0 (**A**). O perfil protéico das três novas frações (PI, PII e PIII) obtidas foi avaliado por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (**B**). MM - Marcadores de massa molecular (Full Range Rainbow – RPN800 – Amersham Biosciences). Foram aplicados 5µg de cada fração por poço.

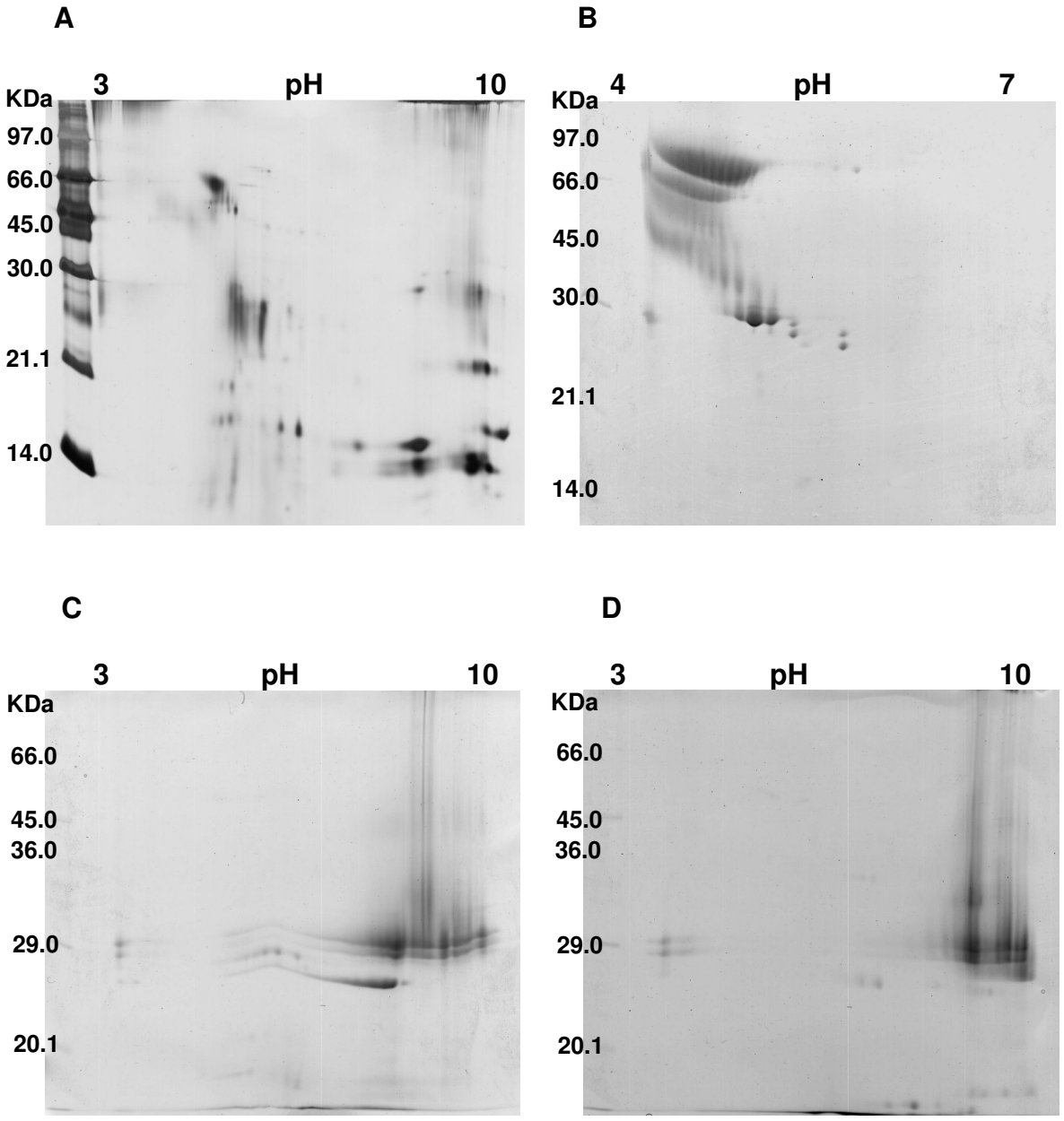

FIGURA 16. Eletroforese bidimensional de proteínas do látex de *C. procera*. A fração PL (**A**) PI (**B**), PII (**C**) e PIII (**D**) foram avaliadas quando ao perfil protéico através de eletroforese bidimensional utilizando intervalos de pH variando de 3 a 10 ou 4 a 7.

PI possui proteínas com ponto isoelétrico (pI) distribuídas em intervalo de pH inferior a 5, enquanto PII e PIII apresentaram proteínas com pI em intervalo de pH básico (FIGURA 16). Através das análises das eletroforeses unidimensionais e bidimensionais, foi possível observar que o PI apresenta conteúdo protéico distinto do PII e PIII, evidenciado pelas diferenças observadas nos seus padrões de migração em gel de poliacrilamida.

As três sub-frações protéicas foram avaliadas quanto a presença de atividade antiinflamatória. Para tanto, estas foram administradas nos animais por via endovenosa 30 minutos antes da injeção de carragenina por via intraperitoneal. A contagem de leucócitos a partir do lavado peritoneal dos animais mostrou que os três picos obtidos após etapa cromatográfica foram capazes de diminuir a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal dos ratos (FIGURA 17), sendo o PI mais potente (Cg 5.398 ± 119,2 x 10^3; PI 823 ± 148,8 x 10^3; PII 2.551 ± 84,3 x 10^3; PIII 2.449 ± 123,3 x 10^3 neutrófilos/ml).

A administração de carragenina induz aumento no número de leucócitos nas fases de rolamento (Salina 6,4 ± 1,0; Cg 44,6 ± 3,4 leucócitos/min) e adesão (Salina 0,16 ± 0,07; Cg 2,12 ± 0,35 leucócitos/10µm²) (FIGURAS 19 e 20). Ensaio de microscopia intravital revelou que tanto PI como PII e PIII inibem o rolamento (PI 3,2 ± 0,70; PII 14,9 ± 1,6; PIII 20,8 ± 3,7 leucócitos/min) e a adesão (PI 0,67 ± 0,19; PII 0,79 ± 0,11; PIII 0,93 ± 0,16 leucócitos/10µm²) leucocitária no mesentério de camundongos (FIGURAS 18 e 19). Análise nos níveis de óxido nítrico no plasma sanguíneo de animais tratados com PL e sub-frações cromatográficas foi observado que PL induz produção de NO nos animais (Salina 16,1 ± 2,6; PL 40,4 ± 3,5 NO_3/NO_2 µM) (FIGURA 20 - A).

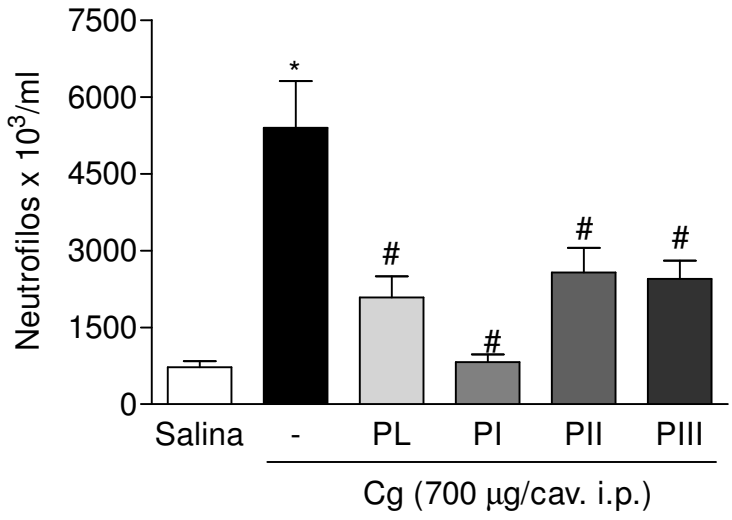

FIGURA 17**.** Avaliação da atividade antiinflamatória das frações cromatográficas obtidas após aplicação da fração PL em coluna de CM-Sepharose Fast Flow. As sub-frações de PL (10 mg/kg) foram administradas por via endovenosa nos ratos. A resposta antiinflamatória foi avaliada pela diminuição no número de neutrófilos na cavidade peritoneal dos animais induzida pela administração de carragenina. Valores são expressos como media ± E.P.M (*n=5*). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparada com o grupo salina e # $p <0,05$ comparado com animais que receberam carragenina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

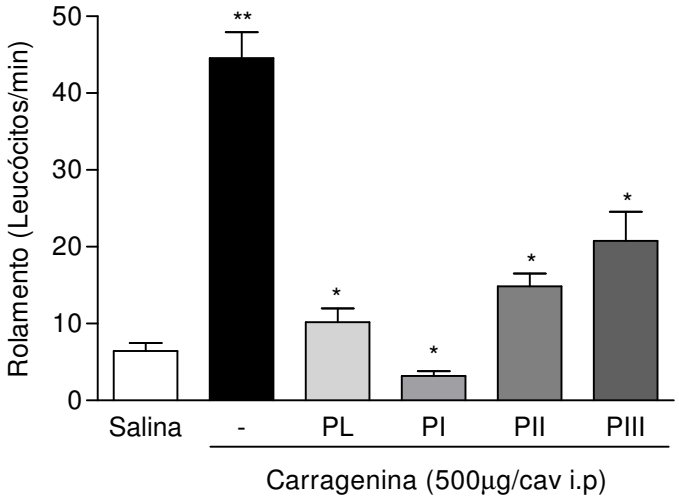

FIGURA 18**.** Microscopia intravital revela que proteínas látex de *C. procera* inibem o rolamento de leucócitos induzido por carragenina. Animais receberam 10 mg/kg das frações por via endovenosa. Valores são expressos como média ± E.P.M (*n=5*). ** $p < 0,05$ indica diferença estatística comparada com o grupo salina, * $p < 0,05$ comparado com animais que receberam Cg (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

