

**TATIANA MARQUES DE ALBUQUERQUE**

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA  
INDUZIDA POR UMA FRAÇÃO PROTÉICA DO LÁTEX DE  
*Cryptostegya grandiflora* R.Br. EM MODELOS EXPERIMENTAIS  
*IN VIVO***

**RECIFE**

**2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA**  
**VETERINÁRIA**

**TATIANA MARQUES DE ALBUQUERQUE**

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA**  
**INDUZIDA POR UMA FRAÇÃO PROTÉICA DO LÁTEX DE**  
***Cryptostegya grandiflora* R.Br. EM MODELOS EXPERIMENTAIS**  
***IN VIVO***

**RECIFE**

**2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

CDD 636.089 6

1. *Cryptostegya grandiflora*

2. Inflamação

3. Ferida

I. Leão, Ana Maria dos Anjos Carneiro

II. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA  
VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA  
INDUZIDA POR UMA FRAÇÃO PROTÉICA DO LÁTEX DE  
*Cryptostegya grandiflora* R.Br. EM MODELOS EXPERIMENTAIS  
*IN VIVO***

Tese de Doutorado elaborada por

TATIANA MARQUES DE ALBUQUERQUE

Aprovada em 04/04/2008

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. ANA MARIA DOS ANJOS CARNEIRO LEÃO  
Orientadora-(Depto. Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE)

Profa. Dra. NYLANE MARIA NUNES DE ALENCAR  
Depto. Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA  
Depto. Bioquímica, UFPE

Profa. Dra. MARGARETH MAYER  
Depto. Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARIA CRISTINA DE OLIVEIRA CARDOSO COELHO  
Depto. Medicina Veterinária, UFRPE





## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir alcançar mais um objetivo em minha vida.

Aos meus pais, Eliezer e Maria Alci que desde o início dessa longa jornada me presentearam com muita força, incentivo, amor, carinho e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus tios, Danilo e Aneci pelo incentivo que sempre me deram.

A minha orientadora Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão pela paciência, orientação constante, pelo apoio e amizade.

A Profa. Nylane Maria Nunes de Alencar por ter me recebido gentilmente no Laboratório de Bioquímica da Farmacologia da Universidade Federal do Ceará e pelo interesse e dedicação para a realização deste trabalho, sempre demonstrando confiança, compreensão, paciência e profissionalismo.

Ao Prof. Márcio Ramos pela colaboração científica e fornecimento do látex utilizado neste trabalho.

A Ingrid Figueiredo que mesmo diante das dificuldades se mostrou uma pessoa amiga, sincera e companheira, tornando possível a realização deste trabalho.

A Jozy Godoy que com grande força de vontade e determinação colaborou em todos os experimentos, tornando possível assim a realização deste trabalho.

Ao Flávio da Silveira Bitencourt pela colaboração nos experimentos, incentivo e sugestões.

Ao pessoal do laboratório de Bioquímica da Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, Cinthia, Cibele, Carla, Ítalo pela colaboração nos experimentos.

Aos integrantes do Laboratório responsáveis pelo trabalho de isolamento da fração do látex utilizado no trabalho.

Aos funcionários do Biotério do LIKA, Maria Helena Madruga e Luiz Felipe Viegas pela colaboração na utilização dos animais nos primeiros experimentos.

Ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC onde foram realizados os experimentos.

Ao Prof. Marcos Lemos pela colaboração ao longo do curso.

A coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Veterinária em especial a Profa. Áurea Wisceral pela colaboração ao longo do curso.

## RESUMO

### CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR UMA FRAÇÃO PROTÉICA DO LÁTEX DE *Cryptostegya grandiflora* R.Br. EM MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VIVO*

A *Cryptostegya grandiflora* R.Br. é um membro da família Asclepiadaceae encontrada no Nordeste do Brasil. Apresenta amplo potencial de utilização, a exemplo de matéria-prima para a indústria e na Medicina popular por sua ação antibacteriana, estimulante e antiinflamatória. Este trabalho pode sugerir uma aplicabilidade biotecnológica para o látex de *Cryptostegya grandiflora* como substância na construção de medicamentos alternativos com propriedades antiinflamatórias e/ou pró-inflamatórias para várias condições fisiológicas e patológicas. O objetivo desta pesquisa foi estudar o mecanismo e possíveis mediadores químicos envolvidos na resposta inflamatória induzida pela fração LP do látex de *Cryptostegya grandiflora*. Os modelos experimentais realizados foram: peritonite, edema de pata, bolsa de ar subcutânea e modelo de feridas cutâneas. Foram utilizados camundongos *Swiss* ( $38,0 \pm 3,0$  g) ou Ratos *Wistar* ( $170,0 \pm 33,0$ ). Verificou-se que a fração LP do látex induziu migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de forma dose-e tempo-dependente no modelo de peritonite, edema de pata e bolsa de ar subcutânea em ratos. O aumento do número de macrófagos através do pré-tratamento dos animais com tioglicolato potencializou a migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex de *C. grandiflora*; a depleção de mastócitos através do tratamento com o composto 48/80 não interferiu na migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex. Sendo assim supõe-se o envolvimento de macrófagos e não de mastócitos na resposta inflamatória induzida pela fração LP. A atividade pró-inflamatória no modelo de peritonite foi inibida através do pré-tratamento dos animais com talidomida, dexametasona, indometacina e celecoxib. A fração LP do látex de *Cryptostegya grandiflora* aplicada por via endovenosa reduziu a migração de neutrófilos induzida por carragenina em ratos e aumentou a presença de sinais inflamatórios- edema, hiperemia, exsudação e crosta em feridas cutâneas de camundongos e não foi capaz de estimular o processo de reparação dessas lesões cutâneas.

**Palavras Chave:** *Cryptostegia grandiflora*, inflamação, peritonite



## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

<b>Figura 1.</b> <i>Cryptostegya grandiflora</i> presente na região de Maranguape, região metropolitana do Ceará (A). Vista aproximada (B).....	22
<b>Figura 2.</b> Sequência de eventos leucocitários na inflamação.....	28
<b>Figura 3.</b> Etapas do processo cicatricial de lesões cutâneas.....	42
<b>Figura 4.</b> Coleta do látex de <i>C. grandiflora</i> em Maranguape, Ceará (A), Vista aproximada (B).....	50
<b>Figura 5.</b> Modelo de peritonite.....	52
<b>Figura 6.</b> Indução da migração de neutrófilos pela fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP) de forma dose- e tempo dependente.....	62
<b>Figura 7.</b> Ação da desnaturação térmica sobre o efeito pró-inflamatório da fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP).....	63
<b>Figura 8.</b> Influência do aumento da população de macrófagos na cavidade peritoneal sobre a migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP).....	67
<b>Figura 9.</b> Influência da depleção de mastócitos na cavidade peritoneal sobre a migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP).....	68
<b>Figura 10.</b> Indução da migração de neutrófilos pela fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP) no modelo de bolsa de ar subcutânea.....	70
<b>Figura 11.</b> Indução do edema de pata pela fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP).....	72
<b>Figura 12.</b> Influência da fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP) sobre a atividade da MPO na pata dos animais.....	73
<b>Figura 13.</b> Efeitos de diferentes agentes farmacológicos no edema de pata induzido pela fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP).....	75
<b>Figura 14.</b> Indução da migração de neutrófilos pela fração LP do Látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP) em camundongos.....	77

<b>Figura 23.</b> Área da ferida (cm <sup>2</sup> ) e tempo em dias após tratamento tópico com NaCl 0,15 M, fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (100 µg/mL e 200µg/mL).....	<b>89</b>
<b>Figura 24.</b> Percentual de tecido cicatricial nas lesões experimentais nos grupos NaCl 0,15 M, fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (100 µg/mL e 200µg/mL).....	<b>90</b>
<b>Figura 25.</b> Percentual de fechamento completo nas lesões experimentais dos grupos NaCl 0,15 M, fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (100 µg/mL e 200 µg/mL).....	<b>91</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Efeito de diferentes bloqueadores farmacológicos na migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> ( <i>CgLP</i> ) na cavidade peritoneal.....	<b>65</b>
--	-----------

## **LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1.</b> Composição química de plantas lactíferas.....	<b>20</b>
--	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA=	Ácido Araquidônico
AE =	Azul de Evans
ANOVA =	Análise de Variância
ASC =	Área sob a Curva
$\beta$ -FGF=	Fator de crescimento de fibroblasto $\beta$
CAMs=	Moléculas de adesão celular
C3=	Terceiro componente do sistema complemento
C3a =	Terceiro componente do sistema complemento ativado
C5a =	Quinto componente do sistema complemento ativado
C5=	Quinto componente do sistema complemento
Cg =	Carragenina
CTAP III=	Citocina ativadora de tecido conjuntivo (do inglês: “ <i>chemokine-connective tissue-activating</i> ”)
CTGF=	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
CXCR2 =	Receptor da classe 2 para quimiocina do tipo CXC
DAINES =	Drogas antiinflamatórias não-esteroidais
Dexa =	Dexametasona (glicocorticoide)
EDRF =	Fator de relaxamento derivado do endotélio (do inglês: Endothelium Derivated Relaxation Factor)
EGF=	Fator de crescimento epodermal
ELAM 1=	Molécula de adesão de leucócito e endotélio 1
eNOS =	Isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase (Endothelial form of nitric oxide synthase)
E.P.M =	Erro Padrão da Média
FEC=	Fatores estimuladores de colônia
FGF=	Fator de crescimento de fibroblasto
fMLP =	Peptídeo N-formil-metil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina
G- CFS ou GM-CFS=	Fator de estimulação de crescimento de granulócitos e monócitos
GMP=	Fator de estimulação de crescimento de granulócitos
GPIIb/GPIIIa	Receptores da glicoproteína IIb/IIIa
HE =	Hematoxilina-Eosina
ICAM-1e ICAM-2 =	Moléculas de adesão intercelular-1 e 2 (do inglês: Intercellular Adhesion Molecule)
IFN- $\alpha$ ou $\gamma$ =	Interferon alfa ou gama
IgA, IgG=	Imunoglobulina A e G
IGE=	Imunoglobulina E
IL-1 =	Interleucina-1

IL-2=	Interleucina 2
IL-3=	Interleucina 3
IL-4 =	Interleucina-4
IL-5=	Interleucina 5
IL-6 =	Interleucina-6
IL-8 =	Interleucina-8
IL-10 =	Interleucina-10
IL-13 =	Interleucina-13
iNOS =	Isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase (inducible form of nitric oxide synthase)
i.p. =	Intraperitoneal
LAM-1=	Molécula de adesão de leucócito 1
LPS =	Lipopolissacarídeo bacteriano
LTB <sub>4</sub> =	Leucotrieno B <sub>4</sub>
MCP =	Proteína quimiotática para monócitos
MIP =	Proteína inflamatória de macrófagos
MHC=	Complexo principal de histocompatibilidade
MMP-2 e MMP-9	metaloproteases de matriz 2 e 9
MN=	Migração de neutrófilos
MNCF=	Fator quimiotático para neutrófilos derivado de macrófagos
MPO=	Mieloperoxidase
NADPH =	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato associado com o íon hidrogênio
nNOS =	Isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase
NO =	Óxido nítrico (do inglês: Nitric oxide)
NOS =	Enzima óxido nítrico sintase (do inglês: Nitric oxide sintase)
NK=	Células “ <i>natural killer</i> ”
PAF =	Fator de ativação de plaquetas (do inglês: platelet activator factor)
PCAM-1 =	Molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta
PDGF=	Fator de crescimento derivado das plaquetas (do inglês: “ <i>platelet-derived growth factor</i> ”)
PGD =	Prostaglandina da série D
PGE =	Prostaglandina da série E
PGE =	Prostaglandina da série E do tipo 2
PGF <sub>2α</sub> =	Prostaglandina da série F do tipo 2
PGI =	Prostaglandina da série I (prostaciclina)
PGI 2	Prostaglandina da série I (prostaciclina) do tipo 2
PGS=	Prostaglandinas
PMN =	Polimorfonucleares

PO=	Pós-operatório
TGF $\beta$ =	Fator de crescimento transformante $\beta$ (do inglês: transforming growth factor $\beta$ )
TNF- $\alpha$ =	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês: tumoral necrosis factor-alpha)
TXA <sub>2</sub> =	Tromboxano A <sub>2</sub>
TXS =	Tromboxanas
UI =	Unidades Internacionais
VCAM-1 =	Molécula de adesão vascular (do inglês: vascular adhesion molecule)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Potencial fitoquímico das plantas lactíferas: <i>Cryptostegia grandiflora</i>.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2. Inflamação.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2.1. Eventos vasculares da resposta inflamatória.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.2. Eventos celulares da resposta inflamatória.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.3. Papel das moléculas de adesão.....</b>	<b>26</b>

2.2.4. Etapas da migração de leucócitos.....	27
2.2.5. Células inflamatórias: estrutura e função.....	29
2.2.5.1. Neutrófilos.....	29
2.2.5.2. Eosinófilos.....	30
2.2.5.3. Basófilos.....	30
2.2.5.4. Mastócitos.....	31
2.2.5.5. Macrófagos.....	31
2.2.6. Mediadores químicos envolvidos no processo inflamatório.....	32
2.3. Resposta à injúria celular e tecidual: feridas, inflamação e cicatrização.....	38
2.3.1. Feridas.....	38
2.3.2. Reparação de lesões.....	41
2.3.2.1. Coagulação.....	43
2.3.2.2. Fase inflamatória.....	44
2.3.2.3. Proliferação.....	45
2.3.2.4. Contração da ferida e fase de remodelamento.....	47
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
3.1. Animais.....	49
3.2. Fração LP do Látex.....	49
<b>3.3. MODELOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>51</b>
3.3.1. Avaliação da atividade pró-inflamatória.....	51
3.3.1.1. Modelo de peritonite.....	51
3.3.1.2. Curso temporal da migração de leucócitos.....	53
3.3.1.3. Efeito da desnaturação térmica do látex.....	53
3.3.1.4. Modulação farmacológica da migração de neutrófilos.....	53
3.3.1.5. Mudanças na população das células residentes da cavidade peritoneal.....	54
3.3.2. Bolsa de ar subcutânea (“Air pouch”).....	55
3.3.3. Modelo de edema de pata.....	55
3.3.4. Atividade da Mieloperoxidase (MPO) nas patas dos animais.....	56
3.3.5. Modulação farmacológica no modelo do edema de pata.....	56
3.3.6. Avaliação da atividade pró-inflamatória do látex de <i>C. grandiflora</i> em camundongos.....	57
3.3.6.1. Modelo de peritonite.....	57
3.3.6.2. Determinação da permeabilidade vascular.....	58
3.3.7. Estudo da atividade antiinflamatória.....	58
3.3.7.1. Aplicação do efeito do látex de <i>C. grandiflora</i> sobre a migração de	

3.3.8. Estudo do efeito da fração LP de <i>C. grandiflora</i> em modelo experimental de feridas cutâneas de camundongos.....	59
3.3.8.1. Procedimento anestésico e cirúrgico.....	59
3.3.8.2. Organização dos grupos e procedimento experimental.....	59
3.3.8.3. Avaliação clínica.....	60
3.4. Análise Estatística.....	60
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
4.1. A fração LP do látex de <i>Cryptostega grandiflora</i> induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de forma dose-e tempo-dependente.....	61
4.2. Desnaturação térmica reverte o efeito pró-inflamatório da fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> .....	61
4.3. Talidomida, Dexametasona, indometacina e celecoxib, mas não PCA e cimetidina inibem a migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP) no modelo de peritonite.....	64
4.4. Mudanças da população de células peritoneais residentes alteram a atividade pró-inflamatória da fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP).....	66
4.5. A fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP) induz migração de neutrófilos no modelo de bolsa de ar subcutânea (“Air pouch”).....	69
4.6. A fração LP do Látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP) induz efeito edematogênico.....	71
4.7. A fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP) induz aumento da MPO no tecido intraplantar das patas dos animais.....	71
4.8. Cimetidina, Dexametasona, Talidomida, indometacina, mas não celecoxib inibem o edema induzido pela fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP) no modelo do edema de pata.....	74
4.9. A fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP) induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal no modelo de peritonite em camundongos.....	76
4.10. A fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP) provoca o aumento da permeabilidade vascular no fluido intraperitoneal de camundongos.....	76
4.11. Estudo da atividade antiinflamatória.....	79
4.12. A fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP) aumenta a presença de sinais inflamatórios- edema, hiperemia, exsudação e crosta- em lesões experimentais em camundongos.....	81
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>92</b>

# 1. INTRODUÇÃO

O uso das espécies vegetais, com fins de tratamento e cura de doenças e sintomas, remonta ao início da civilização, quando o homem começou um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais para seu próprio benefício (ANDRADE *et al.*, 1992).

O emprego de produtos medicinais de origem natural no tratamento de certas doenças tem sido amplamente utilizado pela população, mas poucas pesquisas têm sido realizadas a fim de caracterizar os seus efeitos terapêuticos (VIJAYAN *et al.*, 2004). Alguns estudiosos mencionaram que elementos existentes na natureza poderiam constituir materiais alternativos para o tratamento local das feridas, já que os curativos disponíveis, sintéticos ou biossintéticos, utilizados tanto no homem como em outras espécies são onerosos (SILVA, 2000).

As plantas são importantes fontes de produtos naturais biologicamente ativos, os quais diferem em termos de estrutura e propriedades biológicas (MOREIRA *et al.*, 1991). A Medicina popular tem-se valido desse recurso para tratamento de diferentes tipos de enfermidades (incluindo doenças infecciosas), além de serem afamadas pelo seu uso na cicatrização de feridas, ainda que seu mecanismo de ação e eficácia sejam muito pouco avaliados em experimentos clínicos controlados (VIJAYAN *et al.*, 2004; MENEZES, 2006).

Justifica-se, assim, um crescente interesse da indústria farmacêutica no estudo de moléculas normalmente presentes na natureza, visto a riqueza da biodiversidade, principalmente no reino vegetal (SIMÕES *et al.*, 2002), em que compostos identificados em diferentes tecidos e órgãos vegetais são freqüentemente responsáveis pelo crescente desenvolvimento da medicina moderna (MORALE *et al.*, 1998). O uso de produtos naturais para o desenvolvimento de novos medicamentos oferece inúmeras vantagens, entre elas citam-se: grande variedade de estruturas químicas, possibilidade de utilização como um “banco de moléculas” para *screenings* além de serem uma fonte biológica renovável, cuja obtenção racional não causará efeitos sobre o meio ambiente (CALIXTO, 2001).

As plantas lactíferas têm sido estudadas por apresentarem uma fonte interessante de moléculas biologicamente ativas, e seu uso é freqüentemente

reportado na Medicina popular (SOARES *et al.*, 2005).

Há poucos relatos de estudos com o látex de *Cryptostegia grandiflora* diferentemente do *C. procera*.

A *Cryptostegia grandiflora* R.Br. é um membro da família Asclepiadaceae e uma planta ornamental comumente encontrada no Egito e vários outros países (HUTCHINSON, 1973), sendo abundante no Nordeste do Brasil. Apresenta um amplo potencial de utilização, a exemplo de matéria-prima para a indústria (como alternativa aos óleos convencionais; AUGUSTUS *et al.*, 2000) e na Medicina popular por sua ação antibacteriana, estimulante e antiinflamatória (KIRITIKAR & BASU, 1987; MUKHERJEE *et al.*, 1999).

Grupos indianos têm contribuído com pesquisas sobre as propriedades farmacológicas do látex do *Calotropis procera*, também pertencente à família Asclepiadaceae. Recentemente demonstraram que o mesmo apresenta ação antitumoral e atividade citotóxica frente ao carcinoma hepatocelular (CHOEDON *et al.*, 2006). Outras atividades farmacológicas atribuídas ao *C. procera* incluem ação antiinflamatória, antioxidante e antinociceptiva (ARYA & KUMAR, 2005; ROY *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2005). Entretanto, considerando que os estudos com o látex no processo inflamatório são recentes, há poucos relatos de estudos com o látex de *Cryptostegia grandiflora* diferentemente do *C. procera*.

Atualmente, o estudo do mecanismo de ação e dos mediadores envolvidos no processo inflamatório é alvo de várias pesquisas. Inúmeros trabalhos têm sido realizados com objetivo de elucidar o mecanismo das respostas imunológicas desencadeadas por diversas doenças inflamatórias, bem como a descoberta de medicamentos para a resolução destas patologias.

Há um aparente paradoxo na reação inflamatória, pois se trata fundamentalmente de um mecanismo de defesa, cujo objetivo final é a eliminação da causa inicial da lesão celular e das possíveis consequências da lesão celular. Apesar de ser essencial para a manutenção da homeostase tecidual, proteção contra infecção, mediar respostas imunes, a resposta inflamatória também pode contribuir para a

intensificação da injúria tecidual e ser prejudicial ao organismo. Podem ser citadas várias patologias como artrite reumatóide, choque séptico e rejeição de exertos em que o evento inflamatório é a causa de morbidade e mortalidade (HENSON, 2005). Por outro lado, em alguns casos se faz necessário a exarcebação desse processo em pacientes que apresentam dificuldades em desenvolver uma resposta adequada a agentes agressores, tal como ocorre em pacientes que apresentam imunossupressão induzida por agentes quimioterápicos ou por radioterapia. Logo, o estudo de substâncias naturais que possam interferir neste complexo processo biológico é de extrema relevância (MOTA, 2003).

Neste contexto, em função do interesse crescente pelo estudo das diferentes espécies de látex que atuam sobre os eventos celulares e vasculares do processo inflamatório, este estudo aponta uma aplicabilidade biotecnológica para o látex como substância na construção de medicamentos alternativos com propriedades antiinflamatórias e/ou pró-inflamatórias para várias condições fisiológicas e patológicas.

O objetivo desta pesquisa foi estudar os mecanismos e possíveis mediadores químicos envolvidos na resposta inflamatória induzida por uma fração protéica (fração LP) do látex de *Cryptostegia grandiflora*.

Para tanto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- 1 Caracterizar a atividade pró-inflamatória da fração LP do látex de *Cryptostegya grandiflora* nos modelos de peritonite, edema de pata, bolsa de ar subcutânea (*air pouch*) e modelo de feridas cutâneas;
- 2 Investigar os possíveis mediadores e células residentes envolvidos na resposta inflamatória induzida pela fração LP do látex de *C. grandiflora*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Potencial fitoquímico das plantas lactíferas: *Cryptostegia grandiflora*

Existem mais de 12.000 espécies produtoras de látex (YEANG *et al.*, 2002) e Pereira *et al.* (1999) sugerem que este exsudato está envolvido nos mecanismos de defesa das plantas. O látex é um fluido leitoso, fonte de vários componentes biologicamente ativos, incluindo glicosídeos, taninas e proteínas, além de outros, muitos dos quais são tóxicos (LYNN & CLEVETTE, 1987; DUBEY & JAGANNADHAM, 2003). Entre as substâncias químicas presentes, a que se encontra em maior quantidade é o hidrocarbono polimérico *cis*-poli-isopreno, responsável pela formação da borracha (YEANG *et al.*, 2002). NALLAMSETTY *et al.* (2003) ressaltam que um grande número de proteínas são encontradas no látex, incluindo proteínas solúveis. Uma vez que o látex não é um fluido homogêneo, tais proteínas não estão dispersas homogeneamente (DUBEY & JAGANNADHAM, 2003).

As plantas lactíferas têm sido objeto de estudo recente, tendo em vista seu potencial como fontes renováveis de energia (devido ao seu conteúdo de hidrocarbonetos) e de outros fitoquímicos farmacologicamente ativos (KALITA & SAIKIA, 2004). O extrato acetônico destas plantas foi analisado e os resultados

podem ser comparados aos de outras espécies lactíferas, submetidas a processamento semelhante (Quadro 1).

Quadro 1 – Composição química de plantas lactíferas.

Família	Espécie	Hidrocarbonetos (%)	Polifenóis (%)	Lipídeos (%)	Proteínas Totais (%)
	<i>Plumeria alba*</i>	1,36	□7,89	□3,56	□7,87
	<i>Nerium indicum</i>	<i>m</i> *2,	18□8,	62□4,	36□11,
	□□□ <i>Calotropis procera</i>	<i>ra</i> *3	,46□11	,45□4	,71□12
	□□□□ <i>Cryptosperma grandiflora</i>	<i>ora</i> #	2,13	□6,9	□6,
□□□□□Euphorbiaceae	<i>Euphorbia neriifolia*</i>	<i>lia</i> *	3,28□1	2,49	3,87□1
□□□□□Sapotaceae	<i>Mimosa eleagnifolia</i>	<i>ngi</i> *	0,46	0,89	1,03

cromatografia de camada delgada espectrometria de infravermelho (lipídeos e polifenóis) e determinação do nitrogênio total (proteínas). \* KALITA & SAIKIA (2004); # AUGUSTUS *et al.* (2000)

Atualmente, o látex de várias espécies de plantas vêm sendo estudados quanto ao seu potencial no tratamento de doenças. O seu uso é frequentemente relatado na medicina popular (SOARES *et al.*, 2005). Dentre eles, o látex do *Calotropis procera* merece papel de destaque. O *Calotropis procera* pertence a família Asclepiadaceae e é largamente distribuído na Ásia, África, América do Sul e é abundante na região Nordeste do Brasil (DUBEY & JAGANNADHAM, 2003). Trabalhos relatam o seu efeito analgésico (DEWAN *et al.*, 2000b; SOARES *et al.*, 2005), ação antidiarréica (KUMAR *et al.*, 2001), ação na cicatrização de feridas (RASIK *et al.*, 1999), atividade antifúngica, antimicrobiana, anticancerígena (SHUKLA & MURTI, 1961; HUSSEIN & KINGSTON, 1981; CHOEDON *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007) e antihelmíntica (AL-QARAWI *et al.*, 2001).

O gênero *Cryptostegia* pertence a família Asclepiadaceae e compreende duas espécies, *Cryptostegya grandiflora* (Figura 1) e *C. madagascariensis*. Esta última recentemente foi subdividida em três variedades: var. *madagascariensis*, var. *glaberrima* e var. *septentrionalis* (MAROHASHY & FORSTER, 1991).

A *Cryptostegia grandiflora* é uma planta lactífera arbustiva que se desenvolve sem manejo agrícola especializado e sobrevive bem a condições ambientais extremas, tais como altas temperaturas e quantidades limitadas de água. Durante a Segunda Guerra Mundial foi utilizada como fonte natural de borracha e foi introduzida em outros países (BAGBY *et al.*, 1981; TOMLEY, 1995). Há

relatos que a composição do látex da *Cryptostegia grandiflora* é uma emulsão de óleo e água similar ao látex do *Calotropis procera* e da *Euphobia* spp. (CALVIN, 1984).

Estudos realizados envolvendo a influência do horário sobre o fluxo do látex de *Cryptostegia grandiflora* verificaram que o rendimento do látex é menor em torno do meio-dia. Este menor rendimento foi correlacionado ao maior poder de evaporação atmosférica neste horário. Foi constatado também que a composição do látex varia consideravelmente ao longo do dia, e uma maior acidez é verificada ao meio-dia em relação ao início da manhã e ao fim da tarde (CURTIS & BLONDEAU, 1946).

A ocorrência de efeitos colaterais indesejáveis ao se utilizar o látex no tratamento de doenças tem sido atribuída à presença do *cis*-poli-isopreno (borracha) (KUMAR *et al.*, 2006), ou, alternativamente, à presença de pequenas quantidades de proteínas remanescentes em produtos manufaturados de borracha (FREITAS *et al.*, 2007). Trabalhos têm sido realizados no sentido de eliminar esta fração (borracha) e componentes de baixo peso molecular (ALENCAR *et al.*, 2004).

Existem poucos relatos sobre a atividade farmacológica da *Cryptostegia grandiflora*, com exceção de sua atividade antifúngica (VIJAYAN *et al.*, 2004) e antibacteriana frente a *Pseudomonas capacia*, *Bacillus megatorium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus coagulans* (MUKHERJEE *et al.*, 1989).

**Figura 1.** *Cryptostegia grandiflora* presente na região de Maranguape, região metropolitana do Ceará (A). Vista aproximada (B)

## **2.2. Inflamação**

A inflamação é um processo fundamental iniciado por estímulos físicos, químicos ou biológicos que são suficientes para ativar uma seqüência de alterações que microscopicamente, incluem: dilatação de arteríolas, capilares e vênulas, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular, exsudação plasmática e migração de leucócitos para o foco inflamatório. Um conjunto de sinais foram descritos por Cornelius Celsus no início da era Cristã, como os quatro sinais cardeais da inflamação: eritema (rubor), edema local (tumor), febre (calor) e dor, mais tarde, Virchow no século XIX acrescentou a perda de função do tecido ou órgão lesado (HENSON, 2005)

O processo inflamatório é, genericamente, classificado com base em alguns parâmetros citológicos e sintomáticos que vão variando progressivamente com o passar do tempo, em agudo ou crônico (TASAKA, 2006).

