

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e
Farmacologia

Dissertação de Mestrado

**Avaliação Das Atividades Farmacológicas De
Fração Proteolítica Obtida Do Látex Da *Carica
candamarcensis* Em Modelos De Inflamação
Aguda E Crônica**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Miriam Teresa Paz Lopes

Co-Orientador: Prof. Dr. André Klein

DEZEMBRO/2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Sandra Castro Christiano Coelho

**Avaliação Das Atividades Farmacológicas
De Fração Proteolítica Obtida Do Látex Da
Carica candamarcensis Em Modelos De
Inflamação Aguda E Crônica**

Dissertação de Mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, com ênfase em Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Miriam Teresa Paz Lopes

Co-Orientador: Prof. Dr. André Klein

Belo Horizonte - MG - Brasil

2008

Trabalho realizado nos Laboratórios:

Substâncias Antitumorais e Inflamação e Dor, Departamento de Farmacologia,
Angiogênese, Departamento de Fisiologia e Biofísica e

Biologia Molecular de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica e
Imunologia

Todos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais

Dedico este trabalho aos meus pais pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, ao Vovô Lindo e a Vovó Laura. Apesar da distância que nos separa, vocês sempre estiveram presentes em minhas orações, meus pensamentos e principalmente no meu coração. O amor que sinto por vocês é imensurável.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da vida, eterna fonte de iluminação, sabedoria e constante companhia.

Ao papai e mamãe, pelo apoio financeiro durante esta caminhada, permitindo assim a realização de um sonho;

À minha família paterna e materna, em especial meus pais, irmãos e tias (Almira, Arilma e Ademir), exemplos de luta, persistência, otimismo e amor, que me acompanharam durante toda esta caminhada;

Ao marido Fernando, pelo amor, apoio, carinho, ajuda nos experimentos de angiogênese, por compreender minha ausência e principalmente por enxugar minhas lágrimas e não me deixar desistir durante os momentos de dificuldades;

À família Coelho, minha segunda família, por me acolher como uma filha;

À minha orientadora e “mãe” científica, Prof^a. Dr.^a Miriam Teresa Paz Lopes, exemplo de dedicação à pesquisa, por todos esses anos de amizade, ensinamentos, “puxões de orelha” e pela credibilidade em mim confiada;

Ao, Prof. André Klein, meu co-orientador pela presteza em me receber em seu laboratório e pelos ensinamentos e inestimáveis contribuições no âmbito da inflamação;

Ao Prof. Carlos Salas Bravo pela ajuda indispensável para a realização deste trabalho;

Às Prof^a(s) Janetti Nogueira Francischi e Sílvia Passos Andrade pelos ensinamentos sobre edema e angiogênese;

Às “irmãs e irmãos” do laboratório de Substâncias Antitumorais (Lulu, Cassinha Aninha, Cinthia, Fernandinha, Dalton, Cris, Celso, Imaculada, Kátia, Luís, Rogério, Flavinha e Heveline), pela união, amor, presteza, alegria e principalmente por me acolherem no momento que a ansiedade quis me derrubar;

Aos amigos do laboratório de Produtos Naturais (Marco Túlio, Rafa, Henrique, Raquel, Natássia, Gabi, Isabela, Clarice, Andréa) e Inflamação e Analgesia e Dor (Rafa, Gustavo, Celso, Paty, Dani, Luciana e Renato), pela ajuda nos experimentos, apoio e pela alegre convivência.

Ao Ric, pela ajuda, pelos momentos de descontração e risadas;

Aos funcionários de outros laboratórios, do CEBIO, da biblioteca do ICB e da Secretária de Pós Graduação, em especial, à Celinha, Webster, Jorge e Rinaldo, pela dedicação aos pós-graduandos;

Aos meus queridos amigos de Ipatinga, Belo Horizonte e Diamantina pela força, carinho e torcida, para que tudo terminasse bem;

Enfim, a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

RESUMO

A atividade cicatrizante tópica da fração P1G10, derivada do látex de *C. candamarcensis*, foi demonstrada por nosso grupo em modelos de dermoabrasão e queimadura. Temos indícios que essa atividade se dê pela somatória/sinergismo de ações debridante e mitogênica, não descartando a possibilidade de outras, como por exemplo, a ação das cisteíno proteases contidas na fração sobre o processo inflamatório, já que este constitui uma das fases da cicatrização. No presente estudo, foram avaliados parâmetros de inflamação aguda (formação de edema e recrutamento celular) e crônica (angiogênese) na presença de P1G10 com o objetivo de estudar a participação da mesma sobre o processo inflamatório. A administração local da fração P1G10 na pata de ratos Holtzman (0,1 e 1 mg/pata) induziu efeito edematogênico dose-dependente ($0,7 \pm 0,1$ e $1,2 \pm 0,1$ ml, respectivamente, $p < 0,05$), com pico máximo na primeira hora, e tendo como mediadores envolvidos histamina, serotonina e prostaglandinas. Além disso, o tratamento, sistêmico com a fração com doses superiores a 5 mg/kg apresentou efeito antiedematogênico durante a terceira e quarta hora ($0,4 \pm 0,02$; $0,42 \pm 0,00$, respectivamente, $p < 0,05$) independente da atividade proteolítica. A injeção intraperitoneal (0,5 mg/cavidade) de P1G10 induziu um recrutamento de leucócitos ($33,2 \pm 5,6 \times 10^{-5}$ céls/ml, $p < 0,05$), constituído principalmente de neutrófilos, sendo esse efeito dependente de sua ação proteolítica. Entretanto, o pré-tratamento sistêmico com a fração (1 mg/kg) inibiu ($2,2 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ céls/ml, $p < 0,05$) o recrutamento celular para a cavidade peritoneal induzido pela carragenina. ($4,8 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ céls/ml, $p < 0,05$) Por fim, a administração da fração proteolítica (0,05 mg/implante) em implante subcutâneo de esponja promoveu vascularização com um aumento da quantidade de macrófagos ($1,3 \pm 0,5$ $\mu\text{g}/\text{Hb}/\text{mg}$, $p < 0,05$), sendo esse efeito independente de sua atividade proteolítica. O tratamento sistêmico com P1G10, por sua vez, não mostrou qualquer atividade sobre a formação de novos vasos nas doses investigadas (0,5 e 5 mg/kg). Uma vez que ficou aqui demonstrada a ação de P1G10 sobre eventos do processo inflamatório importantes na reparação tecidual, sugerimos que esses efeitos aliados às atividades debridante e mitogênica contribuem para a cicatrização cutânea promovida pela fração.