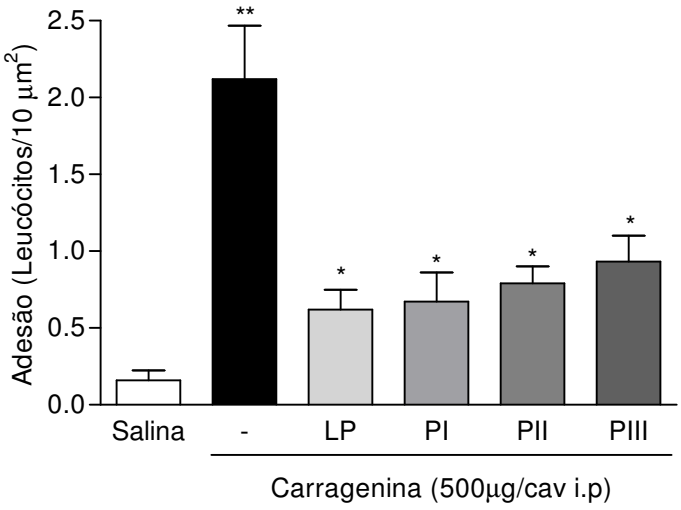

FIGURA 19. Microscopia intravital revela que proteínas látex de *C. procera* inibem a adesão de leucócitos induzido por carragenina. Animais receberam 10 mg/kg das frações por via endovenosa. Valores são expressos como média ± E.P.M (*n=5*). ** $p < 0,05$ indica diferença estatística comparada com o grupo salina, * $p < 0,05$ comparado com animais que receberam Cg (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

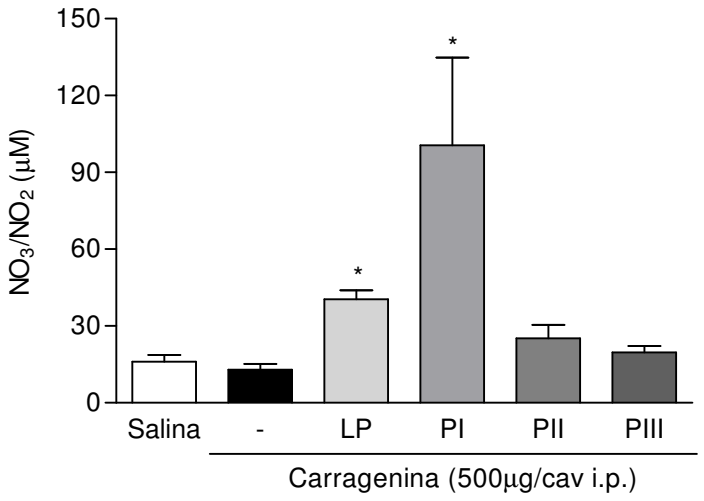

FIGURA 20**.** Efeito de proteínas do látex de *C. procera* na concentração de óxido nítrico (NO_3/NO_2) no soro de camundongos. Dose de 10 mg/kg das diferentes amostras (PL, PI, PII, PIII) foi utilizado para o ensaio. Valores são expressos como media ± E.P.M (*n=5*). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparada com o grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

PI induziu intensa produção de NO (100,6 ± 34,23 NO_3/NO_2 µM), enquanto PII (25,2 ± 5,0 NO_3/NO_2 µM) e PIII (19,7 ± 2,6 NO_3/NO_2 µM) não promoveram alterações significantes na sua produção (FIGURA 20).

As três sub-frações cromatográficas, detentores de atividade antiinflamatória, também foram desafiados inibir a atividade pró-inflamatória induzida pela administração de FD na cavidade peritoneal de ratos. Foi observado na FIGURA 21, somente o PI foi capaz de diminuir a migração de neutrófilos de modo estatisticamente significante.

O envolvimento de proteases cisteínicas presentes na fração PL também foi investigado. Para tanto, PL foi obtido após coleta do látex de *C. procera* em água destilada contendo iodoacetamida (IAA) e avaliado quanto a presença de atividade antiinflamatória nos ratos (FIGURA 22 – A). Inibição superior a 95 % da atividade proteolítica do tipo cisteínica foi observada na fração PL coletada na presença de IAA, por outro lado, a atividade antiinflamatória desempenhada por PL não foi alterada (FIGURA 22 – B).

Mais adiante, PI, PII e PIII também foram investigados quanto a presença de atividade antinociceptiva em camundongos. Assim como observado para a atividade antiinflamatória, os picos cromatográficos foram igualmente capazes de inibir as contorções abdominais induzidas por ácido acético em valores superiores a 70 % (TABELA 1). Os resultados foram estatisticamente semelhantes aos de animais que receberam morfina, um fármaco utilizado como padrão para atividade antinociceptiva.

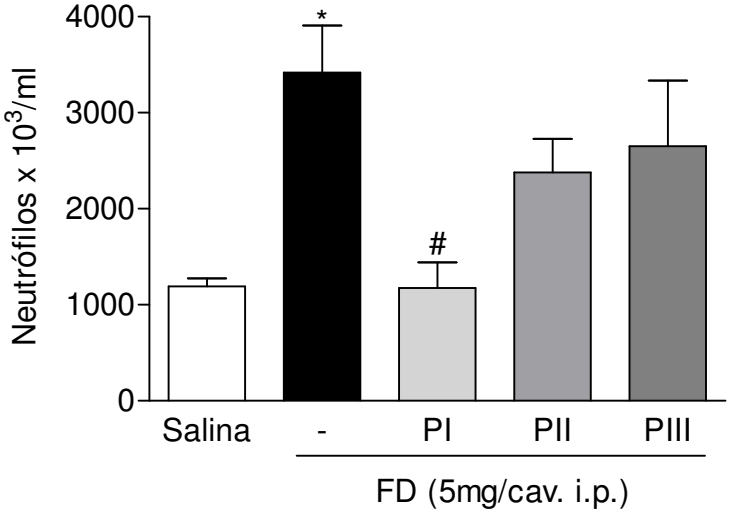

FIGURA 21. Avaliação da atividade antiinflamatória de sub-frações cromatográficas da fração PL contra resposta pró-inflamatória induzida pela administração de FD na cavidade peritoneal de ratos. A inibição do evento pró-inflamatório induzido por FD foi avaliado pela capacidade dos picos (PI, PII, PIII) inibirem a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal dos ratos. Valores são expressos como media ± E.P.M (*n=5*). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparada com o grupo salina, # $p < 0,05$ comparado com animais que receberam FD (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

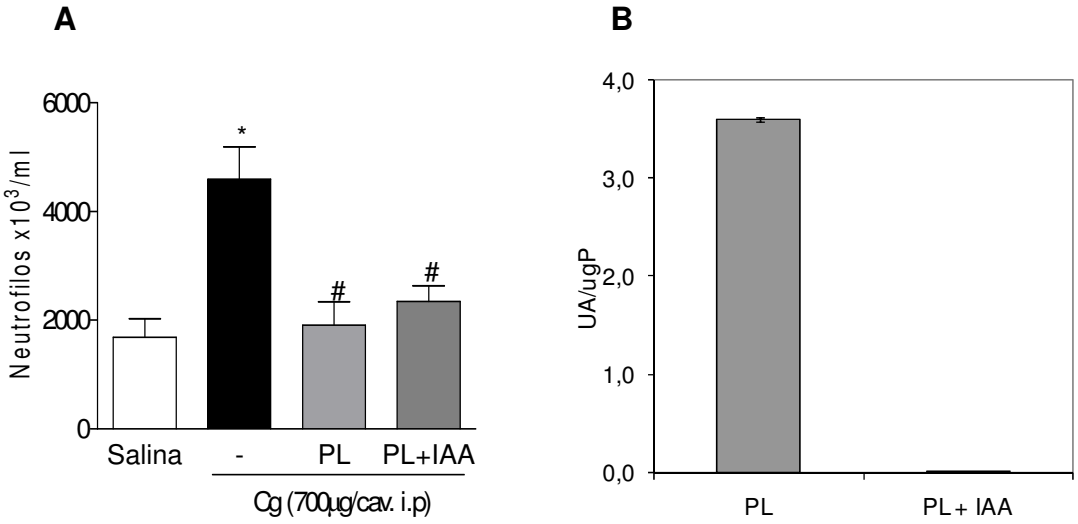

FIGURA 22. Estudo do envolvimento de proteases do tipo cisteínica na atividade antiinflamatória promovida pelo látex de *Calotropis procera.* O PL (10 mg/kg) obtido após coleta do látex em solução contendo iodoacetamida (IAA) foi avaliado quanto a presença de atividade antiinflamatória. A resposta antiinflamatória foi avaliada pela diminuição no número de neutrófilos na cavidade peritoneal dos animais induzida pela administração de carragenina. Valores são expressos como média ± E.P.M (*n=5*). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparada com o grupo salina e # $p < 0,05$ comparado aos animais que receberam carragenina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni). Confirmação da inibição da atividade proteolítica do tipo cisteínica foi investigada em PL coletado em água contendo IAA, utilizando BANA como substrato (**B**).

TABELA 1 - Efeito antinociceptivo de sub-frações cromatográficas de PL (PI, PII e PIII) sobre contorções abdominais induzida por ácido acético em camundongos.

Grupo		N.º de contorções	Inibição (%)
Controle (NaCl 0,9%)		21,5 ± 0,8	-
Morfina	5mg/kg	2,2 ± 0,5[a]	90
PL	5 mg/kg	3,0 ± 1,0[a]	86
	12,5 mg/kg	2,3 ± 0,4[a]	89
	50 mg/kg	1,5 ± 0,2[a]	93
PI	5 mg/kg	4,6 ± 1,9[a]	79
	12,5 mg/kg	4,4 ± 0,5[a]	80
	50 mg/kg	2,6 ± 0,6[a]	88
PII	5 mg/kg	2,5 ± 0,9[a]	88
	12,5 mg/kg	1,9 ± 0,4[a]	91
	50 mg/kg	0,6 ± 0,2[a]	97
PIII	5 mg/kg	6,2 ± 2,0[a]	71
	12,5 mg/kg	6,4 ± 1,7[a]	70
	50 mg/kg	1,6 ± 0,4[a]	93

Valores são expressos com média ± E.P.M. para o número de animais mostrados entre parênteses. [a] $p < 0,001$ indica diferença estatística comparado ao respectivo controle salina. (ANOVA seguido pelo teste de Student–Neuman–Keuls).