O processo inflamatório agudo caracteriza-se pela curta duração e apresenta os sinais cardeais da inflamação, quais sejam: dor, calor, rubor e tumor, além de perda de função. É caracterizado pela rápida migração de granulócitos, principalmente neutrófilos, seguida por monócitos que amadurecem, tornam-se macrófagos que subseqüentemente proliferam e desse modo assumem a função de macrófagos

residentes e pelos eventos vasculares, tais como, extravasamento de fluidos e proteínas plasmáticas, aumento da permeabilidade vascular, alterações estruturais da microvasculatura e elevação nos níveis plasmáticos de uma série de proteínas denominadas por proteínas da fase aguda ( $\alpha$ -2-macroglobulina, fibrinogênio, haptoglobulina, componentes C3 e C5 do complemento, proteína C-reativa) (BAUHMANN & GAUDIE, 1994; GALLIN *et al.*, 1999).

O processo inflamatório crônico, além de perdurar por um período indeterminado não apresenta um padrão tão estereotipado, variando de acordo com os tipos de mediadores celulares e humorais envolvidos (TASAKA, 2006). É caracterizado pela presença de linfócitos e macrófagos, com proliferação de vasos sanguíneos e de tecido conjuntivo (SEDGWICKI & WILLOUGBY, 1985; BROIDE, 1991).

A resolução da inflamação ocorre quando os granulócitos são eliminados e a população de células mononucleares teciduais (macrófagos e linfócitos) retornam aos números anteriores a inflamação (GALLIN *et al.*, 1999). Estudos indicando os índices de resolução da inflamação têm sido propostos. Estes índices incluem o intervalo entre o tempo em que a infiltração de neutrófilos atinge o ponto máximo e o tempo correspondente ao decréscimo do número de neutrófilos de 50% do valor máximo. Através da indução experimental de peritonite em ratos pela injeção intraperitoneal de uma  $\beta$ -D-glucana (zimosana) extraída da parede celular de *Scharyomyces cerevisiae*, verificou-se que a infiltração máxima de neutrófilos ocorria 12 horas após a injeção do estímulo e o decréscimo em 50 % do valor máximo ocorreu somente 8 horas após o pico (BANNENBERG *et al.*, 2005).

O processo inflamatório é regulado por mediadores, que são moléculas solúveis oriundas de células, do plasma ou de proteínas da matriz que agem em células inflamatórias alvo através de receptores específicos (LUSTER *et al.*, 2005) e são responsáveis pelas respostas vasculares e celulares, tanto da fase aguda quanto da fase crônica (BAUHAMANN & GAULDIE, 1994). Estas substâncias podem modular a resposta inflamatória de forma positiva ou negativa; pois caso ocorra persistência do processo inflamatório, poderá ocorrer um estado patológico com lesão de células normais do hospedeiro e conseqüentemente ser deletério ao organismo (BROIDE, 1991). Estes mediadores são geralmente as quimiocinas, citocinas e mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico (SERHAN &

SAVILL, 2005).

### **2.2.1. Eventos vasculares da resposta inflamatória**

Primeiramente ocorre uma vasoconstrição transitória de origem neurogênica, mediada por terminações do sistema nervoso autônomo, em seguida a vasodilatação das arteríolas, capilares e veias, que é responsável pelo aumento do fluxo sanguíneo, o que provocará o aumento da temperatura (calor) e o eritema (rubor) (GALLIN *et al.*, 1992; BHANDARI *et al.*, 2005). Após ocorrem modificações nos vasos de pequeno calibre que permitem a passagem de proteínas plasmáticas para o espaço extracelular, provocando aumento da pressão oncótica e retenção de líquido no interstício, há também uma estase sanguínea em consequência do aumento da permeabilidade da microvasculatura, uma vez que o extravazamento de líquidos e proteínas para o interstício provoca hemoconcentração, aumentando a viscosidade sanguínea no local. Estes eventos são mediados por várias substâncias entre elas: bradicinina, serotonina, histamina e prostaglandinas da série E e da série I (BHANDARI *et al.*, 2005).

O edema ocorre em função da exsudação de elementos sanguíneos para os espaços intersticiais, e levará a um acúmulo de líquidos nesses locais (ALI *et al.*, 1997).

Diferentes mecanismos levam ao aumento da permeabilidade, dependendo dos receptores que serão ativados na célula endotelial ou da lesão provocada no vaso sanguíneo, podendo ocorrer a retração das células endoteliais as quais “abrem” as junções intercelulares e também possivelmente pelo aumento no transporte vesicular através do endotélio. Vários mediadores estão presentes no exsudato que influenciam as células adjacentes e os próprios vasos sanguíneos (ROBBINS *et al.*, 2005).

### **2.2.2. Eventos celulares da resposta inflamatória**

A resposta inflamatória celular é uma das formas de defesa mais efetivas do hospedeiro frente a invasão do organismo por um agente infeccioso ou uma lesão física. Os leucócitos e moléculas plasmáticas são atraídos para o local da infecção ou dano tecidual, e este infiltrado leucocitário realizará a fagocitose, degradação e morte destes antígenos estranhos (BEVILACQUA *et al.*, 1994).

Estes eventos são realizados por vários tipos de células. Entre elas, podem estar as células já presentes nos tecidos, como as células endoteliais, mastócitos, células mononucleares residentes e as células que migrarão para o local da lesão, como os leucócitos polimorfonucleares (PMN- neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e monucleares (monócitos e linfócitos) (FERREIRA, 1980).

De acordo com o estágio da lesão e o tipo de estímulo irá predominar determinado tipo de célula (McEVER, 1991). Durante as primeiras 6-24 horas predomina o infiltrado neutrofilico, sendo substituído posteriormente por células monucleares (BEVILACQUA *et al.*, 1994). Os leucócitos são atraídos para a região afetada por um processo conhecido por quimiotaxia. Os macrófagos residentes participam de vários eventos da inflamação, sendo responsáveis pela fagocitose do agente agressor e pela liberação de vários mediadores, desencadeando outros eventos inflamatórios, como edema e dor (FERREIRA, 1980).

O acúmulo de neutrófilos no local inflamado também contribuirá para os eventos vasculares da inflamação, tais como, o aumento da permeabilidade com exsudação protéica, edema e lesão vascular (WEDMORE & WILLIAMS, 1981).

A migração dos leucócitos para o local da inflamação ocorre em função de uma complexa interação destes com as células endoteliais, através da expressão em suas superfícies de proteínas adesivas, denominadas como moléculas de adesão. Este processo é intermediado por diferentes mediadores inflamatórios e quimiotáticos, os quais promovem um aumento nas interações entre os neutrófilos e as células endoteliais, favorecendo a migração destes leucócitos a favor do gradiente de concentração entre a área lesada e as vênulas pós-capilares (McEVER, 1992; HUTTENLOCHER *et al.*, 1995).

### **2.2.3. Papel das moléculas de adesão**

As moléculas de adesão celular (CAMs) são glicoproteínas expressas na superfície celular, sendo responsáveis pelo processo de migração e tráfego dos leucócitos na corrente sanguínea (LASKY, 1992). Esta migração depende da interação entre os leucócitos e as células endoteliais, ambas contribuindo ativamente através da expressão em suas superfícies destas proteínas adesivas (CRONSTEIN & WEISSMAN, 1993). As citocinas e outros mediadores inflamatórios influenciam o

número e a função das CAMs. A seletividade depende do mediador e do tipo de célula envolvida (KUMAR & BUSSE, 1995).

Diferentes famílias de moléculas estão envolvidas no processo de adesão, entre elas estão as selectinas (lectinas endógenas), imunoglobulinas e as integrinas (PANÉS *et al.*, 1999).

As selectinas são lectinas que se caracterizam pela presença de um domínio lectínico que interage com carboidratos ligantes presentes nos leucócitos e nas células endoteliais. São encontradas apenas em células vasculares, sendo responsáveis pelas interações iniciais de adesão entre leucócitos intravasculares e o endotélio vascular, em áreas de inflamação (MC EVER *et al.*, 1995). São formadas por três sub-famílias: selectina L (LAM-1: “Leukocyte Adhesion Molecule 1”) encontrada constitutivamente na superfície microvilosa de leucócitos mediando o rolamento de neutrófilos no endotélio e o movimento dos mesmos para os tecidos linfóides periféricos, uma vez que seus ligantes (mucinas) estão presentes nesses locais (TEDDER *et al.*, 1995); Selectina P (GMP-140), está presente na superfície das plaquetas e células endoteliais sob ativação de substâncias como a trombina, histamina, endotoxina, citocinas e outros, se liga a resíduos siálicos de oligossacarídeos dos leucócitos de maneira dependente de cálcio; podendo haver variações na expressão frente aos estímulos dependendo da espécie animal (VARKI, 1992; EPPHIMER *et al.*, 1996; PAN *et al.*, 1998) e Selectina E (ELAM-1: “Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1”) , expressa na superfície do endotélio vascular em razão de estímulos como IL-1 e TNF  $\alpha$  e endotoxina (FRIES *et al.*, 1993); uma pequena quantidade encontrada em vários leitos vasculares parece ter significado importante para a migração dos leucócitos. A Selectina E e a Selectina P encontradas na superfície endotelial, funcionam como sítios de ligação para a Selectina L (GRANGER & KUBES, 1994).

A interação das selectinas com seus ligantes resulta em uma diminuição da velocidade de migração dos neutrófilos o que permitirá que as integrinas promovam a adesão dos neutrófilos ao endotélio (CROSTEIN & WEISSMAN, 1993). As  $\beta$ -2-integrinas são proteínas presentes na membrana dos leucócitos e que podem ter sua expressão aumentada após a sua ativação por mediadores inflamatórios com o Fator de agregação plaquetário ou através de citocinas.

As imunoglobulinas que atuam como moléculas de adesão são : ICAM 1 (molécula de adesão intercelular 1), ICAM 2 (moléculas de adesão intercelular 2), VCAM 1 (molécula de adesão vascular) e PCAM 1 (molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta), estão presentes no endotélio e sua expressão é aumentada pela ativação do endotélio por citocinas ou endotoxinas. A interação integrina-imunoglobulina acarreta a adesão firme do leucócito ao endotélio (CROSTEIN & WEISSMAN, 1993; PANÈS *et al.*, 1999).

#### **2.2.4. Etapas da migração dos leucócitos**

As etapas, ilustradas na Figura 2, que promovem a migração dos neutrófilos da luz vascular para o tecido intersticial podem ser divididas em: 1, Marginação e captura dos leucócitos circulantes; 2, Rolamento que envolve basicamente as selectinas P e L; 3, Adesão através da ativação dos leucócitos por agentes produzidos pelo endotélio ou outras células (SPRINGER, 1994); 4, Diapedese com penetração através da membrana basal dos pericitos (migração através do endotélio). Essa passagem é controversa, pois alguns pesquisadores demonstraram que os neutrófilos podem migrar por via transendotelial em resposta a um agente quimiotático direto do tipo fMLP (Peptídeo N formil-metil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina) e; 5, Quimiotaxia (transmigração pelo endotélio através de um movimento celular dirigido em direção ao foco da inflamação).

Este processo é dependente de uma variedade de agentes quimiotáticos, tanto de origem endógena (componentes do sistema complemento, produtos da lipoxigenase, citocinas, entre outros) quanto de origem exógena (produtos bacterianos de origem lipídica e fMLP- Peptídeo N-formil-metil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina) (SPRINGER., 1994; RIBEIRO *et al.*, 1997; FENG *et al.*, 1998).

**Figura 2: Sequência de eventos leucocitários na inflamação.** Moléculas quimioatraentes atraem leucócitos (**A**) que aderem e rolam pelo endotélio (**B e C**). O leucócito se dirige ao tecido (**D**) . Modificado de : <[www.virtual.unipar.br](http://www.virtual.unipar.br)> Acesso em 28 fev. 2007.

#### **2.2.5. Células Inflamatórias: Estrutura e função**

As células envolvidas na resposta inflamatória são diferentes quanto a morfologia, ao conteúdo liberado, ao estímulo para ativação celular e ao curso de

tempo pela liberação do mediador, mas ao mesmo tempo apresentam muitas características em comum, como a presença de receptores, estocagem de enzimas hidrolíticas, geração de metabólitos do ácido araquidônico e a capacidade de fagocitar e secretar (ALENCAR, 2001).

### **2.2.5.1. Neutrófilos**

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea, liberados para a corrente sanguínea, na qual circulam por um breve intervalo de tempo e migram para os tecidos ou superfícies epiteliais do trato respiratório, digestório ou urogenital. A contínua produção de neutrófilos visa a manutenção da demanda tecidual e o estoque sanguíneo circulante (REBAR *et al.*, 2003). Estão presentes principalmente em tecidos lesionados, inflamados e sua eliminação efetiva é um pré-requisito para a resolução da resposta inflamatória (SAVILL, 1997). A sua diferenciação, proliferação e maturação são reguladas principalmente por três fatores glicoproteicos: GM-CSF (Fator de estimulação de crescimento de granulócitos e monócitos), G-CSF Fator de estimulação de crescimento de granulócitos e monócitos) e IL-3 (Inteleucina 3) (HAMPTON *et al.*, 1998).

O tempo de trânsito dos neutrófilos, desde o momento em que são produzidos até sua liberação pela medula óssea, é de 4 a 6 dias. A medula, por sua vez, mantém um suprimento de neutrófilos maduros em seu interior, capaz de suprir o sangue periférico por um período de 5 dias. Lesões ou invasão dos tecidos por bactérias resultam na produção e liberação de fatores estimuladores de colônia (FEC) que são responsáveis pela proliferação e maturação dos neutrófilos imaturos na medula óssea (REBAR *et al.*, 2003).

Os neutrófilos podem ligar-se a complexos antígeno-anticorpo ou a partículas cobertas pelas imunoglobulinas IgG e IgA, pois grande parte dos neutrófilos do sangue periférico possuem receptores de superfície para estas imunoglobulinas, além destes receptores eles também apresentam receptores para fMLP, LTB<sub>4</sub> (leucotrieno do tipo B<sub>4</sub>), GM-CSF e para C5a (quinto complemento do sistema complemento ativado) e C3a (terceiro complemento do sistema complemento ativado) (SKILAR, 1986).

A circulação de neutrófilos no sangue tem duração de 10 horas e estão divididos

em compartimento circulante e marginal. Os neutrófilos presentes no compartimento circulante circulam com outras células sanguíneas e são mensurados na contagem total de células; já os presentes no compartimento marginal estão aderidos de forma intermitente ao endotélio vascular, especialmente em pequenos capilares e veias. Essas células não são contadas na contagem celular (REBAR *et al.*, 2003).

O primeiro mecanismo de defesa contra microrganismos invasores são representados pelos neutrófilos, pois são as principais células recrutadas para o sítio infeccioso, atuam destruindo o material fagocitado (microrganismos, células mortas e restos celulares) por meio da produção de radicais livres de oxigênio e nitrogênio, e pela atividade de enzimas lisossomiais presentes nestas células (HAMPTON *et al.*, 1998).

#### **2.2.5.2. Eosinófilos**

Os eosinófilos são produzidos na medula óssea por um processo semelhante à produção dos neutrófilos. São reconhecíveis no estágio de mielócitos, pelo aparecimento de granulação eosinófilica característica. A principal citocina responsável por estimular sua produção é a IL-5 (Interleucina 5) produzida por linfócitos T sensibilizados. O tempo de produção e armazenamento intramedular do eosinófilos é semelhante ao dos neutrófilos. Participam como componentes fundamentais nas reações de hipersensibilidade sistêmica e têm papel fundamental na destruição de trematódeos e nematódeos que possuem IgG ou complemento em sua superfície, apresentam atividades bactericidas e fagocíticas limitadas, podendo ainda desempenhar papel na destruição de células neoplásicas (REBAR *et al.*, 2003). Entre os mediadores lipídicos produzidos pelos eosinófilos, estão o PAF (Fator de ativação de plaquetas), leucotrienos e lipoxinas (COSTA *et al.*, 1997).

#### **2.2.5.3. Basófilos**

Os basófilos são produzidos na medula óssea, e circulam poucas horas pelo sangue periférico e, então, migram para os tecidos, nos quais residem por várias semanas (REBAR *et al.*, 2003). Podem infiltrar os locais envolvidos em vários processos imunológicos ou inflamatórios, associados com frequência aos eosinófilos, porém em quantidades inferiores a estes (COSTA & GALLI, 1998).

Os grânulos do basófilos contêm histamina e heparina, a histamina liberada desempenha papel fundamental nas reações de hipersensibilidade imediata, a heparina tem um efeito anticoagulante importante no processo inflamatório. Basófilos ativos são capazes de sintetizar diversas citocinas que iniciam ou modulam a resposta inflamatória (REBAR *et al.*, 2003).

#### **2.2.5.4. Mastócitos**

Os mastócitos derivam de células hematopoiéticas pluripotentes da medula óssea e apresentam diferenças morfofisiológicas de acordo com o tecido onde são encontrados (GALLI, 1990). É uma das células residentes mais importantes, pois na presença de um agente agressor libera mediadores químicos que desencadeiam os eventos iniciais da resposta inflamatória. Esses mediadores promovem tanto os eventos vasculares quanto celulares, e desta forma provoca a migração de outras células de defesa e amplificação dessa resposta (MOTA, 2003). Os mastócitos de uma maneira geral são essenciais para o desenvolvimento de uma resposta alérgica (hipersensibilidade imediata). Quando há a ligação de antígenos de parasitas ou alérgenos à imunoglobulina da classe E (IgE) presente na superfície dos mastócitos, ocorre a sua degranulação, com liberação de histamina, que apresenta efeito quimiotático sobre os eosinófilos. A ativação destas células também pode ocorrer através de estímulos não imunológicos, endógenos e exógenos, tais como, composto 4880, peptídeos de veneno, neuropetídeos (substância P), peptídeos hormonais e anafilatoxinas que ativam a proteína G independente de cálcio ( $Ca^{++}$ ), e desta forma promovem exocitose de seus grânulos (LAGUNOFF *et al.*, 1983; GALLI, 1990; METCALF *et al.*, 1997; REBAR, 2003).

Entre os mediadores liberados alguns são armazenados em estados pré-formados em seus grânulos citoplasmáticos, entre estes, incluem-se: proteoglicanos, proteases, histamina e carboxiptidase A (SCHWARTZ & HULF, 1993; COSTA & GALLI, 1998). Os metabólitos do ácido araquidônico formados pela cicloxigenase e lipoxigenase, as quais originam como principais produtos a prostaglandina D (PGD<sub>2</sub>) e os leucotrienos, respectivamente, são sintetizados pelos mastócitos e basófilos após serem estimulados e exercem importantes atividades inflamatórias (HOLGATE *et*

*al.*, 1993). As citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, TNF- $\alpha$ / Fator de necrose tumoral alfa) são o grupo de mediadores produzidos por estas células mais recentemente identificado e pelo menos o TNF- $\alpha$  pode ser armazenado pré-formado (GORDON & GALY, 1990).

### **2.2.5.5. Macrófagos**

Os monócitos originam-se na medula óssea. Diferentemente dos granulócitos são liberados na circulação periférica como células imaturas e transportados aos tecidos, nos quais se diferenciam em macrófagos, células epitelióides ou células inflamatórias gigantes multinucleadas (REBAR *et al.*, 2003).

Os macrófagos apresentam diferenças estruturais e bioquímicas, em função do local onde estão localizadas; recebendo nomenclatura de acordo com este local, tais como, células de Kupfer (macrófagos hepáticos), osteoclastos (macrófagos ósseos), histiócitos (macrófagos do tecido conjuntivo), células de Langerhans (macrófagos cutâneos) e micróglias (macrófagos do sistema nervoso central) (OGLE *et al.*, 1994).

A contínua transformação monócitos/macrófagos representa a segunda maior linha de defesa do sistema fagócitos circulantes (a primeira é representada pelos neutrófilos).

As funções específicas dos macrófagos incluem: fagocitose, regulação da resposta inflamatória pela liberação de mediadores (fatores quimiotáticos, prostaglandinas, fragmentos de complemento etc.), processamento do antígeno para apresentação aos linfócitos; envolvidos na iniciação da resposta imune (REBAR *et al.*, 2003). Os receptores específicos presentes na membrana dos macrófagos incluem receptores para: IgG, IgE, C3a, C3b, M-CSF, GM-CSF, lipoproteínas, peptídeos e polissacarídeos (ADAMS, 1989).

Os macrófagos são responsáveis pela iniciação da migração dos neutrófilos para o local da injúria, pois uma vez ativados liberam um fator quimiotático para estes. Cunha & Ferreira (1986) estimularam macrófagos em cultura com LPS e verificaram que os mesmos liberavam um fator quimioático para neutrófilos (MNCF). Estímulos como carragenina, zymosam e endotoxina induzem a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal que é potencializada pelo pré-tratamento com tioglicolato que é

responsável por elevar a população de macrófagos residentes e esta migração de neutrófilos diminui após a lavagem da cavidade peritoneal, pois este procedimento reduz a população de macrófagos (CUNHA & FERREIRA, 1986; FACCIOLI *et al.*, 1990; RIBEIRO *et al.*, 1990).

### **2.2.6. Mediadores químicos envolvidos no processo inflamatório**

Em um indivíduo saudável, o organismo encontra-se preparado e capaz de proteger-se contra agressões, através de mecanismos fisiológicos, tais com, reações imunes e antiinflamatórias. Qualquer estímulo, seja ele de natureza química, física ou mecânica, capaz de iniciar um processo inflamatório detonará de forma mais ou menos extensa a ativação de uma série de mediadores químicos, que terão sua ação centrada principalmente sobre eventos vasculares ou celulares (TASAKA, 2006).

Vários são os mediadores químicos envolvidos no desenvolvimento do processo inflamatório, podendo ser de origem tissular, como as aminas vasoativas (histamina e serotonina), fator de ativação plaquetária (PAF), eicosanóides, citocinas, radicais livres (superóxidos), óxido nítrico e neuropeptídeos (TASAKA,2006). Entre as substâncias exógenas, que agem como agentes quimiotáticos, podem ser citados: produtos bacterianos, peptídeos que contêm um aminoácido formil-metionina N-terminal (fMLP), polissacarídeos (carragenina, zimosana), LPS, entre outros (KUMAR *et al.*, 2005).

As aminas vasoativas, histamina e serotonina, liberadas dos mastócitos e das plaquetas podem ser identificadas no início da inflamação aguda. A histamina é o primeiro mediador a atuar; gerando o aumento da permeabilidade vascular e uma contração do endotélio venular com alargamento de junções celulares interendoteliais. A serotonina apresenta ações semelhantes as da histamina, correspondendo a um segundo mediador pré-formado (KUMAR *et al.*, 2005).

Dentre os mediadores químicos, os mais estudados até hoje são os eicosanóides. Este termo refere-se aos lipídios insaturados, derivados da cisão do ácido araquidônico, a partir de enzimas específicas. Ao contrário da histamina, os eicosanóides não são pré-formados nos tecidos, sendo sua produção vinculada a uma série de estímulos. Assim, uma injúria qualquer que danifique a membrana das diferentes células do organismo será capaz de liberar frações de fosfolípidos, denominados ácidos araquidônicos, através da ação enzimática da fosfolipase A2. O

ácido araquidônico, quando liberado não tem ação inflamatória, entretanto, os produtos de sua degradação, formados através da ação de enzimas denominadas cicloxigenases e lipoxigenase, são mediadores químicos fundamentais para o desenvolvimento do processo inflamatório. Diferentes estímulos, tais como, bradicinina, angiotensina II, vassopressina, trombina, colágeno, adrenalina, peptídeos quimiotáticos e histamina ocasionam a liberação do ácido araquidônico. A quebra deste ácido pelas cicloxigenases origina as prostaglandinas (PGS) e tromboxanas (TXS). Por sua vez, as lipoxigenases dão origem aos leucotrienos (TASAKA, 2006).

As prostaglandinas incluem a PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) e o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), o qual é um importante agregador plaquetário e vasoconstritor. Estudos demonstram que entre os mediadores lipídicos, as prostaglandinas, principalmente a PGE<sub>2</sub> são os mediadores da fase aguda da inflamação causam vasodilatação e potencializam a formação do edema, sendo essenciais para o controle do fluxo sanguíneo necessário para a adesão e diapedese dos leucócitos (WILLIAMS & PECK, 1977; SPRINGER, 1994; TASAKA, 2006).

Entre os leucotrienos, aqueles que contêm cistenil (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>) geram intensa vasodilatação e aumentam a permeabilidade vascular e o LTB<sub>4</sub> causa agregação e adesão dos leucócitos, além de quimiotaxia (SIQUEIRA & DANTAS, 2000).

As lipoxinas são outros grupos de eicosonóides importantes geradas pelo metabolismo do ácido araquidônico responsáveis pela fase de resolução da inflamação e, portanto com atividade anti-inflamatória (SERHAN *et al.*, 2000). São reconhecidas por sua habilidade em promover a resolução da inflamação, através do retardo do ingresso de novos neutrófilos aos sítios da inflamação (SERHAN *et al.*, 1995), reduzem a permeabilidade vascular (TAKANO *et al.*, 1998) e estimulam macrófagos a fagocitar células mortas (neutrófilos) (GODSON *et al.*, 2000).

O sistema complemento apresenta como mediadores inflamatórios mais importantes o C3a e C5a, pois induzem um aumento na permeabilidade vascular e causam vasodilatação através da liberação de histamina dos mastócitos e da ativação dos neutrófilos. O C5a ativa a via da lipoxigenase do metabolismo do ácido araquidônico em neutrófilos e monócitos e intensifica ainda mais a liberação de mediadores inflamatórios (BRAQUET *et al.*, 1987). Além disso, aumenta a adesão

leucocitária ao endotélio através da ativação dos leucócitos e do aumento da avidéz das integrinas (SPRINGER, 1994).

O ativador de plaquetas (PAF) está mais relacionado com o processo inflamatório agudo, é liberado pela maioria das células inflamatórias (mastócitos, basófilos, neutrófilos e plaquetas). É gerado a partir de um fosfolipídio de membrana por ativação de fosfolipase, sendo considerado o principal responsável pela anafilaxia sistêmica, facilitando a agregação plaquetária e de neutrófilos, além de estimular a liberação de aminas vasoativas, levando a broncoconstrição, vasodilatação, aumento da permeabilidade e quimiotaxia (WASSERMAN, 1988; TASAKA, 2006).

O óxido nítrico, antes denominado Fator de relaxamento do endotélio (EDRF) é um radical livre formado de forma endógena por uma família de enzimas, óxido nítrico sintetases (EISERIK *et al.*, 1998). Apresenta propriedades pró- e antiinflamatórias (TASAKA, 2006). É um radical livre de vida curta que está envolvido em várias funções biológicas importantes (KOSHLAND, 1992). É sintetizado a partir da combinação da L-arginina e do oxigênio molecular, tendo como principais cofatores o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo associado ao grupo fosfato e íon hidrogênio) e o tetrabiopterina (BH4), pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (NATHAN, 1987; THIEMERMAN, 1997). Esta enzima pode ser expressa constitutivamente (eNOS) ou induzida por fatores extrínsecos (iNOS), como os eventos de reparação tecidual, cicatrização, ferimentos por queimadura, exposição a endotoxinas e doenças inflamatórias. Está relacionado com o edema induzido pela substância P e com o aumento da permeabilidade vascular, também inibe a adesão de plaquetas e leucócitos (TASAKA, 2006), provoca o relaxamento e conseqüente vasodilatação das células musculares lisas subjacentes, quando difunde-se para fora das células endoteliais (PALMER *et al.*, 1988) e causa citotoxicidade em determinados microorganismos e células tumorais (TEDGUI & MALLAT, 2001).

Como o ON é dificilmente dosado diretamente, seus metabólitos, como nitrito e nitrato podem ser utilizados para monitorar a sua formação, inclusive em fluidos inflamatórios (GREEN *et al.*, 1982).

As citocinas são moléculas glicoproteicas solúveis de baixo peso molecular, derivadas de células mononucleares, que apresentam um amplo espectro de ação,

como efeito sobre o crescimento, a motilidade, a diferenciação e a função celular. São representadas pelas interleucinas (ILs) responsáveis por mediar a comunicação entre leucócitos, fator de necrose tumoral (TNF), que apresentam ações pró- e antiinflamatórias, interferons (IFN  $\alpha$  e  $\gamma$ ), que atuam principalmente contra infecções virais e crescimentos tumorais (TASAKA, 2006), o fator estimulante de colônias (CSF) e a “monocyte chemoattractant protein” (MCP-1) (STITES *et al.*, 1997; O’SHEA *et al.*, 2002). São liberadas principalmente por macrófagos e linfócitos, mas também por mastócitos, células NK e também, células tumorais (KLUTH & REES, 1996; STITES *et al.*, 1997).