Concomitante à identificação das proteínas envolvidas nas atividades antiinflamatória e antinociceptiva do látex de *C. procera*, experimentos foram conduzidos objetivando a detecção da atividade antiinflamatória quando PL era administrado por via oral nos ratos. A fração PL foi administrada por via oral em animais em jejum, 1 hora antes de receberem o estímulo inflamatório por via intraperitoneal. Vários experimentos realizados, entretanto, em nenhum a fração PL foi capaz de diminuir a migração de neutrófilos induzida por carragenina (FIGURA 23).

Nem mesmo quando doses de 1000 mg/kg da fração PL em solução salina contendo 1 % de amido (FIGURA 23 – A) ou o látex *in natura* (o sobrenadante obtido após centrifugação do látex integro – compreendendo as frações PL e FD) (FIGURA 23 – B) foram capazes de reduzir a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal dos animais.

Por fim, animais que receberam doses 5000 mg/kg de PL por via oral não apresentaram toxicidade aguda ou comportamentais ou fisiológicas durante 72 horas de observação.

O resumo dos resultados com as frações do látex obtidas no presente trabalho são sumarizados na TABELA 2.

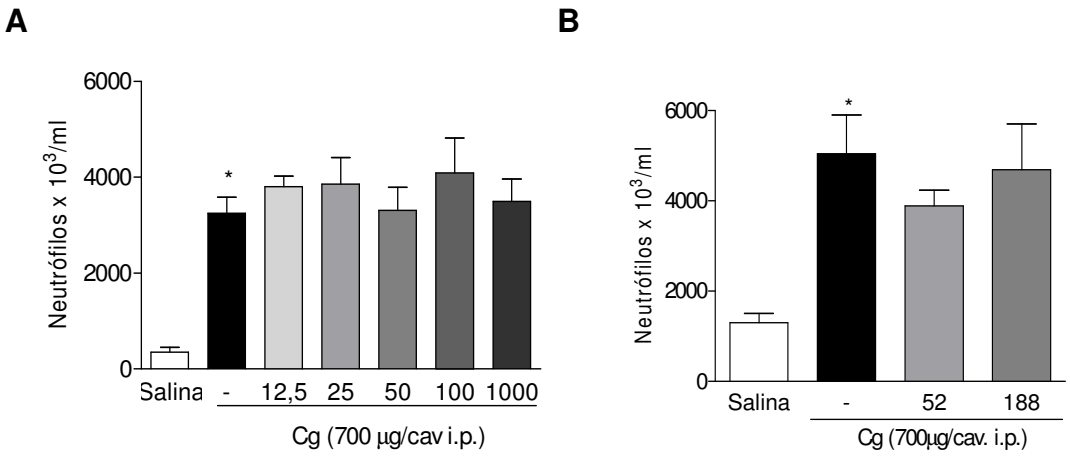

FIGURA 23. Avaliação da atividade antiinflamatória da fração PL do látex de *C. procera* quando administrada por via oral em ratos. **A**: diferentes doses da fração PL; **C**: látex *in natura* - sobrenadante obtido após centrifugação do látex compreendendo as frações PL e FD. Em todos os ensaios as amostras foram administradas por via oral a animais em jejum, 1 hora antes da injeção do estímulo inflamatório. Valores são expressos como media ± E.P.M (*n=5*). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparada com o grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

TABELA 2. Resumo dos resultados obtidos no presente trabalho

Material (Látex)	**Via de Administração**	**Modelo experimental**	**Dose**	**Agente Inflamatório**	**Resultados Obtidos**
Fração PL	Intraperitoneal	Peritonite	5 mg/kg	-	Não apresentou atividade pró-inflamatória
Fração B	Intraperitoneal	Peritonite	5 mg/kg	-	Não apresentou atividade pró-inflamatória
Fração FD	Intraperitoneal	Peritonite	5 mg/kg	-	Pró-ínflamatório
Fração PL	Endovenosa (30 minutos antes do estímulo inflamatório)	Peritonite	5 mg/kg	Carragenina (500 µg/cav. i.p) ou FD (5mg/cav i.p.)	Antiinflamatória
Fração B	Endovenosa (30 minutos antes do estímulo inflamatório)	Peritonite	5 mg/kg	Carragenina (500 µg/cav. i.p)	Antiinflamatória
Fração FD	Endovenosa (30 minutos antes do estímulo inflamatório)	Peritonite	5 mg/kg	Carragenina (500 µg/cav. i.p)	Não apresentou atividade antiinflamatória
PI PD10 (25 ºC)	Intraperitoneal	Peritonite	5 mg/kg	-	Pró-ínflamatório
PI PD10 (100 ºC)	Intraperitoneal	Peritonite	5 mg/kg	-	Pró-ínflamatório
Fração FD digerida por pronase	Intraperitoneal	Peritonite	5 mg/kg	-	Não apresentou atividade pró-inflamatória
Dex, Tal, Mec, Ind, Cel	Intraperitoneal	Peritonite	4 a 30 mk/kg	FD (5mg/cav.ip)	Dex, Tal e Mec – inibiram a migração de neutrófilos

TABELA 2. (Continuação).

Material (Látex)	**Via de Administração**	**Modelo experimental**	**Dose**	**Agente Inflamatório**	**Resultados Obtidos**
Fração PL aquecida 100 ºC	Endovenosa (30 minutos antes do estímulo inflamatório)	Peritonite	10 mg/kg	Carragenina (500 µg/cav. i.p)	Atividade antiinflamatória foi perdida após 30 minutos de aquecimento
Fração PL tratado com pronase	Endovenosa (30 minutos antes do estímulo inflamatório)	Peritonite	10 mg/kg	Carragenina (500 µg/cav. i.p)	Não apresentou atividade pró-inflamatória
Fração PL precipitada com acetona	Endovenosa (30 minutos antes do estímulo inflamatório)	Peritonite	10 mg/kg	Carragenina (500 µg/cav. i.p)	Antiinflamatória
Sub-frações cromatográficas (PI, PII e PIII)	Endovenosa (30 minutos antes do estímulo inflamatório)	Peritonite	10 mg/kg	Carragenina (500 µg/cav. i.p)	Antiinflamatória
Sub-frações cromatográficas (PI, PII e PIII)	Endovenosa (30 minutos antes do estímulo inflamatório)	Microscopia Intravital	10 mg/kg	Carragenina (500 µg/cav. i.p)	Inibição do rolamento e adesão leucocitários
Sub-frações cromatográficas (PI, PII e PIII)	Endovenosa (30 minutos antes do estímulo inflamatório)	Dosagem de NO no soro	10 mg/kg	FD (5mg/cav.ip)	Somente PI induziu produção de óxido nítrico
Sub-frações cromatográficas (PI, PII e PIII)	Endovenosa (30 minutos antes do estímulo inflamatório)	Peritonite	10 mg/kg	FD (5mg/cav.ip)	Somente PI foi antiinflamatório

TABELA 2. (Continuação).

Material (Látex)	**Via de Administração**	**Modelo experimental**	**Dose**	**Agente Inflamatório**	**Resultados Obtidos**
Fração PL inibido com iodoacetamida	Endovenosa (30 minutos antes do estímulo inflamatório)	Peritonite	10 mg/kg	Carragenina (500 µg/cav. i.p)	Antiinflamatória
Fração PL	Oral (em solução contendo 1 % de amido 1 hora antes do estímulo inflamatório)	Peritonite	12,5 a 1000mg/kg	Carragenina (500 µg/cav. i.p)	Não apresentou atividade antiinflamatória
Látex coletado em água (1:1; v/v) e centrifugado (*In natura*)	Oral (1 hora antes do estímulo inflamatório)	Peritonite	52 e 188 mg/kg	Carragenina (500 µg/cav. i.p)	Não apresentou atividade antiinflamatória
Látex coletado em água (1:1; v/v) e centrifugado (*In natura*)	Oral (1 hora antes do estímulo inflamatório)	Peritonite	52 e 188 mg/kg	Carragenina	Não apresentou atividade antiinflamatória

VI - DISCUSSÃO

A planta *Calotropis procera* é bastante conhecida por apresentar diversas propriedades farmacológicas (KIRTIKAR & BASU, 1935). Extratos das diversas partes da planta são amplamente utilizados com objetivo de cura ou atenuação de desconfortos provocados por diversas enfermidades (SHARMA & SHARMA, 1999). Dentre a variedade de atividades relatadas relacionadas à planta, atividade pró-inflamatória bem como antiinflamatória são mostradas em extratos obtidos a partir de uma preparação íntegra do látex (KUMAR & BASU, 1994; SINGH *et al*., 2000; YATIN *et al*., 2004). Estas atividades antagonistas, pró- e antiinflamatória, parecem ter uma relação intrínseca com a via de administração desta preparação do látex nos animais (SINGH *et al*., 2000; SANGRAULA *et al*., , 2002). Esta mesma preparação do látex também é citada por apresentar atividade antinociceptiva (DEWAN *et al*., 2000).

Recentemente, dois trabalhos foram publicados pelo nosso grupo de pesquisa, mostrando que a atividade antiinflamatória e antinociceptiva desempenhadas pelo látex de *C. procera* estão presentes em uma fração rica em proteínas e ausente em borracha e compostos de massa molecular superior a 8.000 Da (ALENCAR *et al*., 2004; SOARES *et al*., 2005). Estes foram os primeiros trabalhos publicados sugerindo o envolvimento de proteínas na resposta antiinflamatória e antinociceptiva promovida pelo látex de *C. procera*.

No presente trabalho, o fluido laticífero da planta *C. procera* foi fracionado para obtenção de amostras mais purificadas. Estas foram avaliadas

quanto a presença das atividades pró- e antiinflamatória e experimentos foram realizados para caracterizar o mecanismo pelo qual as frações promovem os eventos observados. Paralelamente, experimentos foram conduzidos para identificar as proteínas envolvidas na atividade antiinflamatória e antinociceptiva.

A fração FD, recuperada da etapa de diálise deve ser constituída de sais, compostos com massa molecular inferior a 8.000 Da, bem como cardenolídeos ativos que são bem conhecidos no látex de *C. procera* (DEWAN *et al*., 2000). Em nossos experimentos, a fração FD foi a única dentre as três frações obtidas do látex que induziu intensa migração de neutrófilos para cavidade peritoneal dos aniamis. Apesar da atividade pró-inflamatória ter sido detectada na fração mesmo após tratamento térmico (30 minutos a 100 ºC), o envolvimento de peptídeos na inflamação induzida pela fração não foi completamente descartado já que atividade pró-inflamatória promovida por FD foi reduzida significativamente quando esta foi submetida a tratamento enzimático com pronase, uma protease obtida de *Streptomyces griseus* que hidrolisa ligações peptídicas de modo inespecífico.

RAMOS e colaboradores (2006) analisaram a fração FD através de cromatografia de filtração em gel em uma coluna SuperDex Peptide HR, utilizada para separar peptídeos com massa molecular variando entre 100 e 7.000 Da. Neste procedimento, quatro picos foram recuperados e a análise de aminoácidos destes confirmou a presença de peptídeos. Diante do exposto, os resultados sugerem fortemente que peptídeos também podem estar envolvidos na resposta pró-inflamatória promovida pela fração FD.

Plantas como *Tamus communis* (uva-de-cão) e *Urtica urens* (urtiga) são conhecidas por conter moléculas tipo-histamina e ambas são descritas por induzirem irritação e eventos pró-inflamatórios (SCHMIDT & MOULT, 1983; CZARNETZKI *et al.*, 1990). SHARMA & KUMAR (2003) detectaram histamina em uma preparação obtida a partir do látex íntegro de *Calotropis* procera. Em ensaio *in vitro* foi observado aumento na liberação de histamina por mastócitos na presença do látex. Estes eventos podem explicar a presença de atividade pró-inflamatória do látex de *C. procera*.

Depois de observado que a atividade pró-inflamatória presente no látex de *C. procera* é desempenhada por moléculas presentes na fração FD, esta atividade avaliada utilizando fármacos cujos mecanismos de ação já são bem conhecidos. Dentre as drogas testadas, Dexametasona (um glicocorticóide), Talidomida (inibidor seletivo de TNF-α), Meclizina (antagonista de receptores H1 de histamina) promoveram uma diminuição da resposta pró-inflamatória promovida por FD, a qual não foi alterada por Indometacina (inibidor inespecífico da cicloxigenase) e Celecoxib (inibidor seletivo de COX-2). Estes achados corroboram com resultados obtidos por SINGH e colaboradores (2000); SHARMA & KUMAR (2003); YATIN e colaboradores (2004) e KUMAR & SEHGAL (2007) que relatam o envolvimento de mediadores do tipo histamina, TNF-α na resposta pró-inflamatória promovida pelo látex de *C. procera*.

No que diz respeito à atividade antiinflamatória, as frações PL e B, mas não FD, inibiram de modo significativo a migração de neutrófilos induzida por carragenina. Em ensaio imunológico utilizando anticorpos produzidos contra a fração PL, proteínas pertencentes a fração PL não foram encontradas na

fração FD, confirmando que as atividades pró- e antiinflamatória são realmente promovidas por moléculas distintas. É importante ressaltar que este foi o primeiro trabalho relatando que as atividades antagonistas presentes no látex de *C. procera* são promovidas por frações distintas.

A fração B é insolúvel em água, portanto, apenas o sobrenadante obtido após sua maceração em salina estéril era administrado por via endovenosa nos animais. Quando as frações PL e B foram avaliadas por eletroforese, foi observada uma grande semelhança no perfil protéico em ambas as frações, sugerindo que as proteínas presentes na fração B são parte integrante da fração PL e que co-precipitaram com a borracha durante a etapa de centrifugação do látex. Esta afirmativa foi reforçada após realização de ensaio imunológico, onde anticorpos policlonais produzidos contra PL detectaram proteínas pertencentes à fração PL na borracha (B).

O fenômeno de co-precipitação de proteínas com a borracha também é observado no látex de *Hevea brasiliensis*. Um grande número de trabalhos já constatou que materiais derivados do látex de *Hevea* induzem alergia e que a causa não seria originada da borracha, mas de proteínas do látex aprisionadas (SUSSMAN *et* al., 2002; BINKLEY *et* al., 2003; CHAIEAR *et* al., 2006; BAYROU, 2006).

Os resultados obtidos mostram que a atividade antiinflamatória desempenhada pela fração PL é promovida proteínas. A atividade antiinflamatória foi completamente perdida quando PL foi aquecida por mais de 30 minutos a 100 ºC ou quanto foi submetida a tratamento enzimático com pronase durante 24 horas. Alguns trabalhos relatam a utilização de acetona em etapas bioquímicas para promover a precipitação de proteínas e remover

componentes solúveis em solventes orgânicos de amostras vegetais. (VASCONCELOS *et al.*, 2006). A partir desta informação, PL foi submetida à precipitação com acetona antes de ser administradas nos animais e a atividade antiinflamatória promovida pela fração PL permaneceu ativa. Em paralelo, ensaio proteolítico mostrou que o procedimento de precipitação não promoveu perda da natureza biológica da fração.

É interessante observar que quando a fração PL foi submetida à extração com etanol, 1000 mg de PL gerou 1 mg de massa seca de extrato etanólico, ou seja, uma massa mil vezes menor que a massa inicial. Se compararmos a proporção da massa administrada por via endovenosa que resposta antiinflamatória (10 mg/kg; aproximadamente 2 mg/animal) com a massa do extrato etanólico obtida a partir de 1000 mg de PL, temos para cada 2 mg de PL uma massa de 2 µg de compostos extraídos com etanol. Em vários trabalhos, o relato de atividade antiinflamatória bem como antinociceptiva é observado após administração de doses acima de 200 mg/kg de extratos etanólicos de partes de plantas (CASTARDO *et al.*, 2008; ZHOU, *et al.*, 2008; GUZZO, *et al.*, 2008). Quando analisamos estes dados e correlacionamos com a manutenção da atividade antiinflamatória de PL após precipitação com acetona e a perda desta após aquecimento e digestão proteolítica por pronase, fica evidente que as respostas biológicas observadas na fração PL são promovidas exclusivamente por proteínas.

Em outro momento, objetivando caracterizar o mecanismo pelo qual a fração PL promove atividade antiinflamatória, esta foi desafiada reverter a resposta pró-inflamatória induzida pela fração FD. A fração PL, detentora de forte atividade antiinflamatória, reduziu de modo significativo a migração de

neutrófilos para cavidade peritoneal de ratos induzida pela fração FD. A atividade antiinflamatória de PL contra a inflamação induzida pela fração FD corrobora com os resultados anteriormente publicados por AYRA & KUMAR (2005) que mostraram que a atividade antiinflamatória promovida pelo látex de C. *procera* foi capaz de inibir a ação pró-inflamatória induzida por indutores da liberação de histamina.

A fração rica em proteínas obtida a partir do protocolo experimental desenvolvido em nosso laboratório, foi aplicada em coluna de troca iônica em pH 5,0 e três sub-frações protéicas foram recuperadas. Estas foram avaliadas quanto à presença das atividades antiinflamatória e antinociceptiva, e os resultados obtidos foram surpreendentes. A pesar do conteúdo protéico das sub-frações (PI, PII e PIII) serem distintos entre si (por terem sido removidas da coluna de troca iônica a diferentes concentrações de NaCl e por apresentarem perfis protéicos diferentes como observado através de eletroforese), estas foram capazes de inibir a migração de neutrófilos induzida por carragenina em ratos, bem como as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos sendo o PI mais antiinflamatório. A ação antiinflamatória e antinociceptiva promovida pelas três sub-frações evidencia a participação de múltiplas proteínas nas atividades promovidas pela fração PL.

O rolamento e a adesão leucocitária são eventos que naturalmente ocorrem durante o estabelecimento da resposta inflamatória. Estes eventos se estabelecem em resposta a estímulos inflamatórios promovido pela ação de diferentes mediadores (MONTOVANI *et al*. 1997). A fração PL inibiu fortemente a migração de neutrófilos e inibiu o rolamento e a adesão leucocitária no mesentério de animais. As etapas de rolamento e a adesão leucocitária

ocorrem pela interação entre glicoconjugados presentes na superfície celular dos leucócitos e selectinas, proteínas que se ligam especificamente a carboidratos, encontradas nas membranas das células endoteliais (CRONSTEIN & WEISSMAN, 1993; FIGARELLA-BRANGER *et al*. 2003).

Algumas lectinas vegetais têm sido mencionadas inibir processos inflamatórios induzidos por carragenina. Estes estudos indicam que as lectinas inibem o influxo de neutrófilos para o local de inflamação por bloquearem de modo competitivo o sitio de ligação de selectinas (ASSREUY *et. al*., 1997; ALENCAR *et al*., 1999). Lectinas também são citadas por apresentar atividade antinociceptiva (NEVES *et al*., 2007; BITENCOURT *et al*., 2008). Embora não detectada atividade do tipo lectínica na fração PL em ensaios de hemaglutinação, isto não elimina a possibilidade de ocorrência de uma lectina com apenas um sítio de ligação a carboidratos já que proteínas ligantes a quitina foram observadas na fração PL do látex de *C. procera* (RAMOS *et al*., 2007). Além de que a proteína mais bem estudada no látex de *Hevea brasiliensis* é a heveína, uma lectina monomérica de apenas um sítio de ligação à carboidratos e que não aglutina eritrócitos (GIDROL *et al*., 1994).