Estas moléculas podem agir de forma autócrina, parácrina ou sistêmica, frente aos mesmos alvos e mediando funções semelhantes (AKIRA *et al.*, 1990), ou apresentarem ações inibitórias sobre outras citocinas, como é o caso da IL-4 e IL-6 que inibem a produção de TNF ou de IL-1 por monócitos (VICELK & LEE, 1994). São compostos extremamente potentes que agem em concentrações de  $10^{-9}$  a  $10^{-15}$  gramas, desencadeando reações em cascata (STITES *et al.*, 1997).

As citocinas podem ser classificadas em subgrupos, como: interleucinas, fatores de crescimento, quimiocinas, interferons e fatores estimuladores de colônia ou conforme sua atividade biológica, a exemplo de exercerem atividade pró-inflamatória (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  e TNF $\beta$ ) e antiinflamatória (WONG *et al.*, 2003). As principais citocinas mediadoras de inflamação são a IL-1, TNF $\alpha$ , IL-12, IL-6 e as quimiocinas (IL-8, MIP, MCP-1 e a ENA-78) (ALENCAR, 2001).

#### a) Interleucina 1 (IL-1)

A IL-1 é secretada no início da resposta imunológica pode ser produzida por diferentes tipos de células, tais como, monócitos, queratinócitos, células endoteliais, linfócitos B e T, e células do músculo liso (DINARELLO, 1994). É encontrada em duas isoformas que possuem pontos isoelétricos diferentes, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (LARRICK & KUNKEL, 1988). A IL-1 $\alpha$  permanece no citoplasma ou é expressa na membrana e a IL-1 $\beta$  pode ser encontrada na circulação (DINARELLO, 1994). Tanto fatores exógenos como endógenos são capazes de induzir a produção de IL-1 em monócitos e macrófagos, tais como, endotoxinas, exotoxinas, hemaglutininas de vírus e protozoários, partículas de sílica, irradiação (DURUM & OPPENHEIM, 1989) e substâncias endógenas como o C5a, fator estimulador de

colônia-1 (CFS-1), TNF- $\alpha$ , proteínas da matriz extracelular, colágeno, trombina e a própria IL-1 (DINARELLO *et al.*, 1994).

Entre as funções exercidas pela IL-1, citam-se: favorecem a aderência de leucócitos à superfície do endotélio, aumentam a produção dos mediadores inflamatórios (prostaglandinas e PAF) (TATAKIS, 1993), ativam os linfócitos B e T, ativam os macrófagos, liberam proteínas de fase aguda como a proteína c reativa e as proteínas do sistema complemento, aumentam a produção de IL-2 (SHIRAKAWA *et al.*, 1986).

#### b) Fator de Necrose Tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

O fator de necrose tumoral alfa é uma proteína com peso molecular em torno de 17 kDa. Pode ser produzido por macrófagos, fibroblastos, linfócitos T e B (RUDDLE, 1994).

Constatou-se uma homologia estrutural e funcional entre o TNF e uma linfotóxina (LT) que é uma glicoproteína de peso molecular 25 kDa, sintetizada por linfócitos estimulados por mitógenos, devido a isso a LT passou a ser denominada como TNF- $\beta$  (BROWING *et al.*, 1994) e o TNF denominado de TNF- $\alpha$  (RUDDLE, 1994).

Os macrófagos representam a principal fonte desta citocina *in vivo* e o seu estímulo mais potente é o LPS, entretanto outros fatores endógenos como IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, C5a e o próprio TNF- $\alpha$  são também eficientes (OLD, 1985; PHILLIP & EPSTEIN, 1986).

O TNF- $\alpha$  é o mediador chave na inflamação, bem como, nas respostas invasivas a micróbios, parasitas e neoplasias, é responsável em desencadear a liberação de uma série de outras citocinas que aumentam a sua atividade, reduzem a síntese de moléculas de adesão, fatores de crescimento (G-CSF e GM-CSF), prostaglandinas, óxido nítrico e aumento da trobogenicidade da superfície endotelial, além de exercer alguns efeitos indiretos, através da participação de outros mediadores secundários, como leucotrienos e PAF, além de outras citocinas pró-inflamatórias (BEUTLER & CERAMI, 1988). O TNF- $\alpha$  induz a expressão de moléculas MCH-I, propiciando um melhor reconhecimento de células com antígenos estranhos pelas células Tc.

Zganiacz *et al.*, (2004) relatam que camundongos com deficiência de TNF- $\alpha$  sucumbem mais facilmente a infecções pulmonares por micobactérias (ABBAS, 1999). O TNF- $\alpha$  não é considerado um fator quimiotático clássico, pois não induz a migração de neutrófilos *in vitro*, no entanto, ele promove a síntese e a liberação de fatores quimiotáticos, como as quimiocinas, tanto pelas células endoteliais quanto pelas células residentes (FACCIOLI *et al.*, 1990).

### c) Quimiocinas

As quimiocinas são proteínas homologas de 8 a 10 kDa, estruturalmente se caracterizam por possuir quatro cisteínas e são subdivididas em diferentes famílias com base na posição relativa destes resíduos em suas cadeias. Aquelas que apresentam as cisteínas separadas por um único aminoácido são chamadas  $\alpha$ -quimiocinas (CXC) e as que apresentam as cisteínas em posição adjacente são chamadas  $\beta$ -quimiocinas (CC). As  $\alpha$ -quimiocinas que contêm a seqüência ácido glutâmico-leucina-arginina precedendo a seqüência CXC são quimiotáticas para os neutrófilos, entre estas, pode-se citar a IL-8, ENA-78 e NAP-2, já as quimiocinas (IP-10 e MIG) que não apresentam esta seqüência atuam em linfócitos. As  $\beta$ -quimiocinas (MCP-1, 2, Rantes) interagem com monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos, não atuando em neutrófilos (DEVRIES *et al.*, 1999).

Entre os papéis biológicos exercidos pelas quimiocinas, citam-se: efeito quimiotático direto e indireto; promovem a diferenciação e crescimento celular, regulação da hematopoiese e angiogênese, aumentam a adesão e capacidade de ligação dos leucócitos, possível papel no crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases e atividade antitumoral (BEM-BARUCH *et al.*, 1995).

A IL-8 é uma das quimiocinas mais estudadas até o momento (YOSHIMURA *et al.*, 1994), participa juntamente com outras quimiocinas na adesão firme de várias populações de leucócitos. Induz a ativação e translocação de CD11a/CD18 dos estoques intracelulares para a superfície do neutrófilo através de sua ligação com a célula endotelial (STOOLMAN, 1983) e também participa na quimiotaxia para linfócitos T, via neutrófilos (BRANDT *et al.*, 1994).

As quimiocinas são secretadas nos sítios de inflamação e infecção por células tissulares residentes, leucócitos residentes e recrutados e células endoteliais ativadas

por citocinas. O principal estímulo para a produção destas proteínas são citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e TNF- $\alpha$  e por LPS (BAGGLIOLINI *et al.*, 1994).

### **2.3. Respostas à Injúria Celular e Tecidual: Feridas, Inflamação e Cicatrização**

#### **2.3.1. Feridas**

Uma ferida é representada pela interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, onde há destruição total ou parcial deste, em menor ou maior extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por afecção clínica (CESARETTI, 1998; KUMAR *et al.*, 2005).

As feridas podem ser classificadas de acordo com o tempo de reparação tissular, em agudas e crônicas. As feridas agudas são originadas de cirurgias ou traumas e a reparação ocorre em tempo adequado. As feridas crônicas são aquelas que não são reparadas em tempo esperado e apresentam complicações (SANTOS, 2000).

A pele, por recobrir toda a superfície do corpo, sendo seu maior órgão, protege o animal contra a dessecação e o meio ambiente e mantém a comunicação deste com o exterior (SPENCER, 1991; ARNOLD *et al.*, 1994). Do ponto de vista histológico, está organizada por duas camadas distintas, a epiderme e a derme. A epiderme é a camada mais externa, formada por epitélio pavimentoso estratificado, sendo composta por três diferentes linhagens celulares: os queratinócitos, os melanócitos e as células de Langerhans (ARNOLD *et al.*, 1994; ROSS & ROMRELL, 1994).

A epiderme organiza-se em camadas e de uma maneira geral, em mamíferos e aves é constituída por células epiteliais dispostas em quatro camadas e, à medida que as mais superficiais são eliminadas, as camadas mais profundas são recompostas por divisão celular (ARNOLD *et al.*, 1994; JORGE & DANTAS, 2002). A camada basal ou germinativa é a mais profunda, constitui-se por células prismáticas ou cubóides, apresentando intensa atividade mitótica. A camada malpighiana (ou corpo mucoso) é também denominada camada de células espinhosas e garantem resistência à epiderme. A camada granulosa é composta por uma a quatro fileiras de células alongadas com núcleos ovais ou achatados paralelas à superfície cutânea, que contêm pequenos grânulos intra-citoplasmáticos, os quais podem ser precursores da queratina (JORGE & DANTAS, 2002). Por fim, a camada córnea, constituída por células mortas, anucleadas, desidratadas e com aspecto de finas lâminas superpostas, o citoplasma

dessas células contém queratina que proporciona proteção contra traumas físicos e químicos (ARNOLD *et al.*, 1994).

A derme é uma espessa camada de tecido conjuntivo fibroso, cuja matriz extracelular contém fibras colágenas, elásticas e reticulares. Nesta camada, situam-se os anexos da pele, terminações nervosas, além de vasos sanguíneos e linfáticos. É dividida em camada papilar e camada reticular profunda. Esta camada fornece base firme para a epiderme. As fibras colágenas proporcionam grande força de tensão e as fibras elásticas dão flexibilidade a pele (ARNOLD *et al.*, 1994; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

As bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium* compõem a flora normal da pele no indivíduo podendo ocorrer a patogenicidade oportunista, onde os microrganismos invadem e infectam o organismo quando as defesas estão enfraquecidas (TRABULSI *et al.*, 1999; SPICER, 2000).

A perda tecidual pode atingir a derme completa ou incompletamente, ou mesmo atingir todo o órgão; logo, as feridas podem ser: Espessura Parcial (derme incompleta), freqüente após muitos procedimentos dermatológicos (p. ex., *peelings*) ou por traumatismos. Sua reparação faz-se pela reepitelização, recompondo os anexos epiteliais ou o epitélio derivado da pele adjacente não acometida; ou podem ser de Espessura Total (derme completa ou estendida ao tecido subcutâneo), as quais necessitam da formação de um novo tecido (FAZIO *et al.*, 2000).

Outra forma de classificação baseia-se no processo de reparo, como: feridas com cicatrização por Primeira Intenção, quando não há perda de tecido e as extremidades da pele ficam justapostas uma à outra através de sutura cirúrgica; Nas feridas com Cicatrização por Segunda Intenção, ocorre perda de parte de tecido da área da lesão e as extremidades da pele ficam distantes umas das outras não havendo possibilidade de aproximação das bordas com o uso de suturas e apresentam maior quantidade de tecido de granulação (DOUGHTY, 1992; ANDRADE, 1999; ROBBINS *et al.*, 2005), e, por fim podem ser classificadas como de Terceira Intenção, em que a ferida é deixada aberta por um determinado período, sendo suturada posteriormente (DOUGHTY, 1992).

Todas as formas de lesão tecidual começam com alterações moleculares ou estruturais nas células, caracterizadas pela perda da manutenção da integridade da membrana celular através do equilíbrio iônico e osmótico com o meio extracelular; comprometimento da oxidação fosforilativa e produção de ATP nas mitocôndrias

devido ao suprimento insuficiente de oxigênio na região lesionada e da síntese de enzimas e proteínas ocasionada pelo extravasamento de material genético para o meio a partir da destruição da membrana plasmática (KUMAR *et al.*, 2005).

As tentativas humanas de intervir no processo de cicatrização das feridas, acidentais ou provocadas intencionalmente como parte da realização de procedimentos, remontam à Antiguidade, demonstrando que desde então já se reconhecia à importância de protegê-las de forma a evitar que se complicassem e repercutissem em danos locais ou gerais para o paciente (MANDELBAUM *et al.*, 2003). Há relatos que na pré-história se aplicavam sobre as feridas vários agentes como extratos de plantas, água, neve, gelo, frutas e lama (ANDRADE *et al.*, 1992). Hipócrates sugeria que as feridas contusas fossem tratadas com calor e pomadas para promover a supuração e reduzir a inflamação e que as mesmas fossem mantidas limpas e secas. No início da era Cristã, Celsus preconizava o fechamento primário das feridas recentes e desbridamento das contaminadas para posteriormente serem suturadas (ABLA & ISHIZUKA, 1995).

Existem muitas pesquisas em andamento e há perspectivas de desenvolvimento de novas tecnologias que visam não só aperfeiçoar o processo cicatricial, como reduzir as complicações (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

A definição de uma conduta terapêutica sofre influência direta da causa, tempo de existência, presença ou não de infecção. Acrescentando-se a isso, deve ser avaliada a dor, edema, extensão e profundidade da lesão, as características do leito da ferida, características da pele ao redor e exsudato. Esta avaliação deverá ser realizada de forma periódica, e é de extrema importância acompanhar a evolução do processo cicatricial e a cobertura utilizada (BRYANT, 1992).

O processo cicatricial depende de inúmeras etapas, a presença de infecção e a formação de radicais livres podem contribuir para o retardamento ou inibição do processo (KUDI *et al.*, 1999). Feridas infectadas cicatrizam mais lentamente e caso não sejam tratadas podem ocasionar infecções sistêmicas (INNGJERDINGER *et al.*, 2004).

Plantas apresentando atividade cicatrizante têm sido pesquisadas, dentre elas podem-se citar o *Tridax procumbens*, *Trigonella foenumgraecum*, *Leucas lavandulaefolia*, *Aloe vera*, *Callendula officinalis* (UDUPA *et al.*, 1995; TARANALLI & KUPPAST, 1996; SAHA *et al.*, 1997; CHITRA *et al.*, 1998; MENEZES, 2006). O látex do *Calotropis procera* vem sendo estudado quanto ao seu

potencial na cicatrização de feridas e, em um experimento com porcos da Índia, demonstrou que o processo cicatricial foi otimizado, por um acréscimo na deposição de colágeno, síntese de proteína e DNA e epitelização, contribuindo para a redução da área da ferida (RASIK *et al.*, 1999).

### **2.3.2. Reparação de lesões**

Os tecidos vivos respondem a uma injúria. Este fenômeno normalmente leva à reparação da estrutura e função, elemento chave para manutenção da homeostase tecidual. Em todos os níveis da organização biológica, a injúria é reconhecida e, se possível, reparada; caso contrário, as células e tecidos danificados devem ser descartados. Caso a injúria seja muito extensa ou persistente, este processo é comprometido e a integridade estrutural será mantida através da substituição das estruturas danificadas por material fibroso (HENSON, 2005).

Para se obter a cura de um ferimento, eventos químicos e celulares devem suceder-se em uma seqüência apropriada e o resultado é geralmente uma cicatriz de tecido conjuntivo, representando o somatório dessas etapas (KUMAR *et al.*, 2005). Assim, o reparo de feridas consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem de forma harmoniosa para que ocorra a regeneração e a reconstituição do tecido, a partir das suas células nativas (ORTONE & CLÉVY, 1994) ou pela substituição das células danificadas por tecido conjuntivo fibroso, processo conhecido como cicatrização. De qualquer forma, ao ocorrer a perda tecidual, o fisiologismo volta-se completamente para o reparo de um evento danoso ao organismo (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

No aspecto didático, este processo é dividido em fases: hemostasia, fase inflamatória, fase proliferativa e de remodelação da matrix extracelular (BRANSKI *et al.*, 2005; SHIMIZU, 2005). Tais etapas estão ilustradas esquematicamente na Figura 3.

Outros autores subdividem o processo em cinco fases principais: 1. Coagulação; 2. Inflamação; 3. Proliferação; 4. Contração da ferida; 5. Remodelação (FAZIO *et al.*, 2000). Com o término desta etapa, os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas sofrem regeneração limitada e a coloração da cicatriz permanece pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficiente (JOHNSTON, 1990; DI PIETRO & BURNS, 2003).

**Figura 3.** Etapas do processo cicatricial de lesões cutâneas. Fonte: *Experts Reviews in Molecular Medicine*©, 2003. Cambridge University Press.

#### **2.3.2.1. Coagulação**

Ocorre logo após o tecido ser lesionado, e depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação (TERKELTAUB & GINSBERG, 1988). Uma cobertura primária composta de fibrina restabelece a hemostase (SANTORO & GALDINO, 2005). Substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases são liberadas e ordenam o desencadeamento das outras fases (CLARK, 1985). Quase concomitante ao estímulo lesivo, devido à influência nervosa (descargas adrenérgicas) e ação de mediadores oriundos da desgranulação de mastócitos, ocorre a vasoconstrição como primeira resposta. A injúria do endotélio dispara uma seqüência de eventos, iniciando-se com a deposição de plaquetas, prosseguindo com sua ativação e posterior recrutamento de novas plaquetas. O resultado dessa seqüência é a formação de um trombo rico em plaquetas, que provisoriamente tampona a lesão endotelial (LEFKOVITIS *et al.*, 1995). Esse trombo rico em plaquetas é rapidamente infiltrado pela fibrina, transformando-se em um trombo fibrinoso. Logo após, os eritrócitos são capturados por essa rede fibrinosa e forma-se então o trombo vermelho; principal responsável pela oclusão do vaso sanguíneo rompido (DAVIES, 1990). Este, além de limitar a perda de constituintes circulatórios para os interstícios celulares, fornece uma matriz preliminar, que servirá de base para a migração das

células responsáveis pelo desencadeamento do processo de reparo. A adesão inicial das plaquetas à superfície lesada ocorre pelas proteínas de adesão presentes na sua membrana. As principais delas são os receptores da glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa). Esse receptor possui sítios de ligação para o fibrinogênio, fator de von Willebrand, vibronectina, fibronectina e trombospondina (WAGNER *et al.*, 1996). Em seguida, as plaquetas são ativadas por um grande número de substâncias agonistas presentes na matriz subendotelial e na corrente sanguínea. Contribuindo também para a agregação plaquetária, o ácido araquidônico da membrana das plaquetas em processo de agregação, é convertido em Tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) pelas enzimas ciclooxigenase e tromboxane sintetase. O TxA<sub>2</sub>, além de forte agonista da agregação plaquetária, é um potente vasoconstritor e, também, indutor da exposição dos sítios de ligação da GP IIb/IIIa ao fibrinogênio e fator de von Willebrand. Outro importante derivado do araquidonato, que é liberado por macrófagos, mastócitos, plaquetas ativadas e por outras células ativadas, é o PAF. Este é um ativador importante de plaquetas e indutor de sua agregação (LEFKOVITIS *et al.*, 1995).

As plaquetas ativadas liberam fatores de crescimento como o TGF  $\beta$  (fator de crescimento transformante  $\beta$ ) e o PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas), quimiocinas como o CTAP-III (citocina ativadora do tecido conjuntivo) e também outras proteínas como o fibrinogênio, fibronectina e tromboplastina que são encontradas em seus grânulos. A interação das proteínas dos grânulos plaquetários com proteínas da matriz extracelular somados à massa de corpos plaquetários agregados, ao se estabilizarem, forma uma matriz provisória. Esta se torna mais consistente à medida que a fibrina se polimeriza (LEFKOVITIS *et al.*, 1995).

### **2.3.2.2. Fase Infamatória**

Esta fase está ligada intimamente à fase anterior e depende de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

Os neutrófilos aderem-se ao local da lesão após poucas horas da ocorrência da injúria, através de quimiotaxia por mediadores liberados por plaquetas, células pertencentes ao sistema imune, microrganismos ou pela ativação do complemento (SZPADERSKA & DIPIETRO, 2005). Além dos mediadores liberados durante a agregação plaquetária, o recrutamento de mais neutrófilos é influenciado também por quimiocinas produzidas pelos neutrófilos coletados pelo trombo provisório (BRANDT *et al.*, 2000). Os neutrófilos oriundos da circulação são as primeiras

células a alcançarem à região inflamada, sendo os tipos celulares predominantes entre o primeiro e o segundo dias. Sua função principal neste processo é de eliminação de possíveis microorganismos pela fagocitose (MURDOCH & FINN, 2000). Além de sua função fagocitária, os neutrófilos apresentam ação pró-inflamatória pela liberação de citocinas que ativam fibroblastos e queratinócitos (WERNER & GROSE, 2003).

Após um ou dois dias, monócitos teciduais entram no local da lesão e se diferenciam em macrófagos que participam e concluem o processo inflamatório e realizam debridamento no local da lesão, ao contrário do papel desempenhado pelos neutrófilos, o macrófago é o elemento mais crítico na indução do processo de reparo. Seu efeito antimicrobiano é realizado através de fagocitose e pela liberação de radicais livres, tais como oxigênio, óxido nítrico (NO) e peróxido (DI PIETRO, 1995; SCHAFFER *et al.*, 1996). Ainda, por influência de ligantes a seus receptores de membrana, os macrófagos produzem e exportam mediadores lipídicos (eicosanóides), mediadores peptídicos (citocinas e fatores de crescimento), outras proteínas (tais como frações do complemento e fatores de coagulação) e enzimas relacionadas ao reparo (tais como colagenases, matriz de metaloproteases). Além da ativação por ligantes, os macrófagos podem ser também ativados por alterações físico-químicas do microambiente. Hipóxia, pH baixo e alta concentração de ácido lático, ativam o macrófago para a produção de fatores de crescimento (BALBINO *et al.*, 2005). Os macrófagos secretam fatores de crescimento que não só promovem a proliferação celular e síntese protéica, como também a produção de componentes da matriz extracelular. (DI PIETRO, 2003).

Entre as citocinas liberadas pelos macrófagos estão: Fator de crescimento derivado de plaqueta (PGDF); Fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ); Fator de crescimento epidermal (EGF); Fator de necrose tumoral; Fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), entre outras, provocam o influxo de neutrófilos, bem como a migração e proliferação de células endoteliais, fibroblastos e células indiferenciadas que começarão a repopular o sítio da lesão (WERNER & GROSE, 2003). Estes fatores são mitogênicos e quimiotáticos para células endoteliais que circundam a lesão e migram até estas para formar novos vasos sanguíneos. Além disso, a interleucina-4 (IL-4), citocina secretada por macrófagos, é responsável pela formação do tecido (por exemplo, produção de colágeno por fibroblastos) (BRANSIK *et al.*, 2005).

Os linfócitos aparecem na ferida em aproximadamente uma semana, mas seu

papel não está bem esclarecido, porém sabe-se, que com suas linfocinas, tem importante influência sobre os macrófagos (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

### **2.3.2.3. Proliferação**

É dividida didaticamente em três subfases: reepitelização, fibroplasia e angiogênese.

Na reepitelização ocorre a migração de queratinócitos não danificados das bordas da ferida e dos anexos epiteliais. Na pele íntegra, os queratinócitos estão ligados à membrana basal, caso ocorra uma lesão, haverá a locomoção destas células através da contração dos filamentos de actinmiosina e inserção nos novos complexos de adesão (MARTIN, 1997). Fatores de crescimento são os prováveis responsáveis pelo aumento das mitoses e hiperplasia do epitélio (CHRISTOPHER, 1972).

A Fibroplasia é caracterizada por um aumento do número de fibroblastos, responsáveis por iniciar a síntese e secreção de componentes da matriz extracelular (CONTRAN *et al.*, 1999). A migração e ativação de fibroblastos são intensificadas através dos macrófagos e mediadores químicos produzidos por eles. Os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação. Com o aumento do tecido de granulação para a produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico e para a sua eficiência é necessária a ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, é necessária a neovascularização da região (KNIGHTON *et al.*, 1981; KUMAR *et al.*, 2005).

A fibroplasia e a neoformação da matriz extracelular são extremamente importantes na formação do tecido de granulação (por volta do quarto dia). Este é definido como uma coleção de elementos celulares, incluindo fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares da matriz, como a fibronectina, as glicosaminoglicanas e o colágeno tipo I e II (GUIDUGLI-NETO, 1987; GUIDUGLI-NETO, 1992). Este tecido é edematoso e caracterizado pela presença de muitos espaços vazios, devido a imaturidade dos vasos, os quais, são extremamente exsudativos e sangram com facilidade (ECKERSLEY & DUDLEY, 1988). São vários os fatores responsáveis pela formação do tecido de granulação, entre eles, os fatores de crescimento responsáveis pela migração e diferenciação das células necessárias a formação do tecido, os macrófagos presentes na ferida e as plaquetas também são contribuintes do processo. O fibroblasto produz colágeno, elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, além de ser uma célula crítica

na formação da matriz e responsável pela formação do tecido de granulação (CARVALHO, 2002).

Na fase de angiogênese ocorre o crescimento de capilares em resposta ao  $\beta$ -FGF (fator de crescimento de fibroblastos  $\beta$ ) e TGF- $\beta$  secretados por monócitos e possivelmente queratinócitos (IBA *et al.*, 2004). Esta fase é essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

Várias etapas compreendem a formação da neovascularização da ferida. Fatores de crescimento deverão ser secretados por células e ligar-se a receptores nas células alvo. Alguns peptídeos, como por exemplo, o Fator de Crescimento Tumoral (TGF- $\beta$ ), que não causa mitose nas células endoteliais, porém, é importante na angiogênese porque provoca a entrada de células inflamatórias pró-angiogênicas no local da lesão. Quando as células endoteliais são estimuladas, proliferam-se, utilizam proteases para criar novas vias migratórias ao local da lesão. Uma vez que os vasos são formados, elementos sanguíneos podem fluir através destes (ARBISER, 1996). A maioria dos mediadores envolvidos na fibroplasia como MCP-1 (proteína quimiotática para monócitos 1), IL-8 (Interleucina-8), CTGF (Fator de crescimento do tecido conjuntivo), GM-CSF (Fator de estimulação de crescimento de granulócitos e monócitos), FGFs (fator de crescimento fibroblástico) também possuem atividade angiogênica (BALBINO *et al.*, 2005). Ao final da etapa de proliferação, o leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, a circulação está restabelecida pelo neovascularização e a rede linfática está passando por regeneração. Lentamente o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas o que começa a dar à região lesada a aparência de cicatriz devido ao acúmulo de massa fibrosa (GUIDUGLI-NETO, 1987).

#### **2.3.2.4. Contração da ferida e fase de remodelamento**

A contração da ferida caracteriza-se pelo movimento centrípeto das bordas da ferida. (STEGMAN *et al.*, 1982).

A fase de remodelamento ocorre por volta do décimo dia podendo durar meses e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. O tecido de granulação vai sendo enriquecido com mais fibras

de colágeno e começa a adquirir a aparência de massa fibrótica característica da cicatriz. Nesta etapa, surgem as primeiras fibras de colágeno tipo I (CLARK, 1993). Com a evolução do processo, acentua-se a deposição de colágeno e a maioria das células desaparecem formando finalmente a cicatriz. A resolução completa da ferida somente pode ser considerada depois de concluída a maturação e remodelagem da matriz extracelular. Este processo ocorre lentamente levando de muitos meses ou às vezes anos e, mesmo assim, uma cicatriz madura possui apenas 70% da resistência da pele normal (BALBINO *et al.*, 2005). Os fibroblastos produzem e depositam grande quantidade de matriz protéica, predominantemente composta de colágeno tipo I e II, aumentando a força tênsil da lesão (MUTSAERS *et al.*, 1997).

Os eosinófilos aparecem nas últimas fases da reparação e presumi-se que podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento (TODD *et al.*, 1991). Quando a ferida completou o seu fechamento, os linfócitos constituem o subsistema leucocitário mais abundante em feridas humanas (ENGELHARD *et al.*, 1998). Os linfócitos não somente são efetores imunes, mas também, produtores de fatores de crescimento. Nesta etapa, eles são atraídos para a região da ferida em igual número que os monócitos.

A resistência de uma cicatriz é dada pela quantidade de colágeno depositada e pela forma com que as fibras estão organizadas. Quanto maior o número de ligações covalentes transversais, maior a resistência da cicatriz. O colágeno é a estrutura protéica que compõe 72% da derme; as fibras colágenas são produtos polimerizados das moléculas precursoras solúveis que são secretadas pelos fibroblastos, osteoclastos, condroblastos e outras células. Esta proteína é formada por três polipeptídios, cadeias  $\alpha$ , que são formadas por cerca de 1000 aminoácidos. O colágeno possui uma quantidade alta de prolina em relação às demais proteínas, a prolina e a hidroxiprolina correspondem a 20-25% dos radicais de aminoácidos (CAMPBELL, 2003).