Recentes publicações têm revelado que a bromelaina, uma mistura de proteases cisteínicas obtidas a partir do caule do abacaxi, é amplamente estudada por apresentar atividade antiinflamatória em modelos de inflamação crônica e aguda (HALE *et al*., 2005; SECOR *et al*., 2008; FITZHUGH *et al*., 2008; TOCHI *et al*., 2008). Nestes trabalhos, foi observado que a bromelaina age sobre alguns receptores de superfície celular dos leucócitos que são vitais para o processo de migração celular, inibindo assim as etapas de rolamento e adesão leucocitária (FITZHUGH *et al*., 2008). Sabendo que a fração PL do

látex de *C. procera* possui proteases do tipo cisteínica (FREITAS *et al*., 2007), a atividade antiinflamatória desempenhada pela fração PL pode estar relacionada a eventos semelhantes aos citados para bromelaina. Nesta vertente, atividade proteolítica do tipo cisteínica foi inibida no látex utilizando iodoacetamida. Entretanto, este procedimento não aboliu a atividade antiinflamatória da fração PL. Apesar da manutenção da atividade antiinflamatória, a possibilidade do envolvimento de proteases cisteínicas do látex nos eventos antiinflamatórios promovidos por PL não é completamente descartada. O PI, aqui mostrado ser detentor de potente atividade antiinflamatória, não apresenta atividade de proteases cisteínicas (OLIVEIRA *et al*., 2007). Desta forma, mesmo coletado em iodoacetamida PI atuaria como agente antiinflamatório. A atividade cisteínica observada em LP foi detectada nas sub-frações PII e PIII, o que poderia explicar o efeito antiinflamatório promovidos por estas.

Os resultados obtidos a partir da dosagem de óxido nítrico no plasma dos animais previamente tratados com as sub-frações cromatográficas foram bastante interessantes. Dentre as três sub-frações cromatográficas, somente PI induziu produção de óxido nítrico nos animais. Embora o mecanismo de ação do óxido nítrico ainda não seja completamente compreendido, foi observado que a produção excessiva de NO é acompanhada da inibição da migração de neutrófilos (IALENTI *et al*., 2000; PAUL-CLARK *et al*., 2001). Alguns trabalhos relatam que elevados níveis de NO no soro sanguíneo promove uma redução na expressão de moléculas de adesão envolvidas nas etapas de rolamento e adesão leucocitária modulando o processo de interação célula/endotélio (SPIECKER *et al*., 1998; PRUEFER *et al.,* 1999; KUBENS *et al*., 2001). Desta

forma, o PI apresentaria sua atividade antiinflamatória através da indução da produção de óxido nítrico nos animais, enquanto PII e PIII atuariam removendo proteínas de membranas envolvidas nas etapas de adesão e rolamento leucocitário. A produção de NO por proteínas do latex pode explicar a atividade antinociceptiva promovida por PI no modelo de contorções abdominais (ABRAMSON, 2008).

Quando as sub-frações foram desafiadas reverter a resposta inflamatória induzida pela fração FD, somente PI inibiu a migração de neutrófilos. Desta forma, fica evidente que múltiplas proteínas desempenham a atividade antiinflamatória do látex de *C. procera* e estas atuam em diferentes pontos do evento inflamatório, o que explica o alto potencial da fração PL como agente antiinflamatório.

Na quase totalidade dos trabalhos publicados, a atividade antiinflamatória e antinociceptiva do látex são observadas quando extrato aquoso e/ou orgânico, obtidos a partir de uma preparação íntegra, é administrado por via oral aos animais (TABELA 3) (KUMAR & BASU, 1994; MAJUMDAR & KUMAR, 1997; ARYA *et al.*, 2005). Nestes trabalhos o látex é ingerido pelos animais juntamente com goma de acácia, sem a separação da borracha e compostos de baixa massa molecular, que juntos, foram anteriormente mostrados por promover efeitos tóxicos quando ingeridos por mamíferos (EL-BADWI *et al.,* 1998). Em nossos experimentos, a atividade antiinflamatória só foi observada quando a fração PL era administrada por via endovenosa nos animais. Vários experimentos foram realizados para detectar a presença da atividade antiinflamatória por via oral sem obtenção de êxito. Nem mesmo doses de 1.000 mg/kg da fração PL em solução salina contendo 1% de

amido ou o látex *in natura* administrados por via oral a animais em jejum, foram capazes de reverter a resposta pró-inflamatória induzida por carragenina. Estes resultados sugerem que diferentes protocolos de obtenção de preparações do látex podem gerar diferentes amostras detentoras de potentes atividades farmacológicas. Nossos estudos continuam objetivando a detecção da atividade antiinflamatória da fração PL quando administrada por via oral a animais.

Estudos de âmbito imunológico, alergênico e toxicológico foram recentemente realizados com a fração PL do látex de *C. procera* em nosso laboratório (RAMOS *et al.*, 2006; RAMOS *et al.*, 2007). Nenhuma alteração dos parâmetros bioquímicos sanguíneos, renais e hepáticos foi observada em animais que receberam a fração PL por via oral durante 35 dias consecutivos. Nestes experimentos foi observado aumento de células mononucleares no sangue dos animais, mostrando que a fração PL também possui atividade imunoestimulatória, além de não ter sido observada indução de resposta alergênica quando PL foi administrado por via oral aos animais. Entretanto, resposta alergênica foi observada quando a fração foi administrada por via subcutânea nos animais. Este resultado é preocupante visto que o látex desta planta é comumente utilizado no combate a doenças fúngicas de pele pela população carente de nosso Estado. A busca pela determinação da atividade antiinflamatória desta fração por via oral é bastante relevante, visto que respostas alergênicas não foram detectadas por esta via além de que doses de 5.000 mg/kg da fração administradas PL por via oral, não apresentaram-se tóxicas a animais experimentais.

Proteínas do látex de *C. procera* vêm sendo intensamente estudadas em nosso laboratório por apresentarem relevantes propriedades farmacológicas. Recentemente, em um trabalho publicado por OLIVEIRA e colaboradores (2007), foi observado que a mesma fração PL, aqui observada ser detentora de forte atividade antiinflamatória e antinociceptiva, possui atividade citotóxica contra células tumorais. A fração PL apresentou atividade contra cinco linhagens tumorais humanas testadas e não foi citotóxica a linfócitos humanos sadios mesmo quando analisadas em doses 20 vezes maiores. A atividade citotóxica promovida pela fração PL ficou completamente retida no PI.

Outros estudos de âmbito farmacológico vêm sendo desenvolvidos em nosso laboratório com as proteínas do látex de *C. procera*. Atividades de PL contra infecção induzida por microorganismos bem como atividade anti-helmíntica *in vitro* contra parasitas de mamíferos vêm sendo estudadas (Dados não publicados). Em paralelo a fração PL vem sendo avaliada quanto a capacidade em inibir o crescimento do tumor Sarcoma 180 transplantado em camundongos (Dados não publicados). Estudos preeliminares indicam o envolvimento de proteases cisteínicas na ação antitumoral *in vivo*. Nestes modelos experimentais, os resultados obtidos são surpreendentes e bastante promissores, revelando que o látex de *C. procera* constitui uma excelente fonte de proteínas com elevado potencial farmacológico.

Antiinflamatórios e analgésicos são drogas de uso comum. Muitas destas estão disponíveis no mercado e novas drogas de ação mais eficazes estão sempre surgindo. A obtenção de uma fração do látex com tal propriedade é um passo importante no estudo de biomoléculas do látex com potencial fitoterápico.

Novos experimentos envolvendo a utilização de passos cromatográficos estão sendo realizados em nosso laboratório. Esta nova etapa será de grande importância para identificar as moléculas envolvidas nos eventos aqui relacionados. Estes resultados levarão a uma melhor compreensão dos mecanismos pelo qual o látex promove tais eventos biológicos.

TABELA 3. Resumo dos relatos da atividade antiinflamatória presente no látex da planta *Calotropis procera*

Material (Látex)	**Via de Administração**	**Modelo experimental**	**Dose**	**Agente Inflamatório**	**Resultados Obtidos**	**Referência**
Látex coletado Em água	Oral (1 hora antes do estímulo inflamatório)	Edema de pata	5 a 100 mg/kg	Carragenina e formalina	Antiinflamatória contra resposta inflamatória aguda	KUMAR & BASU, 1994
Látex coletado em água e triturado com goma de acácia (1:1 m/m)	Oral (1 hora antes do estímulo inflamatório)	Edema de pata, bolsa de ar e permeabilidade vascular	50 a 500 mg/kg	Carragenina, adjuvante completo de Freud	Antiinflamatório em todos os modelos avaliados	SANGRAULA *et al.*, 2002
Fração PL	Endovenosa (30 minutos antes do estímulo inflamatório)	Peritonite, edema de pata e cistite hemorrágica	5 a 100 mg/kg	Carragenina, dextrana e mesna	Antiinflamatória contra carragenina (peritonite e edema de pata) e mesna (cistite hemorrágica)	ALENCAR *et al.*, 2004
Látex íntegro extraído com éter de petróleo e metanol	Oral (1 hora antes do estímulo inflamatório)	Edema de pata	50 a 1000 mg/kg	Carragenina, histamina, serotonina, composto 40/80 e PGE_2	Atividade antiinflamatória contra carragenina, histamina e bradicinina	ARYA & KUMAR, 2005
Extrato metanólico do látex triturado com goma de acácia (1:1 v/m)	Oral (1 vez por dia durante 28 dias)	Artrite monoarticular	50 e 500 mg/kg	Adjuvante completo de Freud	Redução da inflamação da articulação	KUMAR & ROY, 2007
Látex coletado em água e triturado com goma de acácia (1:1 m/m)	Oral (1 vez por dia durante 7 dias)	Hepatotoxicidade	5, 50 e 100 mg/kg	Tetra cloreto de carbono (CCl_4)	Atividade antiinflamatória e redução nos níveis séricos de TNF-α e PGE_2	PADHYA *et al.*, 2007
Fração PL	Endovenosa (30 minutos antes do estímulo inflamatório)	Peritonite	10 mg/kg	Carragenina	Antiinflamatória – redução da migração de neutrófilos	Presente trabalho

TABELA 3. (Continuação).