O processo de remodelamento da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão, agregação e orientação de fibrilas de colágeno. A deposição do colágeno é feita a princípio de maneira aleatória tendo a orientação da fibronectina e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras são subsequentemente digeridas pela colagenase, ressintetizadas, rearranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes. Repetições sucessivas da lise, ressíntese, redirecionamento e

religação formam fibras maiores de colágeno e resultam numa configuração mais regular da cicatriz aumentando a sua resistência (CLARK, 1985). A collagenase é produzida por vários tipos celulares na ferida, tais como, os leucócitos, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais (CARVALHO, 2002). As collagenases degradam, especificamente, colágeno tipo I, II e III presente no tecido conjuntivo. Estas enzimas desfazem a estrutura helicoidal das fibras de colágeno, resultando na desnaturação protéica, deixando-a em forma de gelatina que é susceptível a clivagem enzimática por outras metaloproteases de matriz (MMPs) e proteases. As MMP-2 e MMP-9 são duas proteases gelatinolíticas mais atuantes no processo de cicatrização de lesões (ARMSTRONG & JUDE, 2002).

A clivagem do colágeno pela MMP é relacionada a motilidade celular através das interações célula-matriz. Estas interações geralmente são mediadas pelas integrinas, como a  $\alpha_2\beta_1$ , que é o maior receptor de superfície celular e para o colágeno tipo I (MESSENT *et al.*, 1998). O tipo de colágeno secretado inicialmente na fase proliferativa é do tipo III que posteriormente, por degradação, é substituído por colágeno do tipo I (STEVENS & LOWE, 1996).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados 38 camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos, com 10 semanas de idade com peso de  $38,0 \pm 3,0$  g nos experimentos de peritonite em camundongos, permeabilidade vascular e no modelo de feridas cutâneas, e 232 Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com peso de  $170,0 \pm 33,0$  g nos demais experimentos. Os animais foram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFC). Os animais permaneceram em gaiolas individuais, em macroambiente controlado (fotoperíodo de 12h claro/escuro, temperatura  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade  $55 \pm 10\%$ ) com fornecimento *ad libitum* de ração e água.

Os procedimentos utilizados neste trabalho foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal do Ceará.

#### 3.2. Látex

O látex de *Cryptostegya grandiflora* R.Br. (Asclepiadaceae) foi coletado de plantas não cultivadas em Maranguape, região metropolitana de Fortaleza-Ceará (Figura 4); a planta identificada (amostra espécime n° 040409) foi depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará e a extração das proteínas presentes no mesmo foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais da Universidade Federal do Ceará, de acordo com a metodologia desenvolvida para o látex do *Calotropis procera* descrita por FREITAS *et al.* (2007).

O látex coletado foi acondicionado em água destilada na diluição de 1:2 (v/v) sendo agitado delicadamente para evitar a coagulação natural do material. As amostras foram então centrifugadas a 5000g durante 10 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ . O precipitado rico em borracha foi removido e o sobrenadante exaustivamente dializado em água destilada utilizando-se membranas com *cut-off* de 8000 kDa. A

diálise foi realizada com trocas a cada 4 horas para retirada de íons, e moléculas pequenas livres e nova centrifugação foi realizada de acordo com as condições descritas acima. O sobrenadante livre de borracha foi liofilizado e utilizado nos experimentos. Este liofilizado foi denominado de fração LP (CgLP).

**Figura 4:** Coleta do látex de *C. grandiflora* em Maranguape, Ceará .

### **3.3. MODELOS EXPERIMENTAIS**

#### **3.3.1. Avaliação da atividade pró-inflamatória**

##### **3.3.1.1. Modelo de peritonite**

A migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex de *C. grandiflora* foi avaliada por sua administração intraperitoneal (i.p.) nas doses de 1; 2,5 e 5 mg/cavidade em 1 mL de NaCl 0,15M estéril. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical ao final da 4ª hora após a administração desta fração. Em seguida, as células presentes na cavidade peritoneal foram coletadas através da lavagem destas cavidades injetando-se 10 mL de NaCl 0,15 M contendo 5 UI/mL de heparina. Os abdomens dos animais foram levemente massageados, e através de uma incisão foram coletados cerca de 7 mL de fluido peritoneal, com pipeta de Pasteur de plástico (Figura 5). As contagens total e diferencial de leucócitos foram realizadas conforme metodologia descrita por Souza & Ferreira (1985). Neste procedimento, 20 µL do fluido coletado de cada animal foram diluídos em 380 µL do reagente de Turk e posteriormente usados para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células foi realizada através de esfregaços corados em lâminas, para tanto, 50 µL do exsudato foram centrifugados em citocentrífuga a 400 x g, durante 10 min. Após este processo, os esfregaços foram corados pelo método de hematoxilina-eosina (corante HEMA 3). A contagem diferencial dos leucócitos foi feita usando-se microscopia óptica e expressa como a média ± E.P.M. do número de neutrófilos/µL do fluido peritoneal e comparados aos valores obtidos nos grupos controle do experimento, ou seja, animais que foram injetados apenas com NaCl 0,15 M estéril.

**Figura 5. Modelo de peritonite.** Injeção intraperitoneal da fração LP do látex de *Cryptostegya grandiflora* (A); Incisão e retirada da pele da região abdominal (B); Exposição do peritônio (C); Incisão do peritônio (D); Coleta do fluido peritoneal (E).

### **3.3.1.2. Curso Temporal da Migração de Leucócitos para cavidade peritoneal induzida pela fração LP do látex de *Cryptostegya grandiflora***

A fração LP do látex de *C. grandiflora* foi administrada nos ratos por via intraperitoneal na menor dose que induziu migração de neutrófilos no modelo de peritonite. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical ao final de intervalos de tempo que variaram de zero a 72 horas, sendo a migração de leucócitos avaliada no fluido peritoneal, conforme descrito no item 3.3.1.1.

### **3.3.1.3. Efeito da desnaturação térmica da fração LP do látex *Cryptostegya grandiflora* sobre a migração de neutrófilos induzida por esta fração**

A fração LP em solução foi submetida à fervura (100°C) durante 10 min. Em seguida esta fração foi testada no modelo de peritonite, seguindo a metodologia

descrita no item 3.3.1.1. Os resultados obtidos foram comparados àqueles obtidos com a fração LP não desnaturada.

#### **3.3.1.4. Modulação farmacológica da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela fração LP do látex de *Cryptostegya grandiflora***

Com o objetivo de se investigar possíveis mediadores envolvidos na migração de neutrófilos induzida pela fração LP, esta foi administrada i.p. (2,5 mg/cav.) em diferentes grupos de animais pré-tratados com diferentes bloqueadores farmacológicos como a seguir: dexametasona (2 mg/Kg; s.c.); talidomida (200 mg/Kg; s.c.); celecoxibe (30 mg/Kg, s.c.), cimetidina (30 mg/kg) 1 hora antes da administração da fração e com indometacina (3mg/Kg; s.c) e PCA (10 mg/Kg; s.c.), 30 min antes da fração LP. A maioria das substâncias foi preparada em solução estéril de NaCl 0,15 M, com exceção: 1, talidomida foi dissolvida em NaCl 0,15M acidificada, pH 5,0; 2, PCA dissolvido em DMSO; 3, indometacina dissolvida em NaCl 0,15 M alcalinizada, pH 8,0.

A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após a administração da fração LP como descrito anteriormente no item 3.3.1.1. Os resultados foram comparados com os do grupo controle positivo de migração (animais tratados i.p. somente com a fração LP) e com o grupo controle negativo (animais que receberam somente NaCl 0,15 M estéril).

#### **3.3.1.5. Mudanças na população de células residentes da cavidade peritoneal**

Com o objetivo de investigar se a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos induzida pela fração LP é um efeito dependente ou não de células residentes, e quais destas células poderiam estar envolvidas nesta resposta, foram realizados os seguintes experimentos:

##### **A. Pré-tratamento com tioglicolato: incremento da população de macrófagos residentes na cavidade peritoneal**

Tioglicolato em solução com NaCl 0,15 M (Tg; 3% m/v; 10 mL) foi administrado por via intraperitoneal e, após, 4 dias os macrófagos peritoneais foram coletados, contados e comparados com a contagem obtida em grupo de animais não tratados com Tg (controle), de acordo com a metodologia descrita por Ribeiro *et al.*

(1991).

A Fração LP do látex de *C. grandiflora* (2,5 mg/cavidade) e fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/cav.) foram administrados i.p. em animais tratados ou não com tioglicolato. Conforme descrito para o modelo de peritonite, a migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos, sendo os resultados comparados com os obtidos em animais que receberam somente NaCl 0,15 M estéril i.p.

### **B. Pré-tratamento com o composto 48/80: depleção de mastócitos peritoneais**

A depleção de mastócitos da cavidade peritoneal dos animais pelo composto 48/80, foi realizada pelo método descrito anteriormente por Di Rosa *et al.* (1971). Para tanto, os animais foram pré-tratados i.p., durante quatro dias consecutivos, duas vezes ao dia com o composto 48/80. As dosagens utilizadas foram: no primeiro dia 0,6 mg/Kg, no segundo dia 1,0 mg/Kg, no terceiro dia 1,2 mg/Kg e no quarto dia 2,4 mg/Kg. No quinto dia após o início do tratamento, a depleção dos mastócitos foi avaliada através da coleta do fluido peritoneal dos animais o qual foi diluído (1:5) em azul de toluidina e a contagem realizada em câmara de Neubauer.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos no grupo de animais não tratados com o composto 48/80. A viabilidade celular foi avaliada, observando-se o número de mastócitos íntegros ou degranulados e também pela presença de células contaminantes.

A Fração LP na dose de 2,5mg/cav e fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/cav.) foram injetados i.p. em animais tratados ou não com composto 48/80. A migração de neutrófilos foi quantificada 4 h após a injeção dos estímulos e os resultados comparados aos respectivos controles.

### **3.3.2. Bolsa de ar subcutânea (“Air pouch”)**

O “air pouch” foi produzido na pele do dorso dos animais de acordo com método descrito por Edwards *et al.* (1981). Inicialmente, após depilação do dorso dos animais e assepsia com álcool iodado foram injetados subcutaneamente 20 mL de ar estéril. Três dias após, a cavidade formada foi mantida injetando-se 10 mL de ar. No sexto dia após a injeção inicial de ar os animais foram utilizados para os experimentos de migração.

A avaliação da migração de neutrófilos seguiu ao procedimento experimental descrito para o modelo de peritonite (item 3.3.1.1). A fração LP (2,5 mg) foi administrada em 1 mL de solução/bolsa. Os animais foram sacrificados seis horas após a injeção desta fração e a lavagem da cavidade artificial foi realizada com 5 mL de NaCl 0,15 M heparinizado. A migração de neutrófilos para a bolsa de ar foi avaliada pela contagem total e diferencial dos leucócitos. O grupo controle do experimento constituiu-se de animais que receberam 1 mL de NaCl 0,15 M estéril.

### **3.3.3. Modelo de edema de pata.**

Os volumes das patas direitas de cada animal foram medidos plestimograficamente antes da administração local da fração LP, considerando-se este o tempo zero. Em seguida, esta fração foi injetada por via subcutânea intraplantar (0,25 mg, 0,5 mg e 1 mg) em 0,1 mL de NaCl 0,15 M estéril. Os volumes de líquido deslocados pelas patas foram medidos 30 minutos e 1, 2, 3, 4 e 6 h após a administração da fração LP. O edema foi calculado como a variação de volume, ou seja, a diferença entre o volume em um determinado tempo após o estímulo e o volume antes do estímulo (tempo 0). As áreas sob as curvas (ASC) foram calculadas usando método do trapézio segundo Landucci *et al.*(1995).

Os resultados foram expressos como volume de edema (mL) e também unidades arbitrárias (ASC) sendo comparados aqueles obtidos nas patas dos animais que foram injetados com 0,1 mL de NaCl 0,15 M.

### **3.3.4. Atividade da Mieloperoxidase (MPO) nas patas dos animais**

A determinação da atividade da mieloperoxidase foi avaliada no edema de pata, induzido pela fração LP do látex (0,25 mg/pata) conforme item 3.3.3. A atividade da MPO foi determinada por um ensaio cinético-colorimétrico descrito por Souza *et al.* (2001) com algumas alterações.

Após 60 min da indução do edema, amostras do tecido das patas dos animais foram coletadas, pesadas e trituradas em Politron Ultra-Max em solução (1 mL/50ug da amostra HTAB), sob condições adequadas de refrigeração. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 4<sup>o</sup> durante 2 min a 14000 rpm. Adicionou-se 0,1 mL do precipitado obtido a 2 mL da solução de O-diasidina e foi realizada a leitura da

absorbância a 460 nm no espectrofotômetro em 1 e 3 min.

A atividade de MPO foi comparada a uma curva padrão de neutrófilos de ratos processado da mesma maneira. Os resultados foram apresentados como a atividade de MPO (número de neutrófilos/mg de tecido).

### **3.3.5. Modulação farmacológica no modelo do edema de pata induzido pela fração LP do látex de *Cryptostegya grandiflora***

Com o objetivo de se investigar possíveis mediadores envolvidos na migração de neutrófilos induzida pela fração, esta foi administrada por via subcutânea intraplantar (0,25 mg/pata) em diferentes grupos de animais pré-tratados com diferentes bloqueadores farmacológicos como a seguir: dexametasona (2 mg/Kg; s.c.); talidomida (200 mg/Kg; s.c); celecoxibe (30 mg/Kg, s.c.), cimetidina (30 mg/kg) 1 hora antes da administração da fração e com indometacina (3mg/Kg; s.c) e PCA (10 mg/Kg; s.c.), 30 min antes da fração.

Os volumes das patas direitas de cada animal foram medidos plestimograficamente antes da administração local da fração LP do látex, considerando-se este o tempo zero. Os volumes de líquido deslocados pelas patas foram medidos 30 min. e 1, 2, 3 e 4 h após a administração desta fração. O edema foi calculado como a variação de volume, ou seja, a diferença entre o volume em um determinado tempo após o estímulo e o volume antes do estímulo (tempo 0). As áreas sob as curvas (ASC) foram calculadas usando método do trapézio segundo Landucci *et al.*(1995).

Os resultados foram expressos como volume de edema (mL) e também unidades arbitrárias (ASC) sendo comparados aqueles obtidos nas patas dos animais injetados com 0,1 mL de NaCl 0,15 M.

### **3.3.6. Avaliação da atividade pró-inflamatória da fração LP do látex de *C. grandiflora* em camundongos**

#### **3.3.6.1. Modelo de peritonite**

Para avaliação da migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex de *C. grandiflora*, esta foi administrada intraperitonealmente (i.p.) nas doses de 2,5

mg/cavidade em 300 µL de NaCl 0,15 M estéril. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical ao final da 4ª hora após a injeção da fração. Em seguida, as células presentes na cavidade peritoneal foram coletadas através da lavagem destas cavidades injetando-se 3 mL de NaCl 0,15 M contendo 5 UI/mL de heparina. Os abdomens dos animais foram levemente massageados, e através de uma incisão foram coletados cerca de 3 mL de fluido peritoneal, com pipeta de Pasteur de plástico. As contagens total e diferencial de leucócitos foram realizadas conforme metodologia descrita por Souza & Ferreira (1985). Neste procedimento, 20 µL do fluido coletado de cada animal foram diluídos em 380 µL do reagente de Turk e posteriormente usados para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células foi realizada através de esfregaços corados em lâminas, para tanto, 50 µL do exsudato foram centrifugados em citocentrífuga a 400 x g, durante 10 min, após este processo os esfregaços foram corados pelo método de hematoxilina-eosina (corante HEMA 3). A contagem diferencial dos leucócitos foi feita usando-se microscopia óptica e expressa como a média ± E.P.M. do número de neutrófilos/µL do fluido peritoneal e comparados aos valores obtidos nos grupos controle do experimento, ou seja, animais que foram injetados apenas com NaCl 0,15 M estéril.

### **3.3.6.2. Determinação da permeabilidade vascular em camundongos**

Essa metodologia foi delineada com o objetivo de avaliar o efeito da fração LP do látex sobre o aumento da permeabilidade. A quantificação baseou-se naquela utilizada por Garcia-Leme & Wilhelm (1975). Os animais receberam a fração LP (2,5 mg/cavidade em 300 µL de NaCl 0,15 M estéril) através da injeção intraperitoneal, em seguida administrou-se uma solução de Azul de Evans em NaCl 0,15 M (50mg/kg) via plexo orbital. Após quatro horas os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os abdomens dos animais foram levemente massageados, e através de uma incisão foram coletados cerca de 3 mL de fluido peritoneal, com pipeta de Pasteur de plástico. Em seguida, para se quantificar o azul de Evans foi realizada a leitura por espectrofotometria, utilizando-se o comprimento de onda de 600nm. Os dados obtidos em absorbância foram convertidos em µg de azul de Evans, através de regressão linear baseado em uma curva padrão de azul de Evans. Os resultados foram calculados em mg de AE/mL de fluido peritoneal.

### **3.3.7 Estudo da atividade antiinflamatória da fração LP do látex de *C. grandiflora***

### **3.3.7.1. Avaliação do efeito da fração LP do látex de *C. grandiflora* sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por agente quimiotático indireto (carragenina)**

Os animais (ratos Wistar machos) receberam por via i.p. o estímulo inflamatório: Cg (500 µg/cavidade) dissolvido em 1 mL de NaCl 0,15 M estéril. A fração LP (2,5mg/Kg) foi administrada por via endovenosa, 30 min antes da injeção do agente inflamatório. Para controle negativo do experimento foram utilizados ratos que receberam NaCl 0,15 M estéril i.v.

A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após. Para tanto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, as células presentes na cavidade peritoneal foram coletadas através da lavagem desta injetando-se 10 mL de NaCl 0,15 M contendo 5 UI/mL de heparina. Os abdomens dos animais foram levemente massageados, e através de uma incisão foram coletados cerca de 7 mL de fluido peritoneal, com pipeta Pasteur de plástico.

As contagens total e diferencial dos leucócitos foram realizadas conforme metodologia descrita anteriormente por Souza & Ferreira (1985). Neste procedimento, 20 µL do fluido coletado de cada animal foram diluídos em 380 µL do reagente de Turk e posteriormente usados para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células foi realizada através de esfregaços corados em lâminas, para tanto, 50 µL do exsudato foram centrifugados em citocentrífuga a 400 x g, durante 10 min, após este processo os esfregaços foram corados pelo método da hematoxilina-eosina (HE) e as células contadas através de microscopia óptica sendo os resultados expressos como a média ± E.P.M. do número de células x 10<sup>3</sup>/mL de fluido peritoneal.

### **3.3.8. Efeito da fração LP do látex de *Cryptostegia grandiflora* em modelo experimental de feridas cutâneas em camundongos**

#### **3.3.8.1. Procedimento anestésico e cirúrgico**

Após jejum hídrico e alimentar de 12 horas, os animais foram pesados e anestesiados por via intramuscular com cloridrato de xilazina 2% (10 mg/kg) e cloridrato de ketamina (100 mg/kg). Em seguida, cada animal foi submetido à tricotomia da região dorsal e posterior antisepsia utilizando iodopovidona 1% e etanol 70%. Com auxílio de um molde metálico vazado (área=1cm<sup>2</sup>), previamente esterilizado, a pele foi demarcada com caneta dermatográfica e produziram-se as lesões

através de: incisão da pele, pela lâmina de bisturi número 15; divulsão da tela subcutânea e remoção das camadas de derme e epiderme com o mínimo de sangramento, com tesoura de ponta tipo fina/fina e pinça de dissecação.

### **3.3.8.2. Organização dos grupos e procedimento experimental**

Os animais foram divididos em três grupos experimentais (n=6/grupo) de acordo com a aplicação tópica diária de 100 µL das seguintes soluções: Controle (NaCl)- NaCl 0,15 M, Grupo II (100µg)- 100µg da fração LP do látex de *C. grandiflora* e Grupo III (200µg)- 200µg da fração LP do látex de *C. grandiflora*. Estas aplicações foram realizadas uma vez ao dia durante 12 dias.

### **3.3.8.3. Avaliação Clínica**

As lesões foram avaliadas diariamente a partir de 24 horas pós-cirurgia até o 12<sup>o</sup> dia de pós-operatório a partir de um protocolo clínico (em anexo) e registro fotográfico, observando-se a ocorrência de sinais flogísticos (edema, hiperemia, presença de crosta e exsudato) e os sinais de reepitelização (presença de tecido cicatricial, fechamento completo das feridas e percentual de contração da área da ferida).

A área das feridas foram estimadas através da mensuração dos diâmetros horizontal e vertical, com o auxílio de um paquímetro, e do cálculo da área pela equação descrita por Prata *et al.*, (1988):  $A=p.R.r$ , onde “A” representa a área, “R” o raio maior e “r” o raio menor da ferida.

## **3.4. Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. Para a determinação das diferenças estatísticas entre os grupos, os testes utilizados foram: Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni ou teste t não pareado. No modelo experimental das feridas cutâneas os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $M \pm dp$ ), submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey. Para indicar significância estatística entre os tratamentos foi fixado  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

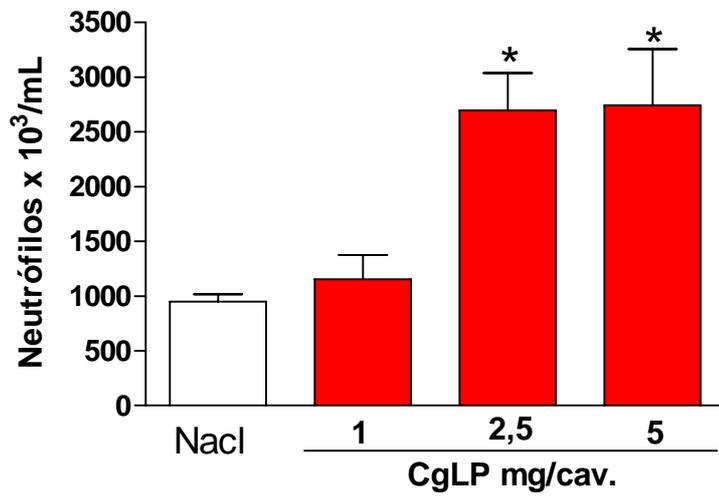
### **4.1. A fração LP do látex de *Cryptostega grandiflora* induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de forma dose-e tempo-dependente no modelo de peritonite em ratos.**

A administração intraperitoneal da fração LP do látex de *Cryptostegia grandiflora* induziu migração de neutrófilos, de forma significativa, para esta cavidade de forma dose-dependente 4 horas após sua injeção. Esta fração apresentou efeito pró-inflamatório crescente nas doses de 2,5 e 5 mg/cavidade, não sendo observada diferença entre estas doses (Figura 6A). Observou-se um aumento na migração de neutrófilos de 184,43% e 189,26% respectivamente, quando comparado ao grupo de animais controle (NaCl). A partir destes resultados a dose de 2,5 mg/cavidade foi utilizada nos demais experimentos.

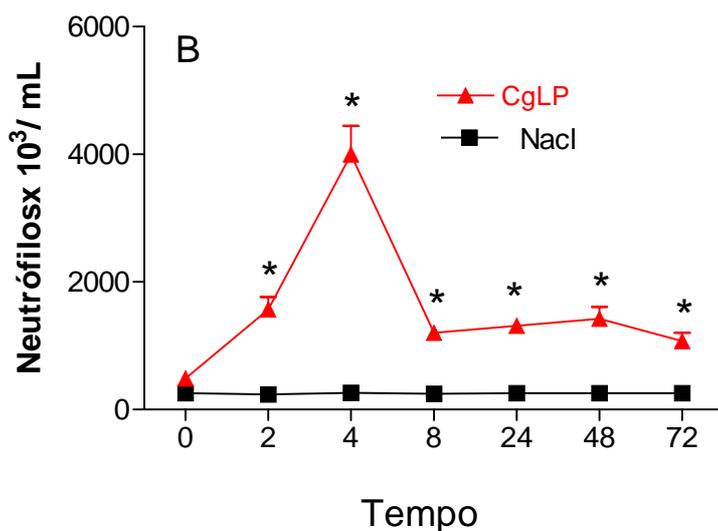
Com o objetivo de investigar o curso temporal desta atividade pró-inflamatória da fração protéica do látex, a migração de neutrófilos foi avaliada 2, 4, 8, 24, 48 e 72 horas após a injeção da mesma (Figura 6B). Observou-se que esta fração induziu um aumento significativo do número de neutrófilos no fluido peritoneal a partir da 2ª hora, o valor máximo observado na 4ª hora, retornando aos valores basais somente na 72ª hora após sua administração.

### **4.2. Desnaturação térmica reverte o efeito pró-inflamatório da fração LP do látex de *Cryptostegia grandiflora*.**

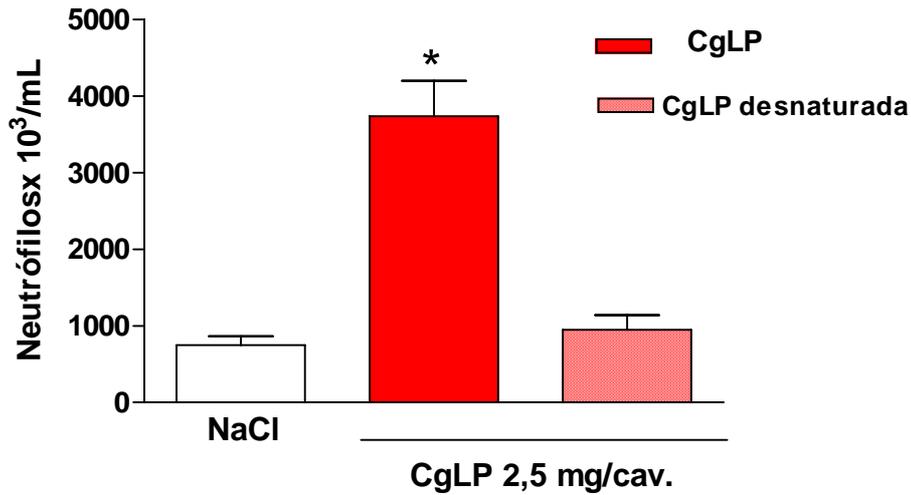
Para realizar uma investigação do papel da estrutura tridimensional dos componentes da fração LP do látex de *C. grandiflora* no seu efeito pró-inflamatório realizou-se o tratamento térmico desta fração a 100 °C por um período de 10 minutos antes de sua administração. Na figura 7 fica evidenciado que a fração LP (2,5 mg/cavidade) desnaturada não induz migração de neutrófilos, quando comparado à fração LP integra.



**B**



**Figura 6. Indução da migração de neutrófilos pela fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP) de forma dose- e tempo dependente. A:** Os animais foram tratados i.p. com 1 mL da fração LP do látex de *C. grandiflora* (1, 2,5 e 5 mg). Os animais controle (NaCl) receberam o mesmo volume de NaCl 0,15 M estéril (i.p.). A migração de neutrófilos (MN) foi avaliada 4 h após. **B:** A fração protéica do látex *C. grandiflora* (Cg LP=2,5 mg) foi injetada i.p. e a migração de neutrófilos foi determinada 2, 4, 8, 24, 48 e 72 h após. Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo NaCl. ANOVA - Bonferroni.



**Figura 7. Ação da desnaturação térmica sobre o efeito pró-inflamatório da fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP).** A fração LP do látex, integro ou desnaturado pelo tratamento a 100 °C por 10 min, foi administrado por via i.p. (2,5 mg). A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após a administração do látex. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de 6 animais. \*  $p < 0.05$

#### **4.3. Talidomida, Dexametasona, indometacina e celecoxib , mas não PCA e cimetidina inibem a migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP) no modelo de peritonite.**

Com a finalidade de investigar os possíveis mediadores químicos envolvidos

na atividade pró-inflamatória da fração LP do látex estudado foi realizado o pré-tratamento dos animais com algumas drogas antiinflamatórias.

Na Tabela 1 está demonstrado que a dexametasona (dexa; 2mg/kg; s.c.) um glicocorticóide com varias atuações antiinflamatórias (inibidor específico de citocinas), e talidomida (Talidomida; 200 mg/kg; s.c.) um inibidor específico de TNF- $\alpha$  inibiram significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela fração LP do látex. A inibição pela dexametasona foi de 73,31%, enquanto a talidomida inibiu em 64,47% o efeito desta fração, comparado aos animais que tratados apenas com a fração LP. O tratamento dos animais com indometacina (Indo; 3 mg/kg; s.c.), inibidor inespecífico das cicloxigenases 1 e 2 (COX 1 e COX 2), bem como, o celecoxib (celecoxib; 30 mg/kg; s.c.), inibidor seletivo da COX-2 inibiram significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela fração LP do látex. A inibição pelo celocoxib foi de 46,11% comparado aos animais que receberam somente o látex. Por outro lado, o tratamento dos animais com PCA (PCA; 10 mg/kg; s.c.), inibidor do fator de agregação plaquetária e com cimetidina (cimetidina; 30 mg/kg; s.c.), antagonista dos receptores H2 (anti-histaminico), não produziram nenhum efeito inibitório sobre a migração induzida pela fração LP do látex.

**Tabela 1. Efeito de diferentes bloqueadores farmacológicos na migração de**

**neutrófilos induzida pela fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP) na cavidade peritoneal.** Pré-tratamento com dexametasona, talidomida, indometacina e celecoxib, mas não PCA e cimetidina, inibem a migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex de *C. grandiflora*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo NaCl; \*\*  $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado somente com o látex. ANOVA- Bonferroni.

<i>Tratamento</i>	<i>Dose</i>	<i>Migração de Neutrófilos</i>
NaCl 0,15 M	1 mL/cav; i.p.	750 $\pm$ 2,3
Fração LP do látex de <i>C. grandiflora</i> (CgLP)	2,5 mL/cav; i.p.	2,841 $\pm$ 4,4*
<i>C. grandiflora</i> + Dexametasona	2 mg/Kg; s.c.	666 $\pm$ 4,4**
<i>C. grandiflora</i> + Talidomida	200 mg/Kg; s.c.	1,009 $\pm$ 2,3**
<i>C. grandiflora</i> + Indometacina	3mg/Kg; s.c.	1,337 $\pm$ 4,8**
<i>C. grandiflora</i> + Celecoxib	30 mg/Kg; s.c.	1,531 $\pm$ 4,6**
<i>C. grandiflora</i> + PCA	10 mg/Kg; s.c.	2,318 $\pm$ 2,2
<i>C. grandiflora</i> + Cimetidina	30 mg/Kg; s.c.	2,270 $\pm$ 1,6

#### 4.4. Mudanças da população de células peritoneais residentes alteram a

#### **atividade pró-inflamatória da fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP).**

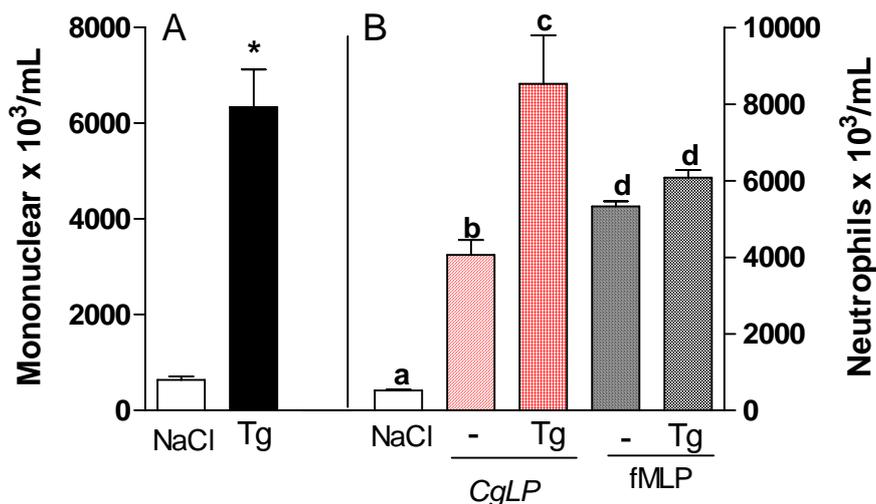
O aumento do número de macrófagos potencializa a atividade pró-inflamatória, mas a depleção de mastócitos não modifica a atividade pró-inflamatória da fração LP do látex.

#### **4.4.1. A migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP) foi potencializada pelo aumento da população de macrófagos residentes em ratos.**

A população de macrófagos da cavidade peritoneal foi incrementada em 893,73% em relação ao grupo tratado com NaCl 0,15M, através do tratamento com tioglicolato (3% i.p.) quatro dias antes da administração da fração LP do látex (Figura 8 A). Pode-se observar na Figura 8 B que o incremento de macrófagos acarretou um aumento de 109,69% na migração de neutrófilos induzida por esta fração (2,5 mg/cav.) em relação ao grupo que só recebeu a fração LP. O efeito quimiotático do fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/cavidade), um agente quimiotático direto, não foi alterado pelo aumento da população de macrófagos.

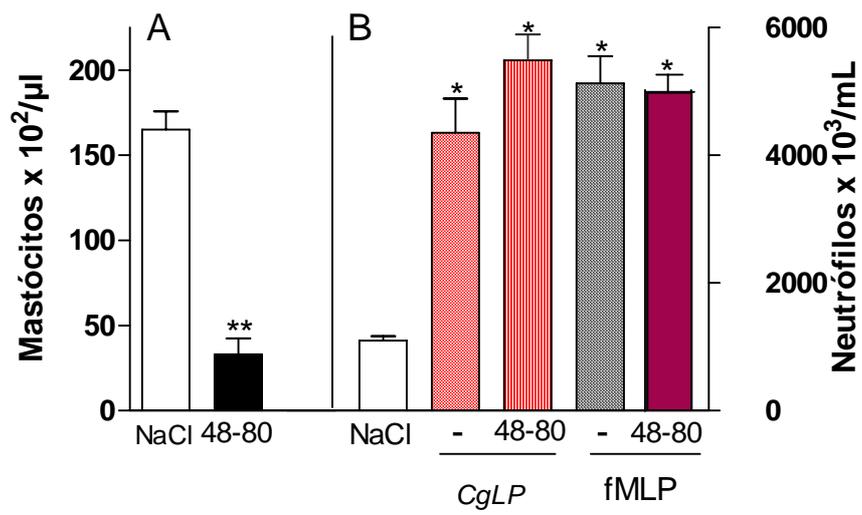
#### **4.4.2. A depleção da população de mastócitos não altera a migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP) em ratos.**

A depleção de mastócitos residentes na cavidade peritoneal foi de 80% em relação ao grupo controle (NaCl) e ocorreu através do pré-tratamento crônico dos animais com o composto 48/80 (Figura 9 A). Este procedimento não interferiu na migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex, bem como do fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/ cav.; figura 9 B). Este dado sugere que os mastócitos não estão envolvidos na migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex.



**Figura 8. Influência do aumento da população de macrófagos na cavidade peritoneal sobre a migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP). A:** número de macrófagos do grupo controle (NaCl 0,15 M) e dos animais tratados com tioglicolato (Tg; 3% v/v; 10 mL i.p.). **B:** migração de neutrófilos induzida por NaCl 0,15 M (NaCl, 1 mL), fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP) (2,5 mg) e fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles), nas cavidades não tratadas com Tg (-) ou tratadas (Tg). A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. O resultados foram expressos como a media  $\pm$  E.P.M. do número de mononucleares ou neutrófilos em 6 animais. \*  $p < 0.05$  comparado a NaCl;

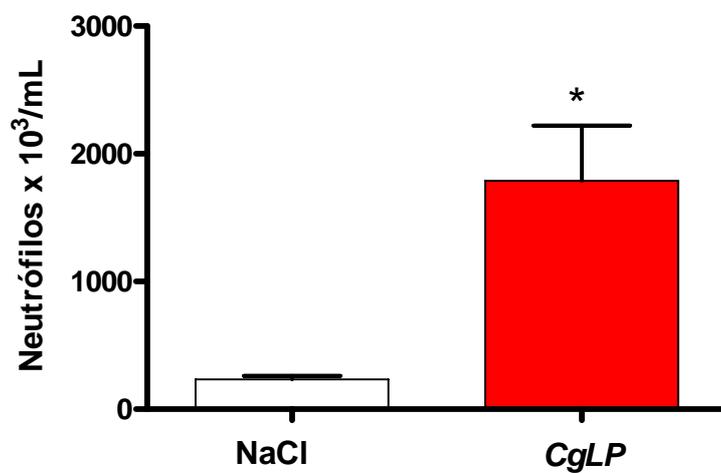
<sup>c</sup> p < 0.05 comparado a <sup>b</sup> e <sup>b</sup> comparado a <sup>a</sup> (NaCl). ANOVA – Bonferroni.



**Figura 9. Influência da depleção de mastócitos na cavidade peritoneal sobre a migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP).** **A:** população de mastócitos em tratados com NaCl 0,15 M e pré-tratados com composto 48/80. **B:** migração de neutrófilos induzida em animais tratados com: NaCl 0,15 M (1 mL i.p.), fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP) (2,5mg/cav.), nas cavidades não tratadas com 48/80 (-) e nas tratadas. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$ E.P.M. de mastócitos e neutrófilos de 6 animais. \*\*  $p < 0,05$  comparado ao grupo C e \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo NaCl. ANOVA – Bonferroni.

#### **4.5. A fração LP do látex de *Cryptostegya grandiflora* (CgLP) induz migração de neutrófilos no modelo de bolsa de ar subcutânea (“Air pouch”)**

Constatou-se que a fração LP do látex de *C. grandiflora* induz migração de neutrófilos no modelo de bolsa de ar subcutânea. Como pode ser observado na figura 10, verificou-se que a fração LP do látex (2,5 mg /bolsa) promoveu um aumento de 668,64% do número de neutrófilos em relação ao controle (NaCl 0, 15 M).



**Figura 10. Indução da migração de neutrófilos pela fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP) no modelo de bolsa de ar subcutânea.** A fração LP do látex (CgLP/2,5 mg/cavidade) ou NaCl 0,15 M (1ml) foram administradas na bolsa de ar formada. A avaliação de neutrófilos foi realizada 6 horas após a injeção da fração LP do látex ou NaCl 0,15 M. Os animais controle (NaCl) receberam somente NaCl 0,15 M estéril (1mL/bolsa). \*  $p < 0,05$ . comparado a Sal. ANOVA – Teste t não pareado.

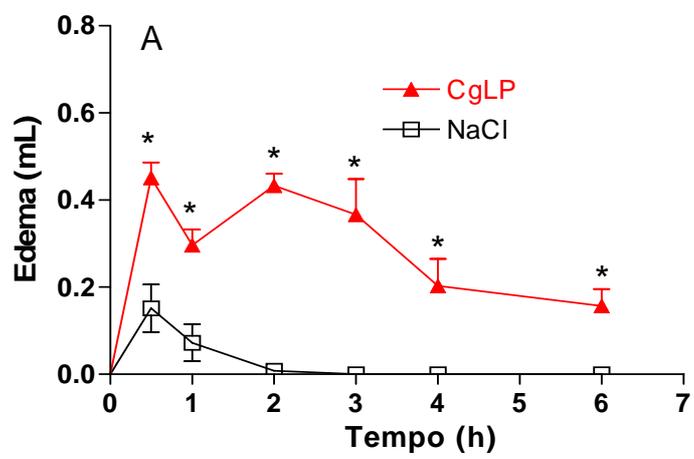
#### **4.6. A fração LP do Látex de *C. grandiflora* (CgLP) induz efeito edematogênico**

O efeito da injeção intraplantar da fração LP do látex foi avaliado no modelo do edema de pata em ratos. A Figura 11 A mostra que esta fração administrada por via subcutânea intraplantar nas patas direitas dos animais produziu edema crescente. Na investigação do curso temporal de edema induzido pela fração LP do látex foi observado um pico inicial aos 30 min após a administração desta fração e um pico máximo na 2ª hora, seguidos de um decréscimo. Após 4 h de avaliação o edema decresceu, retornando aos valores basais.

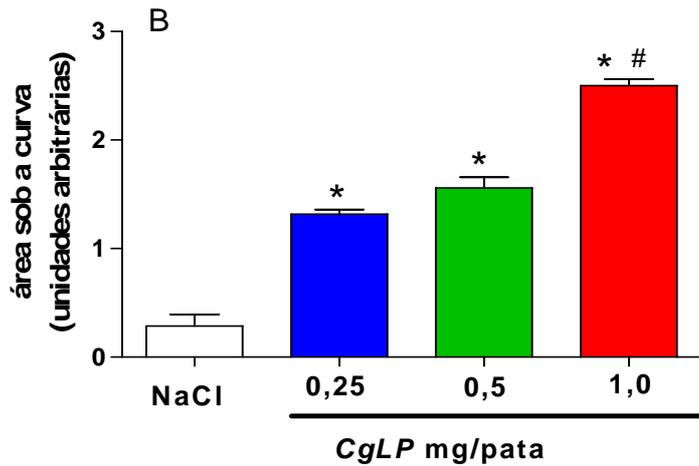
A fração LP do látex mostrou-se eficiente em todas as doses administradas, no entanto, a dose de 1,0 mg/pata produziu um aumento de 542,35% do volume da pata comparado ao grupo controle (NaCl) (Figura 11B).

#### **4.7. A fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP) induz aumento da MPO no tecido intaplantar das patas dos animais.**

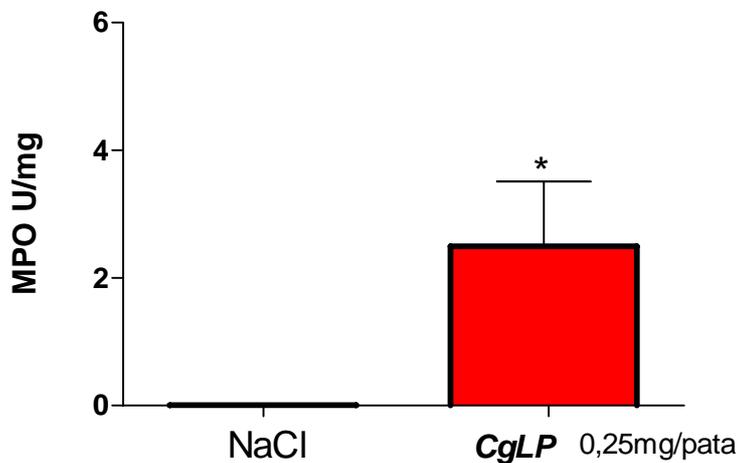
A figura 12 mostra que a administração da fração LP do látex na dose de 0,25mg/pata foi capaz de causar um aumento significante de 6.580% na atividade da MPO nas patas dos animais quantificada 2 h após a indução do edema quando comparada aos animais que receberam somente NaCl 0,15 M.



**B**



**Figura 11. Indução do edema de pata pela fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP).** A: O edema foi mensurado ½, 1, 2, 3, 4 e 6 h após a injeção subplantar da fração LP do látex (0,25 mg/pata de CgLP) e NaCl 0,15 M (NaCl), sendo expresso em mL. B: Edema de pata dose-dependente (injeção subplantar da fração LP do látex de *C. grandiflora* nas doses de 0,25, 0,5 e 1 mg/pata e NaCl estéril (0,1mL) foi determinada após 2 horas da injeção). A área sob a curva da variação de volume de cada animal, foi calculada pelo método trapézio (LANDUCCI, *et al.*, 1995). Cada barra representa a média ± E.P.M. de 6 animais. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo de animais que receberam somente NaCl, e #  $p < 0,05$  comparado aos animais que receberam 0,5 mg/pata; ANOVA- Bonferroni teste t não pareado.



**Figura 12. Influência da fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP) sobre a atividade da MPO na pata dos animais.** O edema foi induzido nas patas dos animais através da injeção subplantar da fração LP do látex (0,25mg/pata). O material analisado foi retirado na 2<sup>a</sup> hora e armazenado para posterior dosagem de MPO. Os animais controle (NaCl) receberam somente NaCl 0,15 M estéril. \*  $p < 0.05$  comparado a Sal. ANOVA – Teste t não pareado.

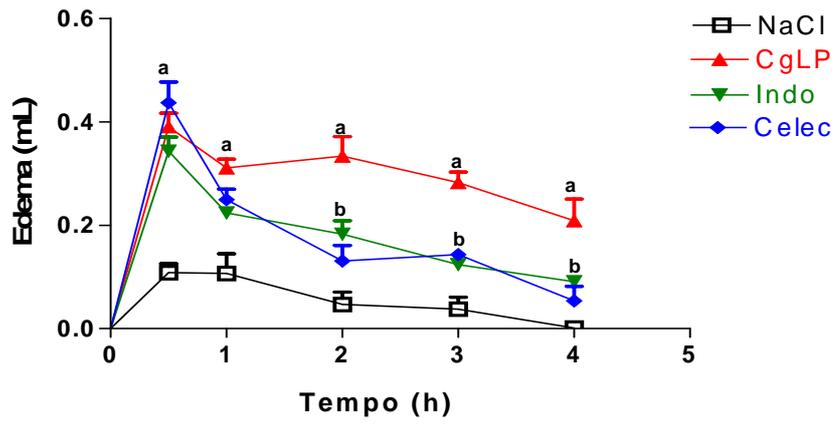
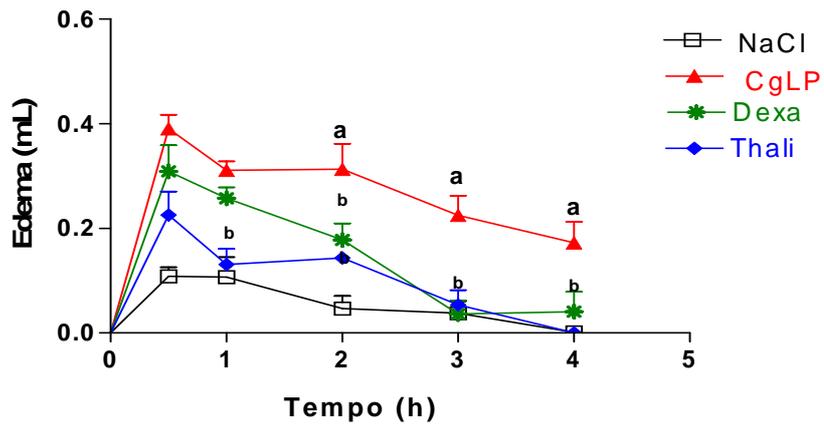
**4.8. Cimetidina, Dexametasona, Talidomida, indometacina, mas não celecoxib inibem a o edema induzido pela fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP) no modelo do edema de pata.**

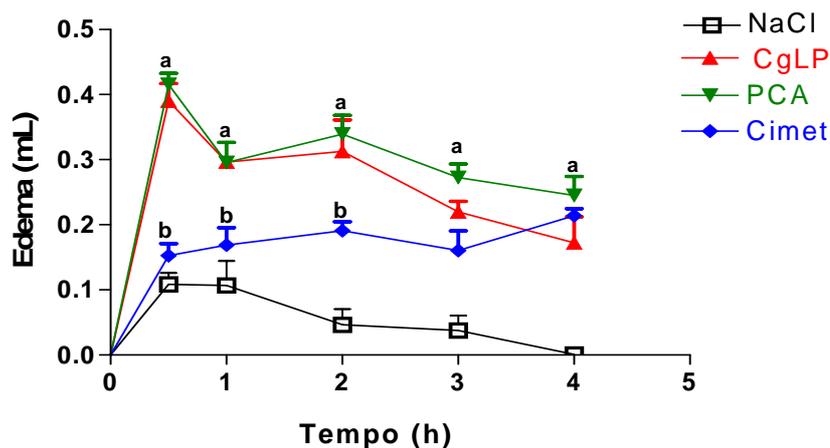
Com a finalidade de encontrar os possíveis mediadores químicos envolvidos na indução do edema de pata foi realizado o pré-tratamento dos animais com algumas drogas anti-inflamatórias.

Na Figura 13 A constata-se que a dexametasona e a talidomida reverteram o efeito edematogênico da fração LP do látex, a partir da 1ª e 2ª hora após a indução do edema.

A figura 13 B mostra que a indometacina e o celecoxib reverteram o efeito edematogênico da fração LP do látex a partir da 2ª hora.

A figura 13 C demonstra que a cimetidina reverteu o efeito edematogênico da fração LP do látex ainda na fase inicial de 30 minutos, sendo este efeito inibitório mantido somente após duas horas. Por outro lado o PCA não inibiu o efeito edematogênico induzido pela fração LP do látex.





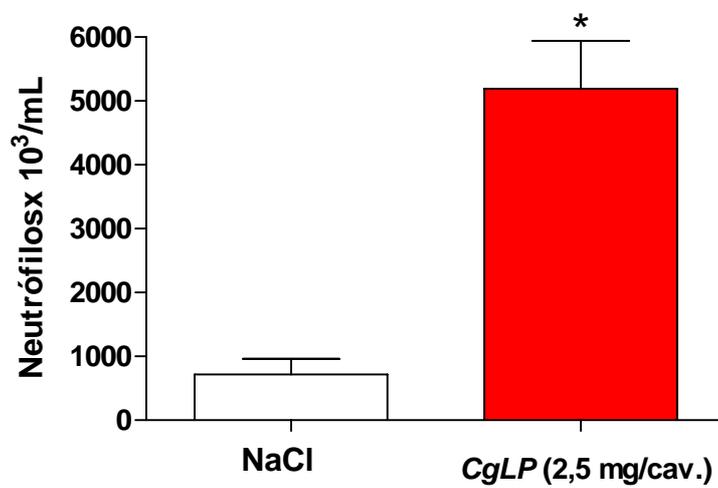
**Figura 13. Efeitos de diferentes agentes farmacológicos no edema de pata induzido pela fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP).** <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo NaCl e <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado somente com a fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP) (ANOVA- Bonferroni).

#### **4.9. A fração LP do látex de *Cryptostegia grandiflora* (CgLP) induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal no modelo de peritonite em camundongos.**

A administração intraperitoneal da fração LP do látex de *Cryptostegia grandiflora* induziu migração de neutrófilos, de forma significativa, para esta cavidade 4 horas após sua injeção na dose de 2,5 mg/cavidade. (Figura 14). Observou-se um aumento na migração de neutrófilos de 624,45%, quando comparado ao grupo de animais controle (NaCl). A partir destes resultados a dose de 2,5 mg/cavidade foi utilizada nos experimento de permeabilidade vascular.

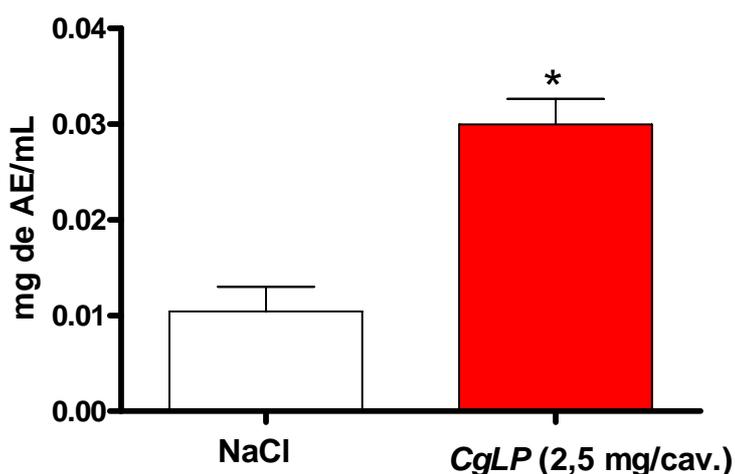
#### **4.10. A fração LP do látex de *Cryptostegia grandiflora* (CgLP) provoca o aumento da permeabilidade vascular no fluido intraperitoneal de camundongos**

A Figura 15 demonstra que ocorreu um aumento de 187,52% dos animais tratados com esta fração em relação ao grupo controle.



**Figura 14. Indução da migração de neutrófilos pela fração LP do Látex de *C. grandiflora* (CgLP) em camundongos.** Os animais foram tratados i.p. com 300  $\mu$ L da fração LP do látex de *C. grandiflora* (2,5 mg). Os animais controle (NaCl)

receberam o mesmo volume de NaCl 0,15 M estéril (i.p.). A migração de neutrófilos (MN) foi avaliada 4 horas após. Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo NaCl. ANOVA - Bonferroni.

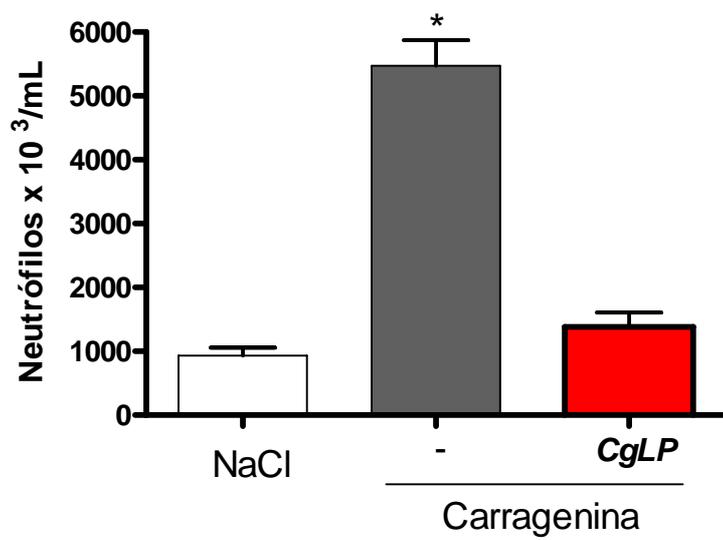


**Figura 15. Influência da fração LP do látex de *Cryptostegia grandiflora* (CgLP) sobre a permeabilidade vascular.** Os animais foram tratados com a fração LP do látex (2,5 mg/kg; i.p.), o grupo controle (NaCl) recebeu 300 $\mu$ l de NaCl 0,15 M estéril. Todos os animais receberam azul de Evans (50 mg/kg; via intraperitoneal). Os resultados foram expressos como mg de azul de Evans/mL de fluido. Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. ANOVA - Bonferroni.

#### **4.11. Estudo da atividade antiinflamatória**

##### **4.11.1. A fração LP do látex de *Cryptostegia grandiflora* (CgLP) reduz a migração de neutrófilos induzida por carragenina em ratos**

A injeção e.v. da fração LP do látex, 30 min antes do estímulo (Cg), foi capaz de inibir a migração de neutrófilos na doses de 2,5 mg/Kg após a 4<sup>a</sup> hora da administração i.p. de Cg (500µg) no modelo de peritonite. Essa inibição foi de 80,77%. O grupo controle positivo (Cg) produziu um aumento significativo no número de neutrófilos, comparados ao grupo NaCl. (Figura 16).



**Figura 16. Influência da fração LP do látex de *Cryptostegia grandiflora* (CgLP) sobre a migração de neutrófilos (MN) induzida por carragenina em ratos.** Os animais foram tratados com a fração LP do látex (2,5 mg/Kg; e.v) 30 min antes da Cg (500µg; i.p.). A MN foi avaliada 4 horas após a Cg. O grupo controle positivo (-) recebeu Cg i.p. e NaCl 0,15 M e.v.; controle negativo (NaCl) NaCl 0,15 M i.p. As barras representam a média do número de neutrófilos ± E.P.M. de 5 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  indica diferença estatística comparado com o grupo NaCl e fração LP do látex e (ANOVA, teste de Bonferroni).

#### **4.12. A fração LP do látex de *C. grandiflora* (CgLP) aumenta a presença de sinais inflamatórios- edema, hiperemia, exsudação e crosta- em lesões experimentais em camundongos**

A avaliação clínica foi realizada até o 12<sup>o</sup> dia de pós-operatório. A avaliação macroscópica do processo cicatricial foi acompanhada pela presença de hiperemia, edema, formação de crosta, características exsudativas e parâmetros morfométricos através da mensuração da área da ferida. Estes parâmetros apresentaram fundamental importância para avaliar o período inflamatório.

Durante o período inflamatório, a presença do edema foi observada em todos os grupos (Figura 17) e se manteve até o 9<sup>o</sup> dia. No 10<sup>o</sup> dia 16,67% das feridas dos grupos tratados com a fração LP do látex (100 e 200 µg) ainda apresentavam edema.

A hiperemia, devido a dilatação dos leitos vasculares presentes na região lesionada, foi observada em todos os grupos experimentais até o quinto dia, não

apresentando diferença estatística entre os grupos até o quarto dia, somente no quinto dia observou-se uma maior frequência de hiperemia no grupo tratado com a fração LP do látex (100 µg) que o grupo controle (Figura 18). Neste período, 100%; 83,33% e 33,33% das feridas dos grupos 100 µg, 200 µg e controle, respectivamente, apresentaram este sinal inflamatório.

Observou-se que clinicamente os sinais de edema e hiperemia foram mais frequentes nos grupos dos animais tratados com a fração LP do látex em ambas as concentrações do que no grupo controle.

As características exsudativas da fase inflamatória foram acompanhadas durante o experimento; sendo visualizada no primeiro dia pós-operatório em todos os grupos; 16,67 %, 33,33% e 33,33% dos grupos controle, 100µg e 200µg respectivamente, apresentaram secreção de aspecto seroso (Figura 19).