Fração FD	Endovenosa (30 minutos antes do estímulo inflamatório)	Peritonite	10 mg/kg	Carragenina	Não apresentou atividade antiinflamatória	Presente Trabalho
Fração B	Endovenosa (30 minutos antes do estímulo inflamatório)	Peritonite	10 mg/kg	Carragenina	Antiinflamatória – redução da migração de neutrófilos	Presente Trabalho
Fração PL	Oral (em solução contendo 1 % de amido 1 hora antes do estímulo inflamatório)	Peritonite	12,5 a 1000mg/kg	Carragenina	Não apresentou atividade antiinflamatória	Presente Trabalho
Látex coletado em água (1:1; v/v) e centrifugado (*In natura*)	Oral (1 hora antes do estímulo inflamatório)	Peritonite	52 e 188 mg/kg	Carragenina	Não apresentou atividade antiinflamatória	Presente Trabalho

Obs.: Com exceção do modelo de cistite hemorrágica (Alencar *et al.*, 2004), todos os experimentos descritos acima foram desenvolvidos utilizando ratos.

VII - CONCLUSÕES

O estudo aqui desenvolvido sugere que simples etapas de diálise e centrifugação proporcionaram um fracionamento do látex de *Calotropis procera* de modo eficiente, promovendo a separaração de uma atividade toxicológica de uma de interesse biológico.

A fração FD, constituída por pelo menos quatro peptídeos, foi a fração que apresentou atividade pró-inflamatória quando avaliada no modelo de peritonite em ratos. A inflamação promovida por esta fração foi dependente do tempo e dose utilizada, evento que pareceu também ser promovido por peptídeos já que a indução da resposta pró-inflamatória foi diminuída após tratamento com pronase. Em adição, FD provavelmente induz inflamação por vias de liberação de histamina e TNF-α.

As frações PL e B, não induzem resposta pró-inflamatória quando administrados na cavidade peritoneal dos ratos. Por outro lado, reduzem intensamente a resposta inflamatória induzida por carragenina. A atividade antiinflamatória desempenhada pela fração B se dá provavelmente pela presença de proteínas constituintes da fração PL, que co-precipitaram durante as etapas de obtenção das frações. PL inibiu a resposta pró-inflamatória promovida por FD. A atividade antiinflamatória promovida pela fração PL é promovida por proteínas, visto que a atividade antiinflamatória da fração foi perdida após aquecimento ou tratamento com pronase, e permaneceu ativa após precipitação com acetona.

A fração PL fracionada em coluna de troca iônica gerou três sub-frações que foram igualmente capazes de inibir a migração de neutrófilos induzida pela carragenina e as contorções abdominais induzidas por ácido acético. Entretanto, o mecanismo pelo qual estas promovem seus eventos antiinflamatórios são distintos. A atividade antiinflamatória promovida pela sub-fração cromatográfica PI está relacionada à indução da produção de óxido nítrico, enquanto que a inibição da migração leucocitária promovidas por PII e PIII parece estar relacionada à presença de proteases cisteínicas.

Este é o primeiro trabalho que confirma a presença destas duas atividades antagonistas no látex de *C. procera* e que estas são promovidas por moléculas distintas passíveis de serem separadas com base em seu tamanho molecular. É o primeiro relato mostrando que a fração com atividade antiinflamatória do látex é capaz de modular a fração com atividade pró-inflamatória e que múltiplas proteínas estão envolvidas na resposta antiinflamatória e antinociceptiva promovidas por uma fração protéica do látex da planta.

Para um entendimento exato dos mecanismos envolvidos nos processos citados, faz-se necessário um fracionamento mais detalhado destas sub-frações protéicas para purificar e identificar as proteínas responsáveis pelos eventos aqui apresentados.

VIII – REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. (2005). Imunologia Celular e Molecular. Editora Elsevier. 5ª Edição - 2ª triagem. RJ. pp 251-282.

ABRAMSON, S. B. (2008). Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. Arthritis Res & Ther, 10(Suppl 2): S2.

ALENCAR N.M.N., FIGUEREDO I.S.T., VALE M.R., BITENCURT F.S., OLIVEIRA J.S., RIBEIRO R.A. & RAMOS M.V. (2004). Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in three different experimental models: Peritonitis, Paw edema and Hemorrhagic cystitis. Planta Medica, 70: 1144-1149.

ALENCAR, N. M. N., TEIXEIRA, E. H., ASSREUY, A. M. S., CAVADA, B. S., FLORES, C. A., RIBEIRO, R. A. (1999). Leguminous lectins as tool for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. Mediators of Inflammation, 8: 107-113.

ALMEIDA, T. F., ROIZENBLATT, S., TUFIK, S. (2004). Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. Brain Research, 1000: 40-56.

AMORIN, A., BORBA, H. R., CARAUTA, J. P. P., LOPES, D., KAPLAN, M. A. C. (1999). Anthelmintic activity of the latex of *Ficus* species. Journal of Ethnopharmacology, 64: 255–258.

ANIS, M., IQBAL, M. (1986). Antipyretic utility of some Indian plants in traditional medicine. Fitoterapia, LVII (1): 52-55.

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

ARYA, S., KUMAR, V. L. (2005). Anti-inflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. Mediators of Inflammation, 4: 228-232.

ASSREUY, A. M. S., SHIBUYA, M. D., MARTINS, G. J., DE SOUZA, M. L. P., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A., RIBEIRO, R. A., FLORES, C. A. (1997). Anti-inflammatory effect of the glucose-mannose binding lectins isolated from *Brazilian beans*. Mediators of Inflammation, 6: 201-210.

BAEZ, S. 1969. Simultaneous measurements of radii and wall thickness of microvessels in the anesthetized rat, Circulation Research. 25: 315–329.

BANI, S., KAUL, A., JAGGI, B. S., SURI, K. A., SURI, O. P., SHARMA, O. P. (2000). Anti-inflammatory activity of the hydrosoluble fraction of *Euphorbia royleana* latex. Fitoterapia, 71: 655-662.

BANI, S., KAUL, A., KHAN, B., GUPTA, V. K., SATTI, N. K., SURI, K. A., QAZI, G. N. (2007). Anti-arthritic activity of a biopolymeric fraction from *Euphorbia tirucalli*. Journal of Ethnopharmacology, 110(1): 92-98.

BARANAUSKAS, G., NISTRI, A. (1998). Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. Progress in Neurobiology, 54: 349-365.

BASU, A., CHAUDHURI, A. K. (1991). Preliminary studies on the anti-inflammatory and analgesic activities of *Calotropis procera* root extract. Journal of Ethnopharmacology, 31: 319-324.

BAYROU, O. (2006). Latex allergy. La Revue du praticien, 56(3): 289-95.

BETANCUR-GALVIS, L. A., MORALES, G. E., FORERO, J. E., ROLDAN, J. (2002). Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the Euphorbia genus. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 97(4): 541-546.

BEVILACQUA, M. P., NELSON, R. M., MONNORI, G. (1994). Endothelial – leukocyte adhesion molecules in human disease. The Annual Review of Medicine, 45: 361-378.

BINKLEY, H. M., SCHROYER, T., CATALFANO, J. (2003). Latex Allergies: A Review of Recognition, Evaluation, Management, Prevention, Education, and Alternative Product Use. Journal of Athletic Training, 38(2): 133-140.

BITENCOURT, F. S., FIGUEIREDO, J. G., MOTA, M. R. L., BEZERRA, C. C. R., SILVESTRE, P. P., VALE, M. R., NASCIMENTO, K. S., SAMPAIO, A. H., SAMPAIO-SAKER, S., FARIAS, W. R. L., CAVADA, B. S., ASSREUY, A. M. S., ALENCAR, N. M. N. (2008). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 377: 139-148.

BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry**.** 72: 248-254.

BROIDE, D. H. (1991). Inflammation cells: Structure and Function: Basic and Clinical Immunology. Sitites, D. D. & Terr, A. I. (ed) Appletin and Lange. pp. 141-183.

BURGESS, P. R.; PERL, E. R. (1967). Myelinated afferents fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. Journal of Physiology, 190: 541-562.

CASTARDO, J. C., PRUDENTE, A. S., FERREIRA, J., GUIMARÃES, C. L., MONACHE, F. D., FILHO, V. C., OTUKI, M. F., CABRINI, D. A. (2008). Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. Journal of Ethnopharmacology. 118(3): 405-411.

CHAIEAR, N,. JINDAWONG, B., BOONSAWAS, W., KANCHANARACH, T., SAKUNKOO, P. (2006). Glove allergy and sensitization to natural rubber latex among nursing staff at Srinagarind Hospital, Khon Kaen, Thailand.J. Journal of The Medical Association of Thailand, 89(3): 368-76.

CHEYE, M. L., CHEUNG, K. Y. (1995). Beta-1,3-glucanase is hightly-expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis.* Plant Molecular Biology, 29: 397-402.

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

COLARES, A. V., CORDEIRO, L. N., COSTA, J. G. M., SILVEIRA, E. R., CAMPOS, A. R., CARDOSO, A. H. (2008). Phytochemical and biological preliminary study of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba). Pharmacognosy Magazine, 4(14): 73-77.

CRONSTEIN, B. N., WEISSMAN, G. (1993). The adhesion molecules of inflammation. Arthritis & Rheumatism, 136 (2): 147–157.