A primeira crosta foi observada a partir do primeiro dia de pós-operatório em todos os grupos experimentais. Só ocorreu diferença estatística entre os grupos no segundo dia, onde 100% dos animais dos grupos 100 µg e 200 µg apresentaram crosta e apenas 33,33% dos animais do grupo controle apresentaram. Entre o 3<sup>o</sup> e o 5<sup>o</sup> dias PO, 100% dos animais apresentaram crosta no leito da lesão. Os grupos 100µg e 200µg apresentaram crostas nas feridas no 11<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dia PO já no grupo controle não foi mais observada (Figura 20). Durante o período avaliado, as primeiras crostas dos grupos experimentais apresentaram-se finas, secas e com aspecto uniforme.

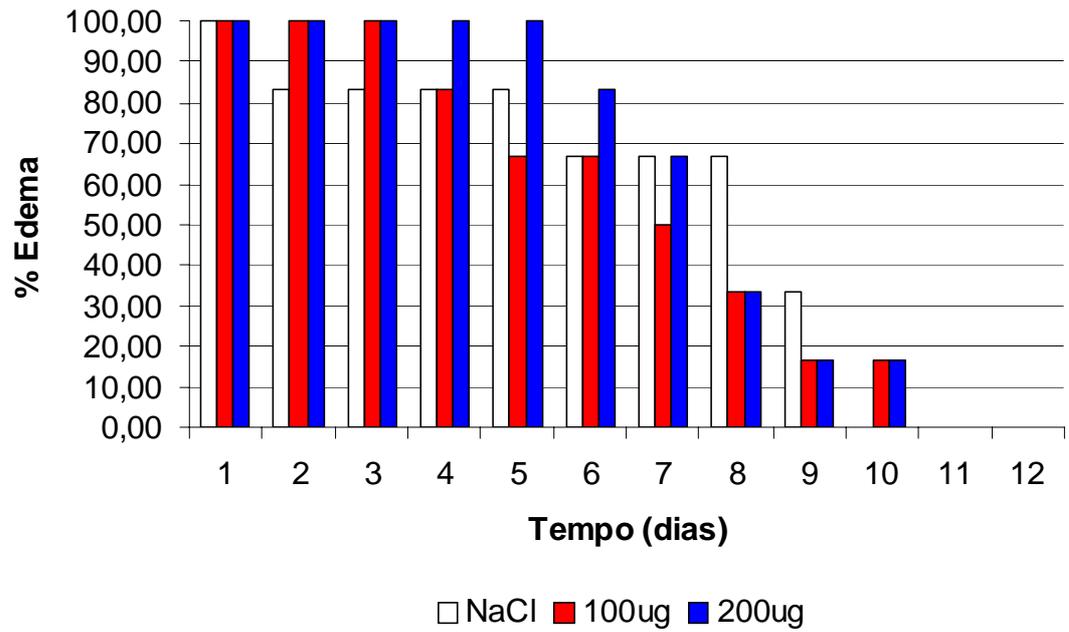
A presença de tecido de granulação foi observada em 100% dos animais de todos os grupos tratados no 8<sup>o</sup> dia PO (Figura 21).

A evolução macroscópica do processo cicatricial foi acompanhada pela mensuração da área das lesões ao longo dos 12 dias (Figura 22 e 23). Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos ao longo dos dias ( $p < 0,05$ ).

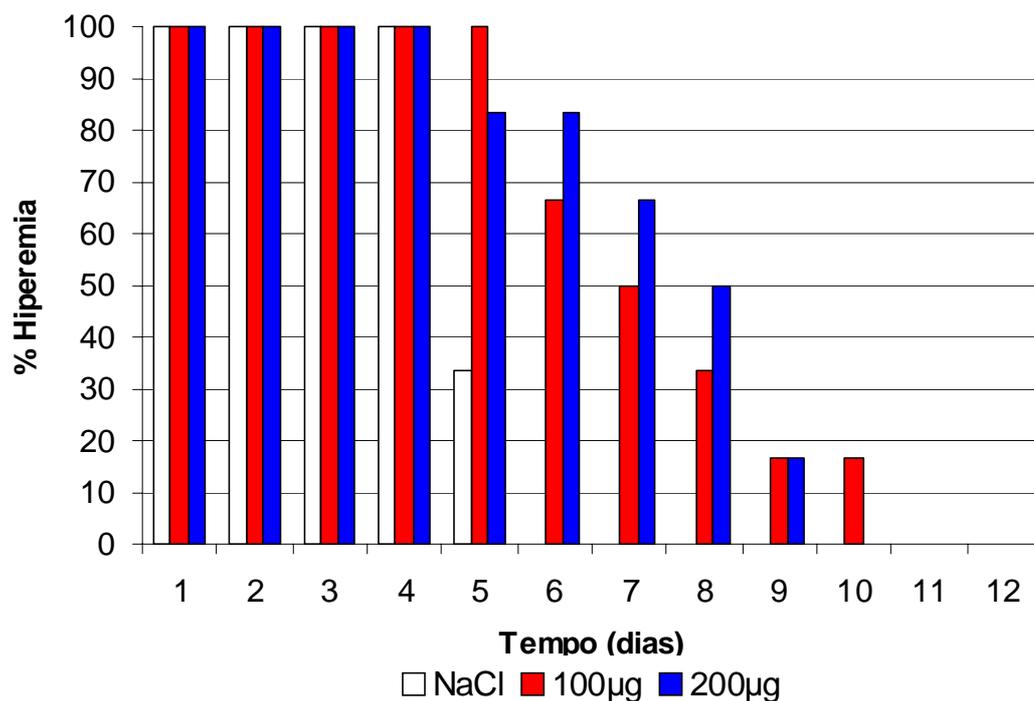
Ao final do experimento (12<sup>o</sup> dia PO) todos os animais de todos os grupos experimentais apresentaram tecido cicatricial. Não sendo observada diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ) (Figura 24).

O fechamento completo das lesões de todos os grupos teve início somente no 10<sup>o</sup> dia PO. Não havendo diferença estatística entre os grupos ( $P < 0,05$ ) (Figura 25)





**Figura17. Percentual de edema nos grupos experimentais.** Grupo NaCl; Grupo 100 µg (100 µg/ml da fração LP do látex de *C. grandiflora*); Grupo 200 µg (200 µg/ml da fração LP do do látex de *C. grandiflora*). Cada coluna representa o percentual médio de presença (%) observado em cada dia de PO, n=6/grupo.\* p<0,05, comparado ao grupo NaCl 0,15 M (controle) (teste qui-quadrado).



**Figura 18. Percentual de hiperemia nos grupos experimentais.** Grupo NaCl; Grupo 100 µg (100 µg/mL da fração LP do látex de *C. grandiflora*); Grupo 200 µg (200 µg/mL da fração LP do látex de *C. grandiflora*). Cada coluna representa o percentual médio de presença (%) observado em cada dia de PO, n=6/grupo. P<0,05 comparado com o controle (NaCl 0,15 M) (teste qui-quadrado).

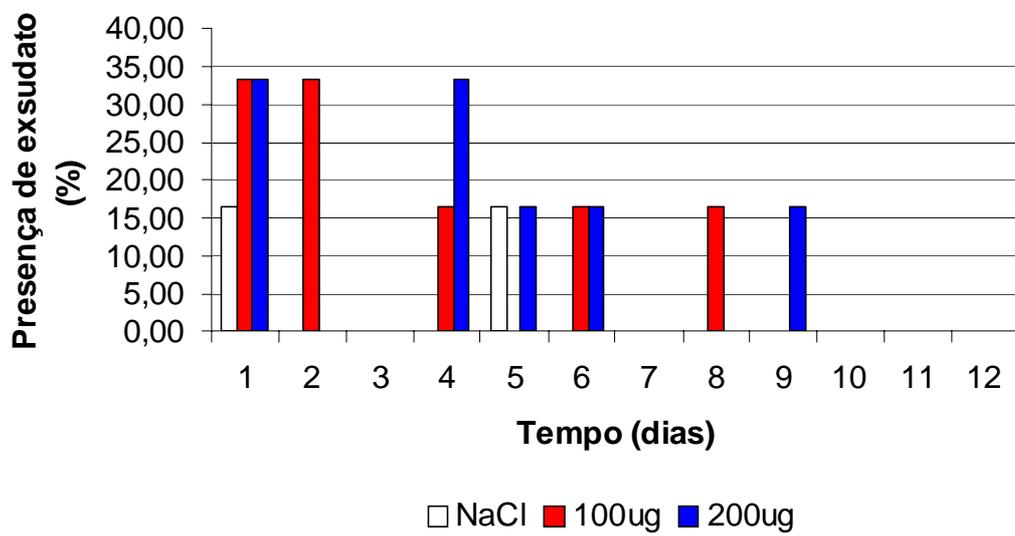
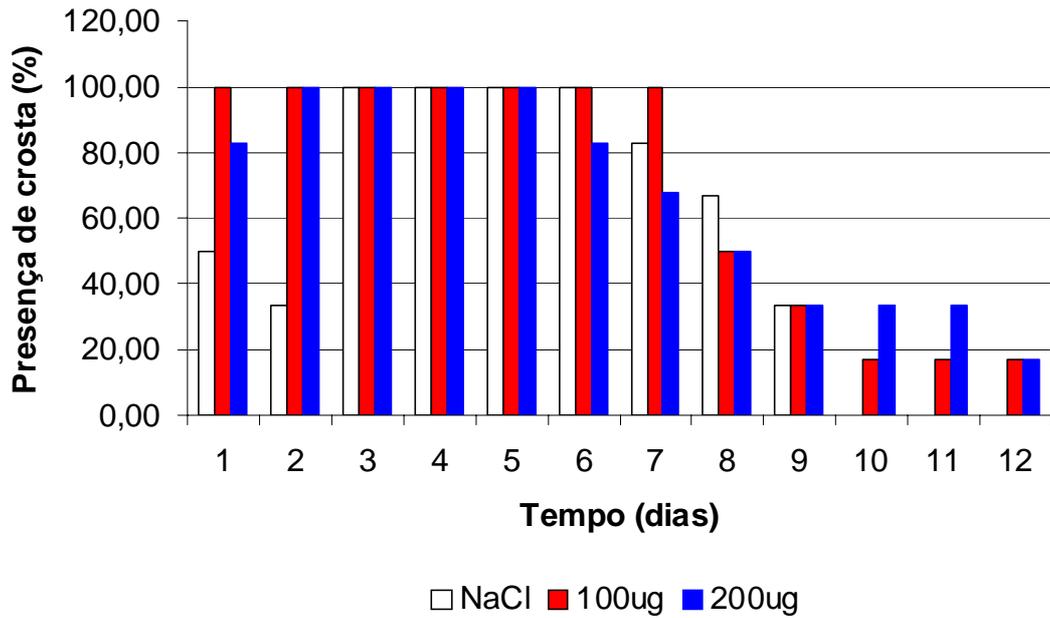
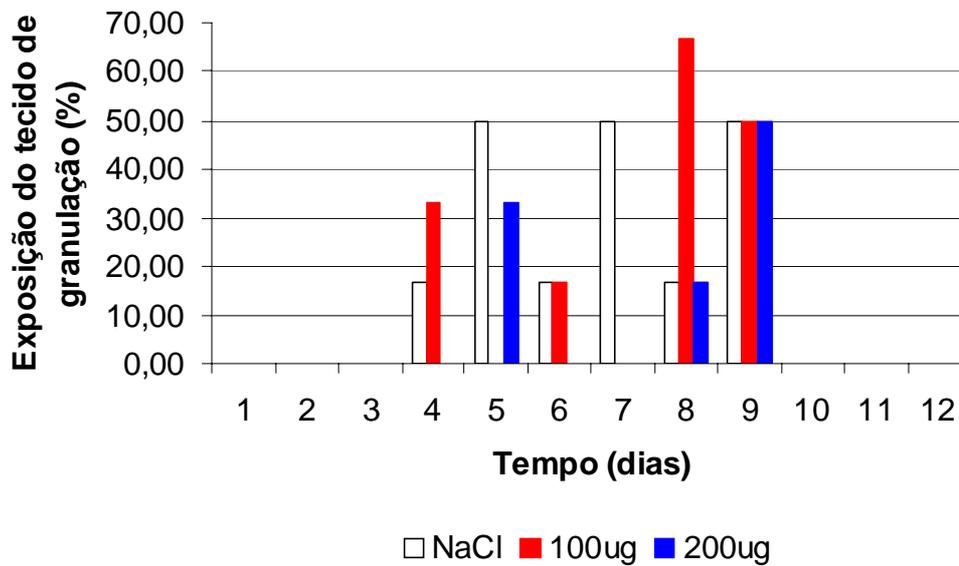


Figura 19. Percentual de exsudato nos grupos experimentais. Grupo NaCl; Grupo

100 µg (100 µg/mL da fração LP do látex de *C. grandiflora*); Grupo 200 µg (200 µg/mL da fração LP do látex de *C. grandiflora*).



**Figura 20. Percentual de primeira crosta nos grupos experimentais.** Grupo NaCl; Grupo 100 µg (100 µg/mL da fração LP do látex de *C. grandiflora*); Grupo 200µg (200 µg/mL da fração LP do látex de *C. grandiflora*), Cada coluna representa o percentual médio de presença (%) observado em cada dia de PO, n=6/grupo.\* p<0,05, comparado ao grupo NaCl (controle) (teste qui-quadrado).



**Figura 21. Exposição do tecido de granulação nos grupos experimentais.** Grupo NaCl 0,15 M; Grupo 100 µg (100 µg/mL da fração LP do látex de *C. grandiflora*); Grupo 200 µg (200 µg/mL da fração LP do látex de *C. grandiflora*).

**Figura 22. Aspecto macroscópico das lesões experimentais nos dias do pós-operatório. Segundo dia de pós-operatório: A**, Grupo I (NaCl 0,15 M); **B**, Grupo II (100 µg/mL da fração LP do látex de *C. grandiflora*); **C**, Grupo III (200 µg/mL da fração LP do látex de *C. grandiflora*). **Sétimo dia de pós-operatório: D**, Grupo I (NaCl 0,15 M); **E**, Grupo II (100 µg/mL da fração LP do látex de *C. grandiflora*); **F**, Grupo III (200 µg/mL da fração LP do látex de *C. grandiflora*). **Décimo segundo dia de pós-operatório: G**, Grupo I (NaCl 0,15 M); **H**, Grupo II (100 µg/mL da fração LP do látex de *C. grandiflora*); **I**, Grupo III (200 µg/mL da fração LP do látex de *C. grandiflora*).

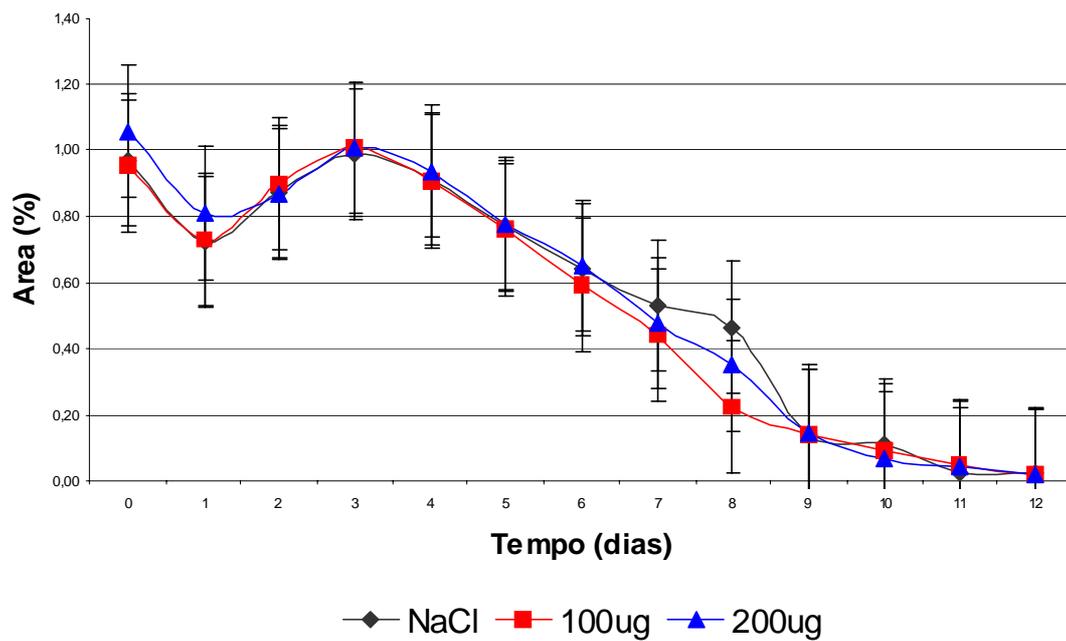
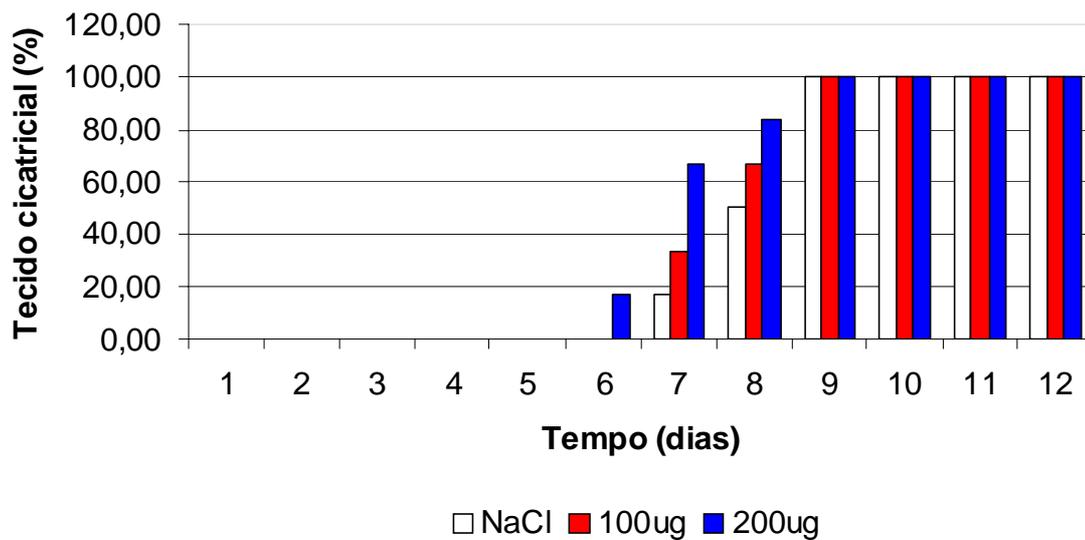
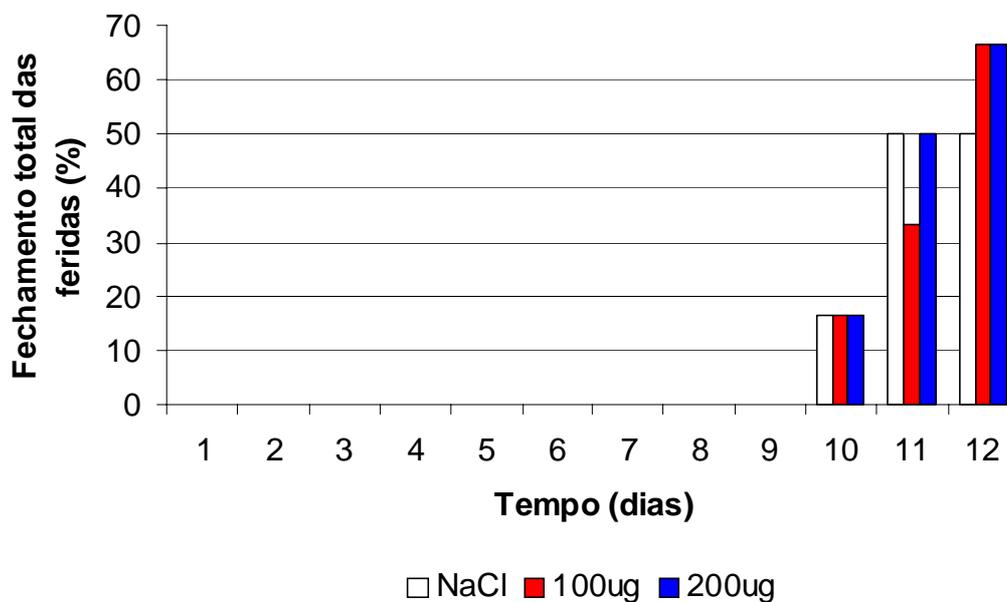


Figura 23. Área da ferida (cm<sup>2</sup>) e tempo em dias após tratamento tópico com NaCl 0,15 M, fração LP do látex de *C. grandiflora* (100 µg/mL e 200µg/mL).



**Figura 24. Percentual de tecido cicatricial nas lesões experimentais nos grupos NaCl 0,15 M, fração LP do látex de *C. grandiflora* (100 µg/mL e 200µg/mL).** Cada coluna representa o percentual médio de presença (%) observado em cada dia de PO, n=6/grupo.



**Figura 25. Percentual de fechamento completo nas lesões experimentais dos grupos NaCl 0,15 M, fração LP do látex de *C. grandiflora* (100 µg/mL e 200 µg/mL).** Cada coluna representa o percentual médio de presença (%) observado em cada dia de PO, n=6/grupo.



## 5. DISCUSSÃO

As proteínas isoladas do látex de várias espécies de plantas lactíferas exercem uma grande variedade de efeitos biológicos. O látex do *Calotropis procera* é rico em proteínas e há evidências que estas apresentam propriedades farmacológicas (FREITAS *et al.*, 2007). No entanto, o látex *per se* é conhecido tanto por ocasionar efeitos medicinais, como também, efeitos tóxicos, tais como, congestão ocular, iridociclite e dermatite após exposição acidental (TOMAR *et al.*, 1970). Há relatos que a administração local do *C. procera* é responsável por ocasionar uma resposta inflamatória mediada por histamina e prostaglandinas (SINGH *et al.*, 2000; KUMAR & SHIVKAR, 2004). Entretanto, na medicina popular indiana ele é usado para o tratamento de doenças de pele, reumatismo e dores. Trabalhos relatam sua potente ação antiinflamatória, analgésica e antipirética quando administrado por via oral (SAGRAULA *et al.*, 2002; DEWAN *et al.*, 2000a).

Há evidências que o látex é composto tanto por componentes tóxicos como agentes terapêuticos. Pesquisas estão sendo realizadas para isolar as propriedades terapêuticas dos efeitos indesejados. Oliveira *et al.*, (2007) promoveram a separação do látex total do *C. procera*, isolando a borracha e obtendo uma fração rica em proteínas, visando à sua caracterização bioquímica, farmacológica, toxicológica e imunológica. A fração isolada denominada LP tem exibido propriedades antiinflamatórias e antinociceptivas e os efeitos indesejáveis anteriormente citados, tais como, inflamação e toxicidade aguda não foram encontrados (SOARES *et al.*, 2005; ALENCAR *et al.*, 2006). Por esta razão, optou-se por utilizar a fração LP do látex de *Cryptostegya grandiflora*, seguindo a mesma metodologia descrita por Freitas *et al.* (2007) e utilizada na obtenção da fração LP do *C. procera*.

Neste trabalho, a fração protéica do látex de *C. grandiflora* foi capaz de induzir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de forma dose-dependente. O padrão celular na cavidade após a injeção da fração, foi característico de um processo inflamatório agudo, com influxo de neutrófilos nas primeiras horas e valores máximos na 4ª hora, retornando aos valores basais entre 8 e 24 horas. Não houve diferença estatística entre as doses de 2,5 e 5,0 mg/cavidade, logo, optou-se pela utilização da menor dose capaz de causar a resposta inflamatória.

O curso temporal do efeito estimulador de leucócitos exercido pela fração seguiu um padrão característico da resposta inflamatória aguda. Os valores máximos

dos neutrófilos foram encontrados 4 horas após a fração LP do látex ser administrada.

Os achados encontrados neste trabalho estão de acordo com os resultados descritos em trabalhos realizados com o látex do *C. procera*, onde, através do emprego do protocolo clássico do modelo de peritonite, a fração DL (látex dializado) do látex induziu a migração de neutrófilos quando injetado por via intraperitoneal (ALENCAR *et al.*, 2006).

A atividade pró-inflamatória da fração LP do látex de *C. grandiflora*, observada no modelo de peritonite foi confirmada em dois outros modelos experimentais de inflamação em ratos: no modelo do edema de pata, avaliada 4 horas após a injeção de 0,25 mg/pata, e no modelo de bolsa de ar, avaliado 4 h após a administração subcutânea de 2,5 mg/cav. da fração do látex de *C. grandiflora*.

A maneira de demonstrar a importância da estrutura tridimensional das proteínas para a função biológica que exercem é alterar esta estrutura e determinar o efeito que isso causa nesta função. As proteínas podem ser desnaturadas pelo aquecimento, embora a temperatura precisa na qual o processo ocorre possa variar e o seu efeito nem sempre seja irreversível. Com este objetivo, a fração protéica do látex de *C. grandiflora* em solução foi aquecida a 100°C por 10 min. Observou-se que a desnaturação da fração LP do látex bloqueou o seu efeito na migração de neutrófilos no modelo de peritonite. Assim fica evidente que a estrutura tridimensional desta fração é crítica para o exercício de sua função pró-inflamatória. Esse achado está de acordo com a literatura, onde se demonstra a importância da integridade da estrutura tridimensional de proteínas em suas atividades pró - ou antiinflamatória (ALENCAR *et al.*, 2003; ALENCAR *et al.*, 2004). Estes dados contribuíram também para excluir a hipótese de que a migração de neutrófilos induzida pelo látex de *C. grandiflora* ocorresse devido à contaminação por LPS.

Na resposta inflamatória aguda ocorre o recrutamento de neutrófilos do sangue para o tecido afetado, no qual estão envolvidos processos complexos e multimediados. Além disso, estão incluídas interações seqüenciais entre os neutrófilos, as células endoteliais e os componentes da matriz extracelular. O controle destes mecanismos envolve a ativação de receptores presentes nas células endoteliais e sanguíneas, bem como, a expressão de glicoproteínas adesivas na membrana celular (McEVER, 1992). A adesão dos neutrófilos ao endotélio é necessária para que ocorra a infiltração destas células no foco da inflamação. Este processo é mediado por

glicoproteínas denominadas selectinas, que através de domínios lectínicos reconhecem e interagem de forma específica com carboidratos de superfície (ROBBINS & CONTRAN, 2005).

A modulação farmacológica da resposta inflamatória induzida pela fração LP do látex de *C. grandiflora* foi realizada pré-tratando os animais com alguns bloqueadores farmacológicos. No rastreamento da participação de derivados lipídicos, foram utilizados a indometacina, inibidor não seletivo das COX 1 e COX 2; o celecoxib, inibidor específico da COX 2; um antagonista do receptor de PAF, PCA. Além destes, os animais receberam também um glicocorticoide, a dexametasona e um inibidor seletivo de TNF- $\alpha$ , a talidomida. Foi utilizado também um antagonista dos receptores de histamina H<sub>2</sub>, a cimetidina. Nesse protocolo experimental, observou-se que a dexametasona, a talidomida, a indometacina e o celecoxib foram capazes de inibir a migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex. Logo, estes resultados são sugestivos da participação de prostaglandinas, citocinas, inclusive TNF- $\alpha$  na participação do processo inflamatório. Esta hipótese é fortalecida por achados na literatura nos quais se atribuem aos glicocorticoides o bloqueio da transcrição do RNA mensageiro de determinadas citocinas, do tipo TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-8, com conseqüente inibição da síntese desses fatores protéicos por macrófagos (BEUTLER *et al.*, 1986; BARNES & ADCOCK, 1993; AUPHAN *et al.*, 1995; WILCKENES & DERIJK, 1997). É importante ressaltar que, além de inibir a produção de citocinas, os glicocorticóides também reduzem a expressão de seus receptores (BARNES & ADCOK, 1993). Está muito bem demonstrado na literatura o efeito inibidor da dexametasona sobre a liberação de citocinas e quimiocinas por macrófagos (KARTORI *et al.* 1990, ODA & KARTORI, 1992; ROCHA *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 1997). A idéia de que o TNF- $\alpha$  esteja envolvido no efeito pró-inflamatório da fração LP do látex de *C. grandiflora* é corroborada com os dados encontrados na literatura de que a talidomida suprime de forma seletiva a produção desta citocina através da degradação do RNA mensageiro (MOREIRA *et al.*, 1993).

Pode-se também sugerir o envolvimento de mediadores químicos originados do metabolismo do ácido araquidônico, pois a indometacina inibiu a migração dos neutrófilos assim como o celecoxib, que é um inibidor específico da COX 2 inibiu significativamente a migração dos neutrófilos induzida pelo látex.

A partir dos resultados encontrados pode-se excluir a participação do fator de agregação plaquetário.

Os glicocorticóides exercem importantes ações imunológicas específicas do hospedeiro, pelo menos parcialmente, através de seus efeitos sobre a produção de citocinas (SCHIMMER & PARKER, 1996). Tem sido demonstrado que a dexametasona um glicocorticoide sintético suprime a produção de citocinas por monócitos humanos estimulados por LPS (WAAGE & BARKE, 1988). Essa droga com várias atuações antiinflamatórias e imunossupressoras, possui efeito inibitório sobre a síntese de citocinas, tais como, a IL-1, IL-8 e TNF- $\alpha$ , devendo ser destacado que, além de inibir sua produção, também bloqueia vários de seus efeitos, ao reduzir, por exemplo, a expressão de receptores para IL-8, também são responsáveis pela inibição da expressão de moléculas de adesão e de várias enzimas que produzem mediadores que participam do processo inflamatório, como a fosfolipase A2, cicloxigenase 2 (induzida) e óxido nítrico sintase e a degranulação matocitária (BARNES & ADCOK, 1993; JAFFUEL *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2003). Como as citocinas desempenham funções essenciais nas ações integradas de monócitos, macrófagos, linfócitos T e linfócitos B na composição das respostas imunológicas a vários patógenos, não é surpresa que a inibição da síntese de citocinas pelos glicocórticoides suprima também a resposta imune (SCHIMMER & PARKER, 1996). Considerando-se os glicocórticoides como importantes agentes antiinflamatórios; cujos efeitos são parcialmente devidos a atenuação da produção de citocinas pró-inflamatórias (BLEEKER *et al.*, 1997), é importante ressaltar que as ações imunossupressoras e antiinflamatórias dos glicocorticóides estão indiscutivelmente interligada, talvez porque ambas resultem, em grande parte, da inibição das funções específicas dos leucócitos (CHROUSOS, 1995). Mais especificamente quanto à migração de neutrófilos, tem sido descrito que dexametasona inibe a migração destas células, sendo este efeito explicado como resultado do bloqueio da liberação de fatores quimiotáticos em resposta a estímulos inflamatórios (CUNHA & FERREIRA, 1986; FACCIOLLI *et al.*, 1990) ou pelo bloqueio da adesão neutrófilo-endotélio (MICHEL & WHORTON, 1951; MOON & TERSHAKOVIC, 1953). No caso do bloqueio de adesão, mas precisamente, na última etapa da migração, visto ter sido observado que estas células permanecem entre o endotélio e a membrana basal sem atingir o tecido perivascular (KARTORI *et al.*, 1990; ODA & KARTORI, 1992).

Com o intuito de investigarmos a participação de células residentes principalmente macrófagos e mastócitos, na resposta inflamatória induzida pelo látex,

no modelo de peritonite, foram realizadas modificações no padrão destas células na cavidade peritoneal, através de metodologias já descritas anteriormente na literatura.

Quando a população de macrófagos da cavidade peritoneal foi potencializada pelo tratamento dos animais com tioglicolato, observou-se aumento significativo da resposta inflamatória, isto é, houve um aumento da migração de neutrófilos induzido pela fração LP do látex, fato confirmado quando se observou um aumento da migração de neutrófilos quando esta fração foi injetada na bolsa de ar, onde se tem uma cavidade criada artificialmente com uma população celular formada por fibroblastos e macrófagos “likes”, fato que também eleva a população de macrófagos residentes.

Estes dados em conjunto sugerem que as células peritoneais residentes estejam envolvidas na migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex de *C. grandiflora*. Como os macrófagos são fontes importantes de citocinas, poderiam ser estas responsabilizadas pela atividade quimiotática para neutrófilos induzido por esta fração LP do látex, fato que foi suposto pelo experimento da modulação.

Está bem demonstrada na literatura a participação de células residentes (macrófagos, mastócitos e linfócitos) controlando a migração de neutrófilos na resposta inflamatória de fatores quimiotáticos como os leucócitos (RANKI *et al.*, 1990), componentes do sistema complemento (WHALEY & FERGUNSON, 1981) e citocinas, principalmente a IL-1, IL-8 e TNF- $\alpha$  (STARUCH & WOOD, 1985) e o fator quimiotático para neutrófilos liberado por macrófagos (MNCF) (CUNHA & FERREIRA, 1986).

Anteriormente, várias pesquisas foram conduzidas com o intuito de investigar o mecanismo pelo quais algumas substâncias exógenas como a carragenina, zimosana e LPS ou mediadores quimiotáticos como a IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  induzem migração de neutrófilos. Os resultados demonstrados indicaram que estas substâncias induzem o recrutamento de neutrófilos por um mecanismo indireto, no qual os macrófagos residentes parecem ser as células responsáveis pelo controle deste processo (SOUZA & FERREIRA, 1985; FACCIOLLI *et al.*, 1990; RIBEIRO *et al.*, 1990). Entretanto, foi demonstrado por Ribeiro *et al.* (1997) que o fMLP e o C5a induzem a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos por um mecanismo independente de células residentes.

De acordo com Souza *et al.* (1988) a migração de neutrófilos induzida pela administração de carragenina ou zymosan na cavidade peritoneal diminui quando a

cavidade é depletada de células residentes e aumenta com o pré-tratamento com o tioglicolato. A participação dos macrófagos no recrutamento de neutrófilos foi também demonstrada por Cunha & Ferreira (1986). Estes autores utilizando as mesmas ferramentas metodológicas observaram que o lipopolissacarídeo (LPS) quando administrado na cavidade peritoneal de ratos, induzia migração de neutrófilos através da liberação por macrófagos de um potente fator quimiotático para neutrófilos. Foi demonstrado por Ribeiro *et al.* (1990) que o efeito das citocinas era mediado através da liberação, por macrófagos, de um fator característico com características biológicas semelhantes às descritas para o MNCF, ou seja, capaz de induzir migração de neutrófilos em ratos pré-tratados com glicocorticoide.

Foi demonstrado também que a injeção intraperitoneal de LTB4 em ratos, em contraste ao efeito de C5a, induz migração de neutrófilos através de um mecanismo indireto e dependente de macrófagos e mastócitos. Além disso, quando macrófagos e mastócitos eram administrados na cavidade peritoneal destes animais, o bloqueio provocado pela depleção dessas células era revertido (RIBEIRO *et al.*, 1997). Utilizando metodologia semelhante à utilizada no trabalho foi possível demonstrar que duas enterotoxinas produzidas pela bactéria *Clostridium difficile*, toxinas A e B, induziam migração de neutrófilos por um mecanismo indireto via liberação de citocinas por macrófagos. No caso da toxina A, por TNF- $\alpha$  e IL-1 B (ROCHA *et al.*, 1997) e no caso da toxina B, por TNF- $\alpha$  e LTB4 (SOUZA *et al.*, 1997).

Em continuidade ao estudo do papel de células residentes no efeito quimiotático para neutrófilos induzido pela fração LP do látex de *C. grandiflora*, os mastócitos peritoneais foram depletados através do pré-tratamento intraperitoneal dos animais com o composto 4880. A depleção com 4880 já foi utilizada com sucesso por outros pesquisadores (RIBEIRO *et al.*, 2000). No nosso experimento o número destas células foi reduzido em 80% pelo tratamento com o 4880. Quando a fração LP do látex foi injetada intraperitonealmente, a redução do número de mastócitos não afetou a migração destes neutrófilos, constatou-se, portanto, que os mastócitos não estariam envolvidos no recrutamento de neutrófilos induzido por esta fração do látex.

Os mastócitos têm importante papel nas respostas alérgicas e nos processos inflamatórios. Estas células liberam mediadores que apresentam atividade quimiotática para neutrófilos, incluindo o LTB4 (FREEDLAND *et al.*, 1988) e algumas citocinas como a IL-8 e TNF- $\alpha$  (RIBEIRO *et al.*, 1991; GORDON *et al.*, 1990).

Como já havíamos sugerido a ação indutora de migração de neutrófilos dependia de macrófagos e não de mastócitos. Vale ressaltar, que nenhuma das estratégias utilizadas para o estudo do papel das células residentes na atividade quimiotática induzido pelo látex pôde modificar a resposta induzida por fMLP, uma substância com reconhecida atividade direta sobre neutrófilos (RIBEIRO *et al.*, 1991; RIBEIRO *et al.*, 1997).

Os resultados obtidos até esta etapa do trabalho conduzem que a ação indutora da migração de neutrófilos depende de macrófagos, este fato pode ser corroborado com os resultados encontrados no experimento da bolsa de ar subcutânea, pois estas células como já foi dito anteriormente encontram-se presentes nesta cavidade.

A atividade pró-inflamatória da fração LP do látex de *C. grandiflora* foi confirmada também no modelo experimental do edema de pata. O látex apresentou atividade edematogênica em todas as doses administradas. O edema pode ser atribuído ao extravasamento de proteínas plasmáticas.

A mieloperoxidase, quando expressa, participa da indução do metabolismo respiratório, evento este importante na fagocitose de microrganismos invasores, como, por exemplo: bactérias, vírus e fungos (KLEBANOFF, 1999), bem como, células tumorais (WINTERBOURN *et al.*, 2000). Estes resultados indicam que um dos mecanismos de ação pró-inflamatória da fração LP do látex de *C. grandiflora* deve-se a infiltração de neutrófilos no local da injeção subplantar do mesmo. Durante a ativação dos neutrófilos a mieloperoxidase é liberada dos fagossomos para o espaço extracelular, onde irá reagir com o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que é derivado do metabolismo respiratório dos neutrófilos, catalisando a formação de potentes agentes microbicidas como ácido hipocloroso e outras espécies oxidativas (WINTERBOURN *et al.*, 2000). Portanto, assim como no modelo de peritonite, também no modelo de edema de pata, a fração LP do látex parece estar ocasionando o processo inflamatório dependente de células.

Foi demonstrado anteriormente na literatura, que o edema de pata induzido pela carragenina envolve uma complexa liberação tempo-dependente de mediadores inflamatórios (AL-SWAYEH *et al.*, 2000) e é dependente do número de leucócitos circulantes e apresenta três fases distintas em relação à liberação dos mediadores envolvidos. Na fase inicial, ocorre liberação de histamina, serotonina e bradicinina, o óxido nítrico (NO) também é encontrado nesta fase, sendo formado pela isoforma neuronal da enzima NO sintase (nNOS), numa fase intermediária, é mediado por

cinina e uma última fase, à partir de duas horas e trinta minutos após sua indução, é mediado por prostaglandinas e NO na sua isoforma induzida (iNOS) com grande infiltração leucocitária. Entretanto, a ação de todos estes mediadores envolvidos é dependente da presença de títulos normais do sistema complemento. Esta mesma sequência de liberação de mediadores: histamina e serotonina, cininas e prostaglandinas, ocorre em outros tipos de resposta inflamatória em ratos. Dentre estas, pleurisia induzida por carragenina e Emma de pata e pleurisia por terebentina (SPECTOR & WILLOUGHBY, 1963; VINEGAR *et al.*, 1969; Di ROSA *et al.*, 1970; VAN ARMAN & CARLSON, 1974; AL-SWAYEH *et al.*, 2000).

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com Sehgal & Kumar (2005), onde através da injeção subplantar do extrato aquoso do látex de *C. procera* e mensuração do volume das patas plestimograficamente, observaram o pico de edema após duas horas da administração do látex.

A atividade edematogênica da fração LP do látex foi inibida pela dexametasona, talidomida, indometacina, celecoxib e cimetidina, o que confirma os achados encontrados no experimento da modulação farmacológica no modelo de peritonite.

A peritonite e o edema induzidos por substâncias flogísticas (carragenina) são empregados como modelos experimentais para o estudo farmacológico de diversas substâncias na inflamação. A carragenina (Cg) é um composto químico vastamente utilizado em modelos farmacológicos por induzir uma reação inflamatória aguda envolvendo uma liberação de mediadores inflamatórios, tais como aminas biogênicas na primeira fase, que são responsáveis pelo desenvolvimento dos eventos vasculares, que numa segunda fase é mantida por outros mediadores, tais como, prostaglandinas e óxido nítrico, que resultam em mudanças na permeabilidade vascular e formação de edema (WINTER *et al.*, 1962; DI ROSA *et al.*, 1970; MORRIS *et al.*, 2003), esse edema também é caracterizado por apresentar um infiltrado celular intenso, onde se destaca a presença de neutrófilos com radicais livres derivados do oxigênio (MORRIS *et al.*, 2003). As substâncias capazes de inibi-lo têm sido consideradas do ponto de vista de eficácia farmacológica, boas candidatas a agentes antiinflamatórios (GODHWANI *et al.*, 1987).

Na reação inflamatória induzida por carragenina, o extravazamento de proteínas plasmáticas ou a migração de células ocorre geralmente com um pico na 4<sup>a</sup>

hora após o estímulo inflamatório. A cg é um agente flogístico indireto induzindo a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos via ativação de macrófagos peritoneais (SOUZA *et al.*, 1988).

A fração LP do látex injetado por via endovenosa provocou a inibição da migração de neutrófilos induzido pela injeção intraperitoneal da carragenina. Esse resultado nos leva a especular que provavelmente a atividade pró-inflamatória desta fração do látex de *C. grandiflora* pode ocorrer através da indução de migração celular (mecanismo inverso da atividade antiinflamatória), uma vez que o mecanismo da atividade antiinflamatória da fração LP do látex parece acontecer através da migração celular.

Estudos envolvendo as relações estrutura-atividade de moléculas farmacologicamente ativas têm sido largamente utilizados para determinar potência e seletividade de substâncias com possíveis capacidades terapêuticas, onde a aquisição ou a perda de um determinado grupamento químico pode aumentar ou diminuir a capacidade agonista de uma determinada droga. Um bom exemplo disso foi o estudo da histamina, que propiciou a descoberta de vários sub-tipos de receptores, possibilitando a identificação de vários antagonistas potentes utilizados no tratamento de úlceras (DEAKIN & WILLIAMS, 1992). O látex parece ter um efeito ambíguo, onde por via intraperitoneal estimula a migração de neutrófilos e por via endovenosa, parece inibir esse processo.

Os achados deste trabalho demonstraram que a fração protéica presente no látex de *C. grandiflora* apresenta evidências de efeitos pró-inflamatórios no modelo de peritonite, bolsa de ar subcutânea e edema de pata, por outro lado, quando esta fração foi aplicada por via endovenosa apresentou efeitos antiinflamatórios no modelo de peritonite, além disso, fica sugerido que a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela fração do látex ocorre principalmente através da liberação de citocinas por células residentes.

Estudos anteriores demonstraram os efeitos antiinflamatórios do látex de *C. procera* em modelos de peritonite e edema de pata (ALENCAR *et al.*, 2006), o que foi observado nos modelos de peritonite realizado neste trabalho utilizando a fração LP do látex da *C. grandiflora* por via endovenosa.

Há relatos da ocorrência de atividades pró-e antiinflamatórias do látex de *C. procera*. Relatos científicos descrevendo este fenômeno são originários principalmente da Índia, onde este látex é largamente utilizado na medicina popular.

Estudos sugerem que este antagonismo de atividades depende do meio de extração e da via de administração experimental nos animais (ALENCAR et al., 2006).

O sistema imune desempenha papel fundamental no processo de cicatrização de lesões cutâneas, pois, além de participarem na função inflamatória e de defesa do hospedeiro, as células pertencentes ao sistema imune secretam citocinas, linfocinas e fatores de crescimento indispensáveis pela continuidade do processo (PARK & BARBUL, 2004). O látex do *Calotropis procera* é capaz de ativar células do sistema imune e modular o recrutamento de neutrófilos por mecanismos indiretos (ALENCAR et al., 2006). O processo reparativo é regulado também por fatores de crescimento e citocinas (WERNER & GROSE, 2003).

Trabalhos realizados com o látex de *C. procera* evidenciaram que o mesmo otimiza o processo cicatricial através do aumento de colágeno, síntese protéica e reepitelização contribuindo para a redução da área da lesão (RASIK et al., 1999).

A cicatrização é uma resposta do organismo frente a uma lesão na qual ocorrem eventos celulares, fisiológicos e moleculares com o objetivo de recuperar a integridade funcional e estrutural do tecido lesado (CLARK, 1996).

Estudos anteriores demonstraram o efeito benéfico do látex de *C. procera* sobre a cicatrização de feridas cutâneas (RASIK et al., 1999) o que não foi observado no modelo de feridas cutâneas em camundongos utilizando a aplicação tópica da fração LP do látex da *C. grandiflora* realizado neste trabalho, pelo contrário, o mesmo aumentou a presença dos sinais inflamatórios.

Importantes sinais flogísticos, tais como, hiperemia e edema são usados na medicina para avaliar a gravidade de doenças e recuperação de pacientes (LOMBA & LOMBA, 2000).

O edema inflamatório, na verdade, consiste em um acúmulo exsudativo de líquido, fibrina, leucócitos, especialmente neutrófilos e hemácias (MONTENEGRO & FRANCO, 1999). Neste parâmetro observou-se uma maior frequência do edema nos animais em que foi aplicada a fração LP nas concentrações de 100 e 200 µg, pois o edema permaneceu até o 10º dia o que pode sugerir que esta fração LP provoca uma resposta inflamatória mais prolongada; o mesmo foi constatado com a presença da hiperemia até o fim do experimento.

Crostras permanecem em feridas como proteção de um tecido não-reepitelizado facilitando a migração celular e sendo uma matriz extracelular provisória (ROBBINS & COTRAN, 2005). Seu desaparecimento em feridas pode estar

relacionado ao surgimento do tecido cicatricial, tendo como consequência o fechamento completo das lesões. Constatou-se que as crostas permaneceram nas lesões dos animais que foram tratados até o término do experimento e esta aplicação da fração LP do látex de *C. grandiflora* não antecipou o surgimento do tecido cicatricial.

O tecido de granulação que surge após a fase inflamatória para preencher a imperfeição cutânea através de neovascularização (ARAÚJO, 2008) é um importante parâmetro para avaliar o processo cicatricial. Observou-se uma maior frequência de tecido de granulação no grupo controle.

Finalmente, os resultados obtidos neste estudo, somados ao da literatura, mostram que a resposta inflamatória envolve uma série de reações complexas e que apesar de atuar sempre no sentido de destruir, diluir ou bloquear o agente agressor, pode apresentar variações quantitativas de acordo com as características do tecido lesado ou órgão afetado, do agente lesivo e das condições fisiológicas do organismo (SEDWICK & WILLOGBY, 1985). Desta forma, para buscar meios de controlar a resposta inflamatória é necessário que haja uma melhor compreensão de seus mecanismos. Neste sentido, as proteínas presentes no látex se mostram promissoras. Essa versatilidade do látex tanto nos eventos vasculares, quanto celulares no processo inflamatório, associadas ao fato do mesmo ser um produto natural de fácil acesso, abre perspectivas de um estudo mais detalhado de suas ações tanto nos macrófagos quanto em outras células inflamatórias, bem como uma investigação da relação entre estrutura e atividade desta fração na tentativa de explicar esses efeitos antagônicos. Além disso, as proteínas presentes no látex podem possuir aplicações médicas e biotecnológicas na construção de novas substâncias em diversas condições patológicas.

## **6. CONCLUSÕES**

Diante dos resultados apresentados pelo presente trabalho pode-se concluir que:

1. A fração LP do látex de *Cryptostegia grandiflora* apresenta atividade pró-

- inflamatória no modelo de peritonite, edema de pata e bolsa de ar subcutânea;
2. A migração de neutrófilos induzida pela fração LP do látex de *C. grandiflora* ocorre através de um mecanismo indireto, dependente de células residentes;
  3. As substâncias liberadas pelas células induzidas pela fração LP do látex de *C. grandiflora* têm suas liberações e efeitos inibidos por dexametasona, talidomida, indometacina e celecoxib, mas não por PCA e cimetidina.
  4. A manutenção da estrutura terciária da fração LP do látex de *C. grandiflora* é importante para a execução de suas atividades biológicas;
  5. A fração LP do látex de *C. grandiflora* apresentou atividade edematogênica quando injetado por via subcutânea intraplantar;
  6. O efeito edematogênico da fração LP do látex ocorre com infiltração de neutrófilos;
  7. A fração LP do látex de *C. grandiflora* demonstrou uma inibição da migração celular de neutrófilos no modelo de peritonite induzida por carragenina (estímulo quimiotático indireto); dependente de macrófagos residentes;
  8. A fração LP do látex de *C. grandiflora* aumenta a presença de sinais inflamatórios-edema, hiperemia, exsudação e crosta e não é capaz de estimular o processo de reparação de lesões cutâneas.

## **7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS**

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.

ABLA, L. E. F.; ISHIZUKA, M. M. A. **Fisiopatologia das Feridas**. IN: FERREIRA, L. M. Manual de cirurgia plástica. São Paulo: Atheneu, p. 5-11, 1995.

ADAMS, D. D. Molecular interactions in macrophages activation. **Immunology Today**, v.10, p.33, 1989.

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

ALENCAR, N. M. A.; ASSREY, A. M. S.; ALENCAR, V. B. M.; MELO, S. C.; RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces *in vivo* neutrophil migration by indirect mechanism. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 35, p. 1674-1681, 2003.

ALENCAR, N. M. A.; FIGUEIREDO, I. S. T.; VALE, M. R.; BITENCURT, F. S.; OLIVEIRA, J. S.; RIBEIRO, R. A.; RAMOS, M. V. Antiinflammatory effect of the látex from *Calotropis procera* in three different experimental models: peritonitis, paw edema and hemorrhagic cystitis. **Planta Medica**, v.70, p. 1144-1149, 2004.

ALENCAR, N. M. N.; OLIVEIRA, J. S.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; VALE, M. R.; ETCHELLS, J. P.; FREIRAS, C. D. T.; RAMOS, M. V. Pro- and anti-inflammatory activities of the látex from *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. Are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflammation Research**, n. 55, p. 559-564, 2006.

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

ALI, H.; HARIBABU, B.; RICHARDSON, R. M. Mechanism of inflammation and

leukocyte activation. **Adv. Reumathology**, v.81, p.1-27, 1997.

AL-QARAWI, A.A.; MAHINOUD, O.M.; SOBAIH, HAROUN, E.M.; ADAM, S.E.  
A preliminary study on the anthelmintic activity of *Calotropis procera* latex against  
*Haemonchus contortus* infection in Najdi sheep. **Veterinary Research  
Communication**, v.25, p.61-70, 2001.

AL- SWAYEH, O. A.; CLIFFORD, R. H., DEL SOLDATO, P.; MOORE, P.K.A.  
Comparasion of the anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of nitroaspirinin  
and aspirin. **British Journal of Pharmacology**. V. 129, p.343-350, 2000.

ANDRADE, M. N. B.; SEWARD, R.; MELO, J. R. C. Curativos. **Rev. Méd. Minas  
Gerais**, v. 2, n. 4, p. 228-236, 1992.

ANDRADE, J. L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M. V.;  
CAVADA, B. S. et al. Lectin-induced NO production. **Cellular Immunology**, v. 194,  
p. 98-102, 1999.

ARAÚJO, F. V. S. Avaliação do tratamento tópico da lectina *Eugenia malaccensis*  
frente à cicatrização cutânea em camundongos. Dissertação. Mestrado em  
Bioquímica- Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco,  
2004. p.31.

ARBISIER, J. L. Angiogenesis and the skin: a primer. **Journal of the American  
Academy of Dermatology**, v. 34, p. 486-497, 1996.

ARMSTRONG, D. G.; JUDE, E. B. The role of matrix metalloproteinases in wound  
healing. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 92, p. 12-18,  
2002.

ARNOLD JR, H. L.; ODOM, R. B.; JAMES, W. D. **A pele: estrutura básica e  
função. Doenças básicas da pele de Andrews**. IN: \_\_\_\_\_ *Dermatologia Clínica*, p. 1-

14, 1994.

ARYA, S.; KUMAR, V. L. Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of *calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators of inflammation**, p.228-232, 2005.

AUGUSTUS,G.D.P.S.; JAYABALAN, M.; SEILAR, G. *Cryptostegia grandiflora*- a potential mult-use crop. **Industrial crops and products**, v.11, p.59-62, 2000.

AUGUSTUS, G.D.P.S.; RAJARATHINAM, K.; SHANTHAKUMARI, G.D.; KANAN, D.; JAYABALAN, M. Chemical constituents and energy contend of *Cryptostegia grandiflora*: A promising multi–use crop. **Asian Journal of Chemistry**, v.16, n.3-4, p.1421-1425, 2004.

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

BAGBY, M.O.; BUCHANANAN, R. A.; OTEY, F.H. **Multiuso crpos an botanochemical production**. In: Klass, d.l. (Ed). Biomass as a Nonfossil Fuel Source. ACS Syposium Series, n.144, ACS, Washington, DC, p. 125-136, 1981.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, I. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. **Adv. Immunology**, v.55, p.97-179, 1994.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BANNENBERG, G.L. et al., Molecular circuits of resolution: Formation and actions of resolvins and protectins. **Journal Immunology**, v.174, p.4345-4355, 2005.

BARNES, P. J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacology Science**, v.14, n.12, p. 436-441, 1993.

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

BEM-BARUCH, A.; MICHIEL, D.F.; OPPENHEIM, J. J. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. **Journal Biology Chemistry**, v.270, n.20, p.11703-11706, 1995.

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

BEUTLER, B.; CERAMI, A. tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediators. **Annual Rev. Biochemistry**, v.57, p.505, 1988.

BEVILACQUA, M.P.; NELSON, R.M.;MANNORI, G. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. **An. Rev. of Medicine**, v.45, p.361-378, 1994.

BHANDARI, P.;BATEMAN, A.C.; MEHTA, R.L.; PATEL, P. Mucosal expression of cyclooxygenase isoforms 1 and 2 is increased with worsening damage to the gastric mucosa. **Histopathology**, v.46, n.3, p.280-286, 2005.

BLEEKER, M. W.; NETEA, M. G.; KULLBERG, B. J.; VAN DER VEM-LONGERRIJG, J.; VAN DER MEER, J. W. The effects of dexamethasone and chlorpromazine on tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10 in human volunteers. **Immunology**, v.91, p.548-552, 1997.

BRANDT, E.; ERNST, M.;FLAD, H.H. **Interleukine-8**. IN: THOMSON, A.W. The cytokine, 2 ed. Academic Press:Sandiego, p.303-318, 1994.

BRANDT, E.; PETERSON, F.; LUDWIG, A.; EHLERT, J. E.; BOCK, L.; FALD, H. D. The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation. **Journal Leukocytes Biology**, v. 67, p. 471-478, 2000.

BRANSKI, R. C.; ROSEN, C. A.; VERDOLINE, K.; HEBDA, P. A. Biochemical markers associated with acute vocal fold wound healing: a rabbit model. **Journal of Voice**, v. 19, n. 2, p. 283-289, 2005.

BRAQUET, P.; TOUQUI, L.; SHEN, T.Y.; VARGAFTIG, B.B. Perspectives in

platelet activating factors research. **Pharmacology Rev.**, 39, n.2, p.97-145, 1987.

BRYANT, R. A., Acute and chronic wounds: nursing management. 2 ed. St. Louis: Mosby, p. 105-163, 1992.

BROIDE, D.H. **Inflammation cells: Structure and Function**. IN: STITES, D.D.; TERR, A.I. Basic and Clinical Immunology. Ed ,A ppletin and Lange, p.141-183, 1991.

BROWING, J.L.; NGAM-EK, A.;LAWTON, P.;DEMARINIS, J.;TIZARD, R.;CHOW, E.P.; HESSION, C.;GRECO, B.;FOLEY, S.;WARE, C.F .**Tumor necrosis factor Beta/Lymphotoxin-Alha**. IN: THOMSON, A.W. The cytokine, 2 ed. Academic Press:Sandiego, p.303-318, 1994.

CALIXTO, J. B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (eds.) **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicina Moderna**. Chapecó: Argos, p.77-99, 2001.

CALVIN, M. Renewable fuel for the future. **Journal Application Biochemistry**, v.6, p.3-18, 1984.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**, 3 ed. São Paulo: Art Méd, p. 133, 2003.

CARVALHO, P. T. C. Análise da cicatrização de lesões cutâneas através de espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos. 2002. 72 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia)- Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2002.

CESARETTI, I. U. R. Processo fisiológico de cicatrização da ferida. **Pelle Sana**, v. 2, p. 10-12, 1998.

COSTA, J.J.; WELLER, P. F.;GALLI, S.J. Células da resposta Imunológica. **JAMA Brasil**, v.5, n.2, p.768-778, 1997.