CZARNETZKI, B. M., THIELE, T., ROSENBACK, T. (1990). Immunoreactive leukotrienes in nettle plants (*Urtica urens*). International Archives of Allergy and Immunology, 91: 43-46.

DANNHARDT, G., KIEFER, W. (2000). Cyclooxigenase inhibitos - current status and future porpects. European Journal of Medicinal Chemistry, 36:109-126.

DEWAN, S., SANGRULA, H., KUMAR, V. L. (2000). Preliminary studies on the analgesic activity of the latex of *Calotropis procera*. Journal of Ethnopharmacology, 73: 307-311.

EL-BADWI, SAMIA, M. A., ADAM, S. E., SHIGIDI, M. T., HAPKE, H. J. (1998). Studies on laticiferous plants: toxic effects in goats of *Calotropis procera* latex given by different routes of administration. Deutsche Tierarztliche Wochenschrifte, 105(11): 425-427.

EVES, S. A., FREITAS, A. L., SOUSA, B. W., ROCHA, M. L., CORREIA, M. V., SAMPAIO, D. A., VIANA, G. S. (2007). Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 40(1): 127-134.

FENG, Q., LU, X., JONES, D.L., SHEN, J., ARNOLD, J.M. (2001). Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality after myocardial infarction in mice. Circulation. 104: 700–704.

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

FIGARELLA-BRANGER, D., M. CIVATTE, C. BARTOLI, J. F. PELLISSIER. (2003). Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. Muscle Nerve 28: 659-682.

FITZHUGH, D. J. SHAN, S. DEWHIRST, M. W. HALE, L. P. (2008). Bromelain treatment decreases neutrophil migration to sites of inflammation. Clinical Immunology. 128:66–74

FORTES, Z.B., FARSKY, S.P., OLIVEIRA, M.A., AND GARCIA LEME, J. 1991. Direct vital microscopic study of defective leukocyte–endothelial interactions in diabetes mellitus, Diabetes. 40: 1267–1273.

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. (2007). Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. Plant Physiology and Biochemistry, 45(10-11): 781-789.

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

GALLIN, J.I., GOLDSTEIN, I.M., SNYDERMAN, R. (1992). Inflammation: basic principles and clinical correlates. 2. ed. New York: Raven Press.

GIDROL, X., CHRESTIN, H., TAN, H. L., KUSH, A. (1994). Hevein, a lectin like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex. Journal of Biological Chemistry, 269 (12): 9278-9283.

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

GIRDHAR, G., DEVAL, K., MOTTAL, P. K, VASUDEVAN, P. (1984). Mosquito control by *Calotropis* latex. Pesticides, 18(10): 26-29.

GRANGER, D. N., BENOIT, J. N., SUZUKI, M., GRISHAM, M. B. (1989). Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia–reperfusion, American Journal of Physiology. 257: 683–688.

GUPTA, R. S., SHARMA, N., DIXIT, V. P., (1990). Calotropin - a novel compound for fertility control. Ancient Science of life, IX(4): 224–230.

GUZZO, L. S., SAÚDE-GUIMARÃES, D. A., SILVA, A. C. A. LOMBARDI, J. A., GUIMARÃES, H. N., GRABE-GUIMARÃES, A. (2008). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic extracts of *Lychnophora* species. Journal of Ethnopharmacology, 116: 120–124.

HALE, L. P., GREER, P. K., TRINH, C. T., JAMES, C.L. (2005). Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. International Immunopharmacology, 5: 783-793.

HAMBURGER, M. O., CORDELL, G. A., RUANGRUNGSI, N. (1991). Traditional medicinal plants of Thailand. XVII. Biologically active constituents of *Plumeria rubra*. Journal of Ethnopharmacology, 33(3): 289-292.

HOLLAND, T. A., MIKOS, A. G. (2003). Advantages in drug delivery for articular cartilage. Journal of Controlled Release, 86: 1-14.

HOWARB-JONES, N. (1995). A CIOMS ethical code for animal experimentation. WHO Chron. 39: 51-56.

HUSSEIN, H. T., KAMEL, A., ABOUT-ZEID, M., EL-SEBAE, A. K. H., SALEH, M. A. (1994). Uscharin, the most potent molluscicidal compound tested against land snail. Journal of Chemical Ecology, 20(1): 135-140.

IALENTI, A., IANARO, A., MAffiA, P., SAUTEBIN, L., DI ROSA, M. (2000). Nitric oxide inhibits leukocyte migration in carrageenan-induced rat pleurisy, Inflammation Reseach, 49: 411–417.

IMHOF, B. A., DUNON, D. (1997). Basic mechanism of leukocyte migration. Hormone and Metabolic Research, 29: 641-621.

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

JAHAN, P.S., MANNAN, A., KHAN, A.R., KARMAKAR, P. (1991). Insecticidal effect of Akanda (*Calotropis procera*) on *Tribolium confusum* Dural (Colcoptera: *Tenebrionidae*). Bangladesh Journal of Zoology, 19(2): 261-262.

JEKEL, P. A., HARTMANN, B. H., BEINTEMA, J. J. (1991). The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. European Journal of Biochemistry, 200: 123-130.

JULIUS, D., BASBAUM, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. Nature, 413: 203-210.

KAPOOR, S. L. & KAPOOR, L.D. (1980). Medicinal plant wealth ofthe Karim nagar district of Andhra Pradesh. Bulletin of Medico Ethno-Botanical Research, 1: 120-144.

KEKWICK, R. G. O. (2001). Latex and laticifers. Encyclopedia of Life Science. pp 1-6.

KIMATA, H. (2005). Increased incidence of latex allergy in children with allergic diseases in Japan. Public Health, 119: 1145-1149.

KIRTIKAR, K. R., BASU, B. D. (1935). Indian Medicinal Plants. Lolit Mohan Basu, Allahabad, p. 1606.

KISSMANN, K. G. & GROTH, D. (1997). Plantas Infestantes e Nocivas, 2, 2, BASF, pp.148-151.

KOSTER, R., ANDERSON, M., BEER, E. J. (1959). Acetic for analgesic screening. Fred. Proc., v.18, p.412.

KUBENS, P., SUZUKI, M., GRANGER, D. N. (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 88:4651–4655.

KUMAR V.L., SHIVKAR Y.M. (2004b). Involvement of prostaglandins in inflammation induced by latex of *Calotropis procera*. Taylor & Francis Health Sciences, 13: 151-155.

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

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

KUMAR, V. L., ARYA S. (2006). Medicinal uses and pharmacological properties of *Calotropis procera*. Em: Govil J.N. eds. Recent Progress in Medicinal Plants. Texas Studium Press, 11: 373-388.

KUMAR, V. L., ROY, S. (2007). *Calotropis procera* Latex Extract Affords Protection against Inflammation and Oxidative Stress in Freund's Complete Adjuvant-Induced Monoarthritis in Rats. Mediators of Inflammation, 2007: 1-7.

KUMAR, V. L., SEHGAL, R. (2007). *Calotropis procera* latex-induced inflammatory hyperalgesia – effect of bradyzide and morphine. Autonomic & Autacoid Pharmacology, 27: 143–149

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

LARHSINI, M., BONSAID, M., LAZREK, H.B., JONA, M., AMAROUCH, M. (1997). Evaluation of antifungal and molluscicidal properties of extracts of *C. procera*. Fitoterapia, LXVIII(4): 371–373.

LARHSINI, M., MARKOUK, M., JAOUHARI, J.T., BEKKOUCHE, K., LAZREK, H. B., and JANA, M. (2002). The antipyretic activity of some Moroccan medicinal plants. Phytotherapy Research, 16: 97-98.

LARHSINI, M., OUMOULID, L., LAZREK, H. B., WATALEB, C. S., BOUSAID, M., BEKKOUCHE, K., MARKOUK, M., JANA, M. (1999). Screening of antibacterial and antiparasidic activities of six Moroccan Medicianal Plants. Therapie, 54(6): 763-765.

LO, T. N., ALMEIDA, A. P., BEAVEN, M. A. (1982). Dextran and carrageenin evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. Journal of Pharmacology and Experimental Therapy, 221: 261-267.

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

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

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

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

MAJUMDAR, P. K., KUMAR, V. L. (1997). Anti-inflammatory activity of fractions of latex of *Calotropis procera* in carrageenan induced rat paw oedema. Phytotherapy Researcher, 11(2): 166-167.

MANTOVANI, A., S. SOZZANI, INTRONA, M. (1997). Endothelial activation by cytokines. Annals of the New York Academy of Sciences, 832: 93-116.

MARKENSON, J. A. (1996). Mechanisms of chronic pain. The American Journal of Medicine, 101(1): 6-18.

MASCOLO, N., SHARMA, R., JAIN, S. C., CAPASSO, F. (1988). Ethnopharmacology of *Calotropis procera* flowers. Journal of Ethnopharmacology , 22(2): 211-221.

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

MELO, V. J., GOMES, M. T. R., LEMOS, F. O., DELFINO, J. L., ANDRADE, S. P. LOPES, M. T. P., SALAS, C. E. (2008). The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*, Phytomedicine, 15: 237–244.

MESHRAM, P.B. (1995). Evaluation of some medicinal and natural plant extracts against *Teak Skeletonizer*, *Eutectone machaeralis* walk. The Indian Forester, 121(6): 528-532.

MILLAN, M. J. (1999). The induction of pain: An integrative review. Progress in Neurobiology, 57: 1-164.

MIYASAKA, K., MIKAMI, T. (1982) Comparison of the anti-inflammatory effects of dexamethasone, indomethacin and BW755C on carrageenininduced pleurisy in rats. European Journal of Pharmacology, 77: 229–236.

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

MOSSA J.S., TARIQ M., MOHISH A., AGEEL A.M., AL-YAHYA M.A., AL-SAID M.S., RAFATULLAH S. (1991). Pharmacological studies on aerial parts of *Calotropis procera*. American Journal of Chinese Medicine, 19(3-4): 223-231.