COSTA, J.J.; GALLI, S.J. **Mast cells and basophils**. IN: RICH,R.;FLEISHER,T.A.;SCHWARTZ,B.D.;SHEARER,V.V.T;SROBER,W. ed.Clinical Immunology:Pricipilis and Practice. Mosby-year bookInc :St Lois, p.408-

430, 1998.

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

CHITRA, P.; SAJITHLAL, G. B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of Aloe vera on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 59, p. 179-186, 1998.

CHROUSOS, G. P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immunemediated inflammation. **New England Journal Medicine**, v.332, p.1351-1362, 1995.

CLARK, R. A. F. Cutaneous tissue repair. Basic biologic considerations. **Journal American Academic Dermatology**, v. 13, p. 701, 1985.

CLARK, R. A. F. Regulation of fibroplasias in cutaneous wound repair. **American Journal medicine Science**, v. 306, p. 42-48, 1993.

CLARK, R. A. F. **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2<sup>nd</sup>. New York: Plenu Press, 1996.

CHRISTOPHER, E. **Kinetic aspects of epidermal healing**. IN: MAIBACH, H.; ROVEE, D. Epidermal wound healing. St Louis: Mosby, 1972.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Neoplasia. In: \_\_\_\_\_. **Pathologic basis of disease**. 6 ed. Philadelphia: Saundres, 1426 p., 1999.

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

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

CURTIS, J.T.; BLONDEAU, R. Influence of time of day on latex flow from *Cryptostegia grandiflora*. **American Journal of Botany**, v.33, n.4, p.264-270, 1946.

DAVIES, M. J. A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. **Circulation**, v. 82, p.38-46, 1990.

DEAKIN, M.; WILLIAMS, J. G. Histamine H<sub>2</sub>-receptor antagonists in peptic ulcer disease. Efficacy in healing peptic ulcers. **Drugs**, v.44, p. 709-719, p. 1992.

DEWAN, S.; KUMAR, S; KUMAR, V.L. Antipyretic effect of latex of *Calotropis procera*. **Indian Journal Pharmacology**, v. 32, p. 252, 2000a.

DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V.L. Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n. 1-2, p.307-311, 2000b.

DEVRIES, M.E.; RAN, I;KELVIN,J.D. On the edge: The physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammation and immunological responses. **Seminars in Immunology**, v.11, p.95-104, 1999.

DINARELLO,C.A.; **Interleukin-1**. IN: THONSON, A.W.; The cytokine handbook,2 ed. Academi Press: San Diego, p.31-56, 1994.

DI PIETRO, L. A. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. **Shock**, v. 4, p. 233-240, 1995.

DI PIETRO, L.; BURNS, A. L. **Wound healing: methods and protocols**. New Jersey: humana Press, p. 38-46, 2003.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine. **Journal Pathology**, v. 104, p. 15-29, 1970

DOUGTY, D. B. **Principles of wound healing and wound management**. IN: BRYANT, R. A. Acute and chronic wounds: nursing management. St Louis: Mosby, p. 31-68, 1992.

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

DURUM,S.K.;OPPENHEIM, J.J. **Macrophages-derived mediators:IL-1,TNF, IL-6 and cytokines**. IN: PAUL,W.E. ed. Fundamental Immunolgy. Raven Press:New

York, p.639, 1989.

ECKERSLEY, J. R. T.; DUDLEY, H. A. F. Wound and wound healing. **British Medical Bulletin**, v. 44, n. 2, p. 423-436, 1988.

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

EISERICH, J.P.; PATEL, R.P.; O'DONNELL, V.B.O. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecule. *Molec. Aspects Med.*, v. 19, p. 221-357, 1998.

ENGELHARD, E.; TOKSOY, A.; GOOBELER, M.; DEBUS, S.; BRUCKER, E. B.; GILLITZER, R. chemokines IL-8, Groa, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leucocyte subsets in human wound healing. **American Journal Pathology**, v. 153, p. 1849-1860, 1998.

EPPIHIMER, M.J.; WOLITZKY, B.; ANDERSON, D.C.; LABOW, M.A.; GRANGER, D.N. Heterogeneity of expression of E and P-selectins in vivo. **Circulation Research**, v.79, p.560-569, 1996.

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

FAZIO, M.J.; ZITELLI, J. A.; GOSLEN, J. B. **Cicatrização de feridas**. IN: COLEMAN III, W. P.; HANKE, C. W.; ALT, T.H.; ASKEN, S. *Cirurgia Cosmética-Princípios e Técnicas*. 2 ed. Rio de Janeiro, p. 18-28, 2000.

FENG, D.; NAGY, J.A.; PYNE, K.; DVORAK, A.M. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to fMLP. **Journal Experimental Medicine**, v.187, p.903-915, 1998.

FERREIRA, S.H. Are macrophages the body's alarm cells. **Agents and actions**, v.10, p.229, 1980.

FREEDLAND, H. S.; SCHLEIMER, R. P.; SCHULMAN, E. S.; LICHTENSTEIN, L. M.; PETERS, S. P. Generation of leukotrieno B4 by human lung fragments and purified human lung mast cells. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.138, p. 389-394, 1988.

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

FRIES, J.W.; WILLIAMS, A.J.; ATKINS, P.C.; NEWMAN, W.; LIPSCOMB, M.F.; COLLINS, T. Expression of VCAM-1 and E- selectin in an in vivo modal endothelial activation. **American Journal Pathology**, v.143, p.725-737, 1993.

GALLI, S.J. New insights into “the riddle of the mast cells”: microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. **Lab. Invest.**, v.62, n.1, p.5-33, 1990.

GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: basic principles and critical correlates**. Raven Press: New York, 1992.

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

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

GODHWANI, S.; GODHWANI, J.L.; VYAS, O.S. Ocimum sanctum: an experimental study evaluating its anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity in animals. *J. Ethnopharm.*, v. 21, p. 153-163, 1987.

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

GORDON, J.R.; GALY, S. Mast cells as a source of both preformed and

immunologically inducible TNF- $\alpha$ /cachectin. **Nature**, v.346, p.274-276, 1990.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R.; Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*v. 126, p. 131-138, 1982.

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue I: quantitative study of the vascular volume. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v. 1, p.6-8, 1987.

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue II: quantitative study of the vascular volume. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v. 6, p.66-71, 1992.

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

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

HOLGATE,S.T.; ROBINSON, C.; CHURCH, M.K. **Mediators of immediate hypersensitivity**. IN: MIDDLETON, E.JR.;REES, CE.E; ELLIS, E.F.;ADKINSON,N.F.;YUNINGER, J.W.;BUSSE,W.V.V.. Allergy: Priciples and Practice,4 ed. Mosby Year Book INC.: St. louis, p.267-301, 1993.

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

HUTCHINSON, J. **The families of flowering plants**, The clarendon Press, 3 ed, Oxford, p.472, 1973.

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

IBA, Y.; SHIBATA, A.; KATO, M.; MASUKAWA, T. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing.

**International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1879-1880, 2004.

INNAGJERDINGER, K.; NEGARD, C. S.; DIALLO, D.; MOUNKORO, P. P.; PAULSEN, B. S. An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dongoland, Mali, West Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 233-244, 2004.

JAFFUEL, D.; DEMOLY, P.; GOUGAT, C.; MAUTINO, G.; BOUSQUET, J.; MATHIEU, M. Rifamycin is not an activator of the glucocorticoid receptor in A549 human alveolar cells. **Mol. Pharmacology**, v. 55, n. 5, p. 841-846, 1999.

JOHNSTON, D. E. Wound healing in skin. **Veterinary clinics of North American: small animal practica**, v. 20, n. 1, p. 1-25, 1990.

JORGE, S. A.; DANTAS, S. R. P. E. **Tratamento de feridas**. 2 ed. Campinas: Unicamp, p. 85, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, p.413, 1999.

KALITA, D; SAIKIA, C. N. Chemical constituents and energy content of some latex bearing plants. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 219-227, 2004.

KARTORI, M.; ODA, T.; NAGAI, K. A site of action for dexamethasone on leukocyte extravasation in microcirculation. **Agents Actions**, v. 290, p. 24-26, 1990.

KIM, T. W.; MOON, H. B.; KIM, S. J. Interleukin-10 is up-regulated by prolactin and serum-starvation in cultured mammary epithelial cells. **Mol Cells.**, v. 31, n. 16, p. 168-172, 2003.

KIRITIKAR, K.R.; BASU, B.D. **Indian medicinal plants**, ed, v.1-4, dhradum: International Books Distributors, 1987.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase. **Proc. Assoc. Am. Physicians**, v. 111, p. 383-389, 1999.

KLUTH, D.C.; REES, A.J. Inhibiting inflammatory cytokines. **Seminary nephrologya**, v.16, n.6, p.576-582, 1996.

KNIGHTON, D. R.; SILVER, I; HUNT, T. K. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. **Surgery**, v. 90, p. 262-270, 1981.

KOSHLAND, D.E.; The molecule of the year. *Molecular Biotechnology*. p.1258-1261, 1992.

KUDI, A. C.; UMOH, J. U.; EDVIE, L. O.; GFU, J. Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity. . **Jounal of Ethnopharmacology**, v.67, p.225-228, 1999.

KUMAR, A.; BUSSE, W. Airway inflammation in asthma. **Science e Medicine**, v. 2, p. 38, 1995.

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

KUMAR, V. L.; SHIVKAR, Y. M. Involvement of prostaglandins in inflammation induced by latex of *Calotropis procera*. **Mediators Inflamm.**, v. 13, n.3, p. 151-155, 2004.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L. **Patologia- Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 1592p., 2005.

KUMAR, V. L.; ROY, S.; SEGHAL, R.; PADHY, B.M. A comparative study on the efficacy of rofecoxib in monoarticular arthritits induced by latex of *Calotropis procera* and Freund's complete adjuvant. **Inflammopharmacology**, v.14, p.17-21, 2006.

LAGUNOFF, D.; MARTIN, T.W.; READ, G. Agents that release histamine from mast cells. **Annual Rev. Pharmacology Toxicology**, v.23, p.331-351, 1983.

LANDUCCI, E. C. T.; ANTUNES, E.; DONATO, J. L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; De NUCCI, G. Inhibition of carrageenin-induced rat paw edema by crotapotin, a polypeptidee complexed with phospholipase A<sub>2</sub>. **British Journal of Pharmacology**., v. 114, p. 578-583, 1995.

- LASKY, L.A. Selectins: Interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. **Science**, v.258, p.964-969, 1992.
- LARRICK, J.W.; KUNKEL, S.L. the role of tumor necrosis factor and interleukine-1 in the immunoinflammatory response. **Pharmacology Research**, v.5, n.3, p.129-139, 1988.
- LEFKOVITS, J.; PLOW, E. F.; TOPOL, E. J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. **New England Journal Medicine**, v. 332, p. 1553-1559, 1995.
- LOMBA, M.; LOMBA, A. **Resgate Saúde- Medicina pré-hospitalar**. Olinda: grupo Universo, p. 65-86, 2000.
- LYNN, K.R.; CLEVETTE-RADFORD, N.A. Biochemical properties of lattices from the Euphorbiaceae. **Phytochemistry**, v.26, p.939-944, 1987.
- LUSTER, A.D.; ALON, R.; VON ADRIAN, U.H. immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature Immunology**, v.6, p.1190-1198, 2005.
- MANDELBAUM, S. H.; Di SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H.S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources- Part I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.
- MAROHASY, J.; FOSTER, P.I. A taxonomic revision of *Cryptostegia* R. Br. (Asclepadaceae: Periplocoideae). **Australian Systematic Botany**, v.4, p.571-577, 1991.
- MARTIN, P. Wound healing- aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, p. 74-81, 1997.
- McEVER, R.P. Leukocyte interactions mediated by selectins. **Thromb. Haemost.**, v.66, p.80-87, 1991.
- McEVER, R.P. Leukocyte-endothelial cell interactions. **Curr. Biology**, v. 4, p. 840-849, 1992.

McEVER, R.P; MOORE, K. L.; CUMMINGS, R. D. Leukocyte trafficking mediated by selectin carbohydrate interactions. **Journal Biology Chemistry**, v. 270, p. 11025, 1995.

MENEZES, F. F. Eficácia da *Callendula officinalis* Simões para uso terapêutico na cicatrização cutânea em cães. Estudo experimental. Tese. Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária (Doutorado), UFRPE, 2006. 121 p.

MESSENT, A. J.; TUCKWELL, D. S.; KNAUPER, V.; HUMPHRIES, M. J.; MURPHY, G.; GAVRILOVIC, J. Effects of collagenase-cleavage of type I collagen  $\alpha 2$ - $\beta 1$  integrin-mediated cell adhesion. **Journal of Cell Science**, v. 111, p. 1127-1135, 1998.

METCALF, D.D.; BARAM, D.; MEKORY, Y.A. Mast cells. **Physiology Rev.**, v.77, n.4, p.1033-1079, 1997.

MICHEL, N.; WORTHON, C. M. Delay of the early inflammatory response by cortisone. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.76, p. 754-757, 1951.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia: Processos Gerais**. 4 ed. São Paulo, atheneu, p. 109-151, 1999.

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

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

MOREIRA, R. A.; AINOUZ, I. L.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. Plants lectins chemical and biological aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 211-218, 1991.

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

1680, 1993.

MORRIS, M. R.; DEWITT, S.; LAFFAFIAN, I.; HALLET, M. B. Phagocytosis by inflammatory phagocytes: experimental strategies for stimulation and quantification. **Methods Mol. Biol.**, v. 225, p. 35-46, 2003.

MOTA, M. R. L. Efeitos da lectina de sementes de araucaria angustifolia no processo inflamatório agudo. Departamento de Ciências Fisiológicas. (Dissertação de mestrado). Universidade Estadual do Ceará, 2003.

MUKHERJEE, P.K.; GUNASEKHARAN, R.; SUBBURAJU, T.; DHANBAL, S.P.; DURAI SWAMY, P.; VIJAYAN, P.; SURESH, B. Studies on the antibacterial potential of *Cryptostegia grandiflora* R. Br. (asclepiadaceae) extract. **Short communication Fuel**, v.68, n.4, p.475-479, 1989.

MUKHERJEE, P.K.; GUNASEKHARAN, R.; SUBBURAJU, T.; DHANBAL, S.P.; DURAI SWAMY, P.; VIJAYAN, P.; SURESH, B. Studies on the antibacterial potential of *Cryptostegia grandiflora* R. Br. (asclepiadaceae) extract. **Phytotherapy Research**, v.13, p.70-72, 1999.

MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**, v. 95, p. 3032-3043, 2000.

MUTSAERS, S. E.; BISHOP, J. E.; MSGROUTHER, G.; LAURENT, G. J. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 29, n. 1, p. 5-17, 1997.

NALLAMSETTY, S.; KUNDU, S.; JAGANNADHAN, M.V. Purification and biochemical characterization of a highly active cysteine proteinase Ervatamin A from latex of *Eryvatamia coronaria*. **Journal of Protein Chemistry**, v.22, p.1-13, 2003.

NATHAN, C.F. secretory products of macrophages. **Journal Clinical Investigation**, v.79, p.319-326, 1987.

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

OGLE, C.K.; WU, J.Z.; MAO, X.; SZCZUR, K.; ALEXANDER, J.W.; OGLE, J. D. Heterogeneity of kupffer cells and splenic, alveolar, and peritoneal macrophages for production of TNF, IL-1, and IL-6. **Inflammation**, v.18, n.5, p.511-523, 1994.

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

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

ORTONE, J. P.; CLÉVY, J. P. Physiologie de la cicatrisation cutanée. **Ver. Prat.**, v. 44, n. 13, p. 1733-1737, 1994.

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

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

PAN, J.; XIA, L.; YAO, L.; MCEVER, R.P. Tumor necrosis factor- $\alpha$  or lipopolysaccharide-induced expression of the murine P-selectin gene in endothelial cells involves novel kappa B sites and a variant activating transcription factor/camp response element. **Journal Biology Chemistry**, v.273, p.1068-1077, 1998.

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

PARK, J. E. P.; BARBUL, A. B. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **The American Journal of Surgery**, v. 187, p. 115-165, 2004.

PEREIRA, L.S.; GOMES, V.M.; FERNANDES, K.V.S.; SALES, M.P.; XAVIES, J.F. Insecticidal and antifungic protein of the latex from *Manihot glaziovii* Muell. **Arg. Revista Brasileira de botânica**, v.22, n.1, p.27-30, 1999.

PHILLIP, R.; EPSTEIN, L.B. Tumor necrosis factor as immunodulator and mediator

of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin 1. **Nature**, v.323, p.86, 1986.

PRATA, M.; HADDAD, C.; GOLDENBERG, S. Uso do açúcar em feridas cutâneas, estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica brasileira**, v.3, p. 43-48, 1988.

RANKI, J. A., SYLVESTER, I.; SMITH, S.; YOSHIMURA, T.; LEONARD, E. J. Macrophages cultured *in vitro* release leukotrieno B4 and neutrophil attractant activation protein (interleukin-8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. **J. Clin. Invest**, v. 80, p. 1554-1564, 1990.

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

REBAR, A.H.; MaCWILLAMS, P.S.; FELDMAN, B.F.;METZGER, F.L.; POLLOCK, R.V.H.;ROCHE, J. **Neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos**. IN: \_\_\_\_ Guia de Hematologia para cães e gatos. Ed. São Paulo: Roca, p.37-115, 2003.

RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by release of a macrophage neutrophil chemotactic factor. **Int. J. Exp. Pathol.**, v.71, n.5, p.717-725, 1990.

RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology**, v. 73, p. 472-477, 1991.

RIBEIRO, R. A.; SOUZA-FILHO, M.V.P.; SOUZA, M.H.L.P.; OLIVEIRA, S.H.P.; COSTA, C.H.S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.P. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB4, fMLP and C5a des arg. **Inst Arch. Allergy. Immunol**, v.112, p.27-35, 1997.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B. P.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur. Journal Pharmacology**, v. 387, p. 111-118, 2000.

ROBBINS, S.S.; CONTRAN, R.S.; **Patologia- Bases Patológicas das doenças**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

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

ROSS, H. M.; ROMRELL, J. L. **Histologia**: Texto e Atlas. 2 ed. São Paulo: Editorial Médica, p. 347-377, 1994.

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

RUDDLE, N.H. **Tumor necrosis factor Beta/lymphotoxin-Ah1pha**. IN: THOMSON, A.W. The cytokine handbook, 2 ed. Academic Press: San Diego, p.303-318, 1994.

SAHA, K.; MUKHERJEE, P. K.; DAS, J.; PAL, M.; SAHA, B. P. Wound healing activity of *Leucas lavandulaefolia* Rees. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, p. 139-144, 1997.

SANGRAULA, H.; DEWAN, S.; KUMAR, V. L. Evaluation of anti-inflammatory activity of latex of *Calotropis procera* in different models of inflammation. **Inflammopharmacol.**, v. 9, n. 3, p. 257-264, 2002.

SANTORO, M. M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental Cell Research**, v. 304, p. 274-286, 2005.

SANTOS, V.L.C.G. **Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio**. IN: DUARTE, Y. A.O.; DIOGO, M. J. D. Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico. São Paulo: Atheneu, p. 265-306, 2000.

SAVILL, J. Apoptosis in resolution of inflammation. **Journal leukocytes Biology**,

v.61, p.375-380, 1997.

SCHAFFER, M. R.; TANTRY, V.; GROSS, S. S.; WASSERKRUG, H. L.; BARBUL, A. Nitric oxide regulates wound healing. **Journal of Surgical Research**, v. 63, p. 237-240, 1996.

SCHWARTZ, L.; HUFF, F. **Biology of mast cells basofils**. IN: MIDDLETON, E.JR.; ELLIS, E.F.; ADKINSON, N.F. YUNGINGER, J.V.V; BUSSE, W.W. Allergy: Principles and Practice, 4 ed. Mosby-Year Book Inc., St. Louis, p.135-168, 1993.

SEDGWICK, D.; WILLOUGHBY, D.A. **Initiation of inflammatory response and its prevention**. IN: BONTA, I.L.; BRAY, M.A.; PARNHAM, M.J. Handbook of Inflammation. Elsevier, v.5, p.27-47, 1985.

SEHGAL, R.; KUMAR, V. L. *Calotropis procera* látex- Induced inflammatory hyperalgesia- Effect of Antiinflammatory Drugs. **Mediators of inflammation**, v. 4, p. 216-220, 2005.

SERHAN, C.N. *et al.*, Design of lipoxin A4 stables analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. **Biochemistry**, v.34, p.14609-14615, 1995.

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

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

SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. Hormônio adrenocorticotrófico: esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e das ações dos hormônios adrenocorticais. IN: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman, as bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw, 1996, p. 1082-11102.

SHIMIZU, T. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. **Journal of Dermatological Science**, v. 37, p. 65-73, 2005.

SHIRAKAWA, F.; TANAKAY, Y.; ETO, S. Effect of IL-1 on the expression of IL-2 receptor (the antigen) on human natural killer and natural killer-like cell line (YT) cells. **Journal Immunology**, v.137, p.551, 1986.

SHUKLA, O.P.; MURTI, C.R.K. Properties and partial purification of bacteriolytic enzyme from the latex of *Calotropis procera*. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v.200, p.109-112, 1961.

SIQUEIRA, J.R.; DANTAS, C.J.S. **Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação**. Rio de Janeiro: Medsi, p. 238, 2000.

SINGH, H.; KUMAR, S.; DEWAN, S.; KUMAR, V. L. Inflammation induced by latex of *Calotropis procera*- a new model to evaluate anti-inflammatory drugs. **Journal pharmacology Toxicology Methods**, v. 43, n. 3, p. 219-224, 2000.

SILVA, I. G. Correção de cicatrizes. In: MEGELA, I. M. **Cirurgia Plástica reparadora e estética**. São Paulo: Medsi, 2000.

SIMÕES, O.C.M.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELO, J.P.C; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia. Da planta ao medicamento**. Editora UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, p.833, 2002.

SKILAR, L. A. Ligand-receptor dynamics and signal amplification in the neutrophil. **Advances Immunology**, v.39, p.95, 1986.

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

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

SOUZA, G. E. P.; CUNHA, F. Q.; MELLO, R.; FERREIRA, S. H. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion.

**Agents Actions**, v. 24, n. 3-4, p. 377-380, 1988.

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

SOUZA, D. G.; CASSALI, G. D.; POOLE, S. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. **Br. Journal Pharmacology**, v. 134, p. 985-994, 2001.

SPECTOR, W. G.; WILLOUGBY, D. A. The inflammatory response. **Bact. Rev.**, v.27, p. 117, 1963.

SPENCER, A. P. **Anatomia Humana Básica**. 2 ed. São Paulo: Manole, p. 77-91, 1991.

SPICER, J. W. **Bacteriologia, Micologia e Parasitologia Clínicas**. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, p. 16-18, 2000.

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

STARUCH, M. J.; WOOD, D. D.; Reduction of serum interleukin-1 like activity after treatment with dexamethasone. **Journal Leukocyte Biology**, v. 37, p. 193-207, 1985.

STEGMAN, S. J.; TROMOVITCH, T. A.; GLOGAU, R. G. IN:\_\_\_\_\_ **Basics of Dermatologicalo Surgery**. St. Louis: Mosby, 1982.

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

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. São Paulo: Manole, p.72, 1996.

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

1983.

SZPADERSKA, A. M.; DI PIETRO, L. A. Inflammation in surgical wound healing: Friend or foe?, **Surgery**, v. 137, p. 571-573, 2005.

TAKANO, T.; CLISH, C.B.; GRONERT, K; PETASIS, N.; SERHAN, C.N. Neutrophil-mediated changes in vascular permeability are inhibited by topical application of aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and novel lipoxin B4 stable analogues. *Journal Clinic Investigation*, v.101, p.8190-826, 1998.

TARANALLI, A. D.; KUPPAST, I. J. Study of wound healing activity of seeds of *Trigonella foenumgraceum* in rats. **Indian Journal of Pharmaceutical science**, v. 58, n.3, p. 117-119, 1996.

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

TATAKIS, D.N. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. **Journal Periodontology**, v.64, n5, p.416-431, 1993.

TEDDER, T.F.; STEEBER, D.A; CHEIN, A; ENGEL, P. The selectin: vascular adhesion molecules. **FASEB Journal**, v.9, p.866-873, 1995.

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

TERKELTAUB, R. A.; GINSBERG, M. H. Platelets and response to injury. IN: CLARK, R. A. F.; HENSON, P. M. **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum Press, 1998.

THIEMERMANN, C. Nitric oxide and septic shock. **General Pharmacology**, v.29, p.159-166, 1997.

TOMLEY, A.J. the biology of Australian weeds *Cryptotegia grandiflora* R.Br. **Plant Protection Quarterly**, .10, p.122-130, 1995.

TODD, R.; DONOFF, B. R.; CHIANG, T.; CHOU, M. Y.; ELOVIC, A.;

GALLAGEHER, G. T.; WONG, D. T. The eosinophil as a cellular source of transforming growth factor alpha in healing cutaneous wounds. **American Journal Pathology**, v. 138, p. 1307-1313, 1991.

TOMAR, V. P. S.; AGARWAL, P. K.; AGARWAL, B. L. Toxic iridocyclitis caused by *Calotropis procera*. **Journal All- Indian Ophthalmology Soc.**, v. 18,n. 1, p. 15-16, 1970.

TRABULSI, L.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, F; CANDEIAS, J. A. N. *Microbiologia*, 3 ed. São Paulo: Atheneu, p. 123-235, 1999.

UDUPA, A. L.; KULKURNI, D. R.; UDUPA, S. L. Effect of *Tridax procumbens* extracts on wound healing. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 33, n.1, p. 37-40, 1995.

VAN ARMAN, C. G.; CARLSON, R. P. **Anti-inflammatory drugs and behaviuor of leukocytes**. In: VELO; G.P.; WILLOUGHBY, D.A; GIROUND, J. P. *Future Trends in Inflammation*. Ed. Padua: Piccin Medical, 1974.

VARKI, A. Selectins and other mammalian sialic-acid binding lectins. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, v4, p.257-266, 1992.

VICELK, J.; LEE, J. **Immunology of cytokines: an introduction**. IN: THONPSON, A. *the cytokine handbook*. Academic Press: San Diego, p.1-9, 1994.

VIJAYAN, P.; RAGHU, C.; ASHOK, G.; DHANARAJ, S.A.; SURESH, B. Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. **Indian Journal Medicine Research**, v.120, p.24-29, 2004.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenan edema in rats. **Journal Pharmacology Experimental Therapy**, v. 166, p. 95-103, 1969.

ZGANIACZ, A; SANTOSUOSSO; WANG, J; YANG, T.; CHEN, L.; ANZULOVIC, M.; ALEXANDER, S.; GICQUEL, B.; WAN, Y; BRAMSON, J.; INMAN, M.; XING, Z. TNF- $\alpha$  is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. **J. Clin. Invest.**, v. 113, n.3, p. 401-413, 2004.

WAAGE, A.; BARKE, O. Glucocorticoids suppress production of tumor necrosis factor by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. **Immunology**, v. 63, p. 299, 1988.

WAGNER, C. L.; MASCELLI, M. A.; NEBLOCK, D. S.; WEISMAN, H. F.; COLLER, B. S.; JORDAN, R. E. Analysis of GP IIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. **Blood**, v. 88, p. 907-914, 1996.

WASSERMAN, S.I. Platelet activating factor as a mediator of bronchial asthma. **Hosp. Practice**, v.23, p.49-56, 1988.

WEDMORE, C.V.; WILLIAMS, T. J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. **Nature**, v.289, p.646-650, 1981.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 835-870, 2003.

WILLIAMS, T.J.; PECK, M.J. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. **Nature**, v.270, p.530-532, 1977.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of rats as an assay method for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine**, v. 11, p. 544-547, 1962.

WINTERBOURN, C. C.; VISSERS, M. C.; KETTLE, A. J. Myeloperoxidase. **Curr. Opin. Hematology**, v. 7, p. 53-58, 2000.

WHALEY, K.; FERGUNSON, A. Molecular aspects of complement activation. **Mol. Aspects Med.**, v. 4, p. 209-273, 1981.

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

WONG, M.M.; FISH, E. M. Chemokines: Activators of sensory neurons. **Ann. Rev. Physiol.**, v.59, p. 457-482, 1997.

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

YOSHIMURA, T.; MATASUSHIMA, K.; TANAKAR, S.; ROBINSON, E.  
A.; APPELLA, E.; OPPENHEIM, J.J.; LEONARD, E.J. **Interleukine-8**. In:  
THONSON, A.W. The Cytokine Handbook, 2 ed. Academic Press: San diego, 303-  
318, 1994.

## **ANEXO**