MOURSY, T. A., RAHEM, M. A., ALLAM, K. A. (2001). Control of *Musa domestica* third instar larvae by the latex of *Calotropis procera*. Journal of the Egyptian Society of Parasitology, 31: 107-110.

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

OPAL, S. M., DEPALO, V. A. (1999). Antiinflammatory Cytokines. Impact of Basic Research on Tomorrow's Medicine, 1162-1172.

OSONIYI, O., ONAJOBI, F. (2003). Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. Journal of Ethnopharmacology, 89:101-105.

PADHYA, B. M., SRIVASTAVA, A., KUMAR, V. L. (2007). *Calotropis procera* latex affords protection against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. Journal of Ethnopharmacology, 113: 498-502.

PAUL-CLARK, M. J., GILROY, D. W., WILLIS, D., WILLOUGHBY, D. A., TOMLINSON, A. (2001). Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration, Journal of Immunology 2: 1169–1177.

PERRETTI, M. (1998) Lipocortin 1 and chemokine modulation of granulocyte and monocyte accumulation in experimental inflammation. General Pharmacology, 31: 545–552.

PICKARD, W. F. (2007). Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. New Phytologist, 1-11.

POSCH, A., CHEN, Z., WHEELER, C., DUNN, M. J., RAULF-HEIMSOTH, M., BAUR, X. (1997). Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 99(3): 385-395.

PRAKASH, A. O., GUPTA, R. B., MATHUR, R. (1978). Effect of oral administration of forty-two indigenous plant extracts on early and late pregnancy in albino rats. Probe, 17(4): 315-322.

PRASAD, G., (1985). Action of *Calotropis procera* on Migrane (Fam.-Asclepiadaceae). Journal of National Medical Association, 27(6): 7- 10.

PRUEFER, D., SCALIA, R., LEFER, A. M. (1999). Homocysteine provokes leukocyte–endothelium interaction by downregulation of nitric oxide. General Pharmacol, 33:487 - 498.

QUAQUEBEKE, E.V., SIMON, G., ANDRÉ, A., DEWELLE, J., YAZIDI, M. E., BRUYNEEL, F., TUTI, J., NACOULMA, O., GUISSOU, P., DECAESTECKER, C., BRAEKMAN, J. C., KISS, R., DARRO, F. (2005). Identification of a novel cardenolide (2"-Oxovoruscharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent in vitro antitumor activities and high in vivo tolerance: structure-activity relationship analyses. Journal of Medical Chemistry. 48: 849-856.

QURESHI, M. A., QURESHI, N. M., ARSHAD, R., BEGUM, R. (1991). A study on the antisperm activity in extracts from different parts of *Calotropis procera*. Pakistan Journal of Zoology, 23(2): 161–165.

RAMOS, M. V. BANDEIRA, G. P., FREITAS, C. D. T., NOGUEIRA, N. A. P., ALENCAR, M. N., SOUSA, P. A. S., CARVALHO A. F. U. (2006). Latex constituents from C*alotropis procera* (R. Br) display toxicity upon egg hatching and leavae of *Aede aegypti* (Linn). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 111: 503-510.

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. (2007). Immunological and allergenic responses induced by latex fractions of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. Plant Science, 173(3): 349-357.

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

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

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

RHODIN, J. A. G. (1986). Architecture of the vessel wall, in: D.F. Bohr, A.P. Somlyo, H.V. Sparks (Eds.), Handbook of Physiology, vol. II: The Cardiovascular System, Bethesda, 1986, Md 1–31.

RISTIMKI, A., GARFINKLE, S. WESSENDORF, J., MACIAG, T., HLA, T. (1994). Induction of cyclooxigenase-2 by interleukin-1. Clinical & Experimental Immunology, 73: 449-455.

ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S., KUMAR, V. (1994). Pathologic basis of diseases. Philadelphia: W. B. Saunders, Cap. 300: Inflammation and repair.

ROGERIO, A. P., CARDOSO, C. R., FONTANARI, C., SOUZA, M. A., AFONSO-CARDOSO, S. R., SILVA, E. V. G., KOYAMA, N. S., BASEI, F. L. SOARES, E. G., CALIXTO, J. B., STOWELL, S. R., DIAS-BARUFFI, M., FACCIOLI, L. H . (2007). Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. Glycobiology, 17(8): 795-804.

SANGRAULA, H., DEWANS, S., KUMAR, V. L. (2002). Evaluation of Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera* in different models of inflammation. Inflammopharmocology, 9: 257-264.

SCHAGGER H. & JAGOW G.V. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa. Analytical Biochemistry, 166: 368-379.

SCHMIDT J. R., MOULT S.P. (1983). The dermatitic properties of black bryony. Contact Dermatitis, 9:390-396.

SECOR JR, E. R., CARSON, W. F., SINGH, A., PENSA, M., GUERNSEY, L. A., SCHRAMM, C. M., THRALL, R. S. (2008). Oral Bromelain Attenuates Inflammation in an Ovalbumin-induced Murine Model of Asthma. Evidence-Based Research in Complementary and Alternative Medicine, 5:61-69.

SEDGWICKA, D. & WILLOUGHBY, D. A. (1985). Initiation of inflammatory response and its prevention. Em Bonta, I. L. ; Bray, M. A. & Parnham, M. J. Handbook of Inflammation. Elsevier, 5: 27-47.

SEHGAL, R., ARYA, S., KUMAR, V. L. (2005). Inhibitory effect of extracts of latex of *Calotropis procera* against *Candida albicans*: A preliminary study. Indian Journal of Pharmacology. 37(5): 334-335.

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

SEN, T., BASU, A., CHAUDHURI, A.K. (1998). Studies on the possible mechanism of the gastric mucosal protection by *Calotropis procera* – involviment of 5-lipoxygenase pathway. Fundamental & Clinical Pharmacology, 12: 82-87.

SHARMA, P., SHARMA, J. D. (1999). Evaluation of in vitro schizontocidal activity of plant parts of *Calotropis procera* - an ethnobotanical approach. Journal of Ethnopharmacology, 68: 83-95.

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

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

SHUKLA, O. P., KRISHNA-MURTI, C. R. (1961a). Properties and partial purification of a bacteriolytic enzyme from the latex of *Calotropis procera*. Journal of Scientific & Industrial Research, 20: 109-112.

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

SINGH, V. K., ALI, Z. A. (1994). Folk medicines in primary health care: common plants used for the treatment of fevers in India. Fitoterapia, LXV(1): 68-74.

SOARES, P. M., LIMA, S. R., MATOS, S. G., ANDRADE, M. M., PATROCINIO, M. C., FREITAS, C. D., RAMOS, M. V., CRIDDLE, D. N., CARDI, B. A., CARVALHO, K. M., ASSREUY, A. M., VASCONCELOS, S. M. (2005). Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. Journal of Ethnopharmacology, 99(1): 125-129.

SOUZA, G. E. P., FERREIRA, S. H. (1985). Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflammed peritoneal cavity. Agents Actions, 17: 1-5.

SPIECKER, M., DARIUS, H., KABOTH, K., HUBNER, F., LIAO, J. K. (1998). Dfferential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants, Journal of Leukocyte Biology, 63: 732–739.

SRITANYARAT, W., PEARCE G., SIEMS, W. F., RYAN, C. A., WITITSUWANNAKUL, R., WITITSUWANNAKUL, D. (2006). Isolation and characterization of isoinhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis.* Phytochemistry, 67(15): 1644-1650.

SUSSMAN, G. L., BEEZHOLDB, D. H., LISSC G. (2002). Latex allergy: historical perspective. Methods, 27(1): 3-9.

TAN, G. T., PEZZUTO, J. M., KINGHORN, A.D., HUGHES, S.H. (1991). Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. Journal of Natural Products, 54(1): 143-154.

TOCHI, B. N., WANG, Z., XU, S. Y. ZHANG, W. (2008). Therapeutic Application of Pineapple Protease (Bromelain): A Review. Pakistan Journal of Nutrition 7 (4): 513-520.

UPADHYAY, U. P., 1979. Preliminary studies of the therapeutic effect of flowers of *C. procera* (Arka Pushpa) on Asthma-I. Journal of Science and Research in Plant Medicine, 1(1): 52-55.

VALADARES, M. C., CARRUCHA, S. G., ACCORSI, W., QUEIROZ, M. L. S. (2006). *Euphorbia tirucalli* L. modulates myelopoiesis and enhances the resistance of tumour-bearing mice. International Immunopharmacology, 6: 294-299.

VASCONCELOS, E. A. R., NOGUEIRA, F. C. S., ABREU, E. F. M., GONÇALVES, E. F., SOUZA, P. A. S., CAMPOS, F. A. P. (2006). Protein extraction from cowpea tissues for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry analysis. Chromatography, 62: 447-450.

VIJAYAN, P., RAGHU, C., ASHOK, G., DHANARAJ, S. A., SURESH, B. (2004). Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. Indian Journal of Medical Research, 120: 24-29.

WARRIER, P. K., NAMBIAR, V. P. K., RAMANHUTTY, C. (1994). *Calotropis gigantea* In: Indian Medicinal Plants, vol. 1, Orient Longman, Delhi, India, pp. 341–345.

WOOLF, C. J. (2000). Pain. Neurobiology of Disease, 7: 504-510.

WOOLF, C. J., SALTER, M. W. (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. Science, 288: 1765-1768.

YATIN, M., SHIVKAR, VIJAY, L. KUMAR. (2004). Effect of anti-inflammatory drugs on pleurisy induced by latex of *Calotropis procera* in rats. Pharmacology Research, 50: 335-340.

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

YOKOYAMA, C., TANABE, T. (1989). Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of enzyme. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1665: 888-894.

YUNES, R. A. PEDROSA, R. C., CECHINEL FILHO, V. (2001). Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. Química Nova, 24(1): 147-152.

ZHOU, M., WANG, H., SUOLANGJIBA, KOU, J., YU, B. (2008). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. Leaves extract. Journal of Ethnopharmacology, 117(2): 345-350.