Palavras-chave: Cicatrização. Inflamação. Protease.

ABSTRACT

The topical healing activity of P1G10 fraction, derived from the latex of *C. candamarcensis*, has been demonstrated by our group in models of dermabrasion and burn. We have evidence that this activity results from a combination of debriding and mitogenic actions on the target. However, we cannot rule out the possibility of other factors involved in the therapeutic effect observed. In this study, we assessed the acute parameters (edema, cell recruitment) and chronic inflammation (angiogenesis) in the presence of P1G10, to determine its influence on the inflammatory process. Local administration of P1G10 in the paw of Holtzman rats (0.1 and 1 mg / paw) induced a dose-dependent edematogenic effect (0.7 ± 0.1 and 1.2 ± 0.1 ml respectively, $p < 0.05$), with the maximum peak attained within the first hour. Histamine, serotonin and prostaglandins were to be the modulators involved in this effect. Moreover, systemic pre-treatment with P1G10 at doses higher than 5 mg/kg induced edematogenic effect during the third and fourth hour (0.4 ± 0.02 ; 0.42 ± 0.00 , respectively, $p < 0.05$). The edematogenic effect does not depend on the proteolytic activity of the fraction, as the iodoacetic inhibited enzyme preserve this effect. Intraperitoneal injection (0.5 mg/cavity) of P1G10 induced leukocytes recruitment ($33.2 \pm 5.6 \times 10^{-5}$ cells/ml, $p < 0.05$), consisting mainly of neutrophils, but, this effect depends on the proteolytic activity of the fraction. When P1G10 (1mg/kg) was given systemically it inhibited ($2.2 \pm 0.4 \times 10^{-5}$ cells / ml, $p < 0.05$) cell recruitment into the peritoneal cavity previously induced by carrageenan ($4.8 \pm 0.6 \times 10^{-5}$ cells / ml, $p < 0.05$). Finally, administration of the proteolytic fraction (0.05 mg/implant) in subcutaneous sponge implants promoted vascularization, accompanied by an increase in the amount of macrophages at the implant site ($1.3 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{Hb}/\text{mg}$, $p < 0.05$), this effect being independent of P1G10 proteolytic action. The systemic treatment with P1G10, however, did not significantly increase the formation of new blood vessels, at (0.5 and 5 mg/kg). Since a modulatory activity of P1G10 on inflammatory events, which relevant to tissue repair were demonstrated here, we suggest that these effects, combined with the debriding and mitogenic actions of the fraction, contribute to the skin healing activity of P1G10.

Key-words: Cicatrization. Inflammation. Proteases.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Edema induzido por diferentes doses de P1G10 e carragenina na pata de ratos.....	42
FIGURA 2: Participação de diferentes mediadores inflamatórios no edema induzido em pata de ratos.....	44
FIGURA 3: Efeito antiedematogênico de P1G10 sobre o edema induzido por Cg na pata de ratos.....	45
FIGURA 4: Medida de edema após administração <i>i.pl.</i> de P1G10, inibida ou não por IAA.....	46
FIGURA 5: Participação da atividade proteolítica de P1G10 na resposta antiedematogênica.....	48
FIGURA 6: Recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos Swiss após a injeção intraperitoneal de P1G10 inibida ou não por IAA.....	50
FIGURA 7: Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos Swiss após a injeção intraperitoneal de P1G10 inibida ou não por IAA.....	52
FIGURA 8: Efeito da administração sistêmica de P1G10 sobre o recrutamento de leucócitos em camundongos Swiss.....	54
FIGURA 9: Neovascularização em esponjas implantadas em camundongos tratados com P1G10 inibida ou não com IAA.....	55
FIGURA 10: Atividade de Mieloperoxidase e N-Acetil-Glicosaminidase em implantes de esponja de camundongos Swiss tratados com P1G10.....	56
FIGURA 11: Dosagem de hemoglobina avaliada em implantes de esponja após administração sistêmica de P1G10.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA** = Análise de variância
bFGF = Fator de crescimento básico de fibroblastos
C = Controle
CEBIO = Centro de Bioterismo
COX = Ciclooxigenase
Cg = Carragenina
D.O. = Densidade óptica
DMSO = Dimetil sulfóxido
DTT = Ditioneitol
EDTA = Etileno-diamino-tetracetato dissódico
ELISA = Enzime-linked immunosorbent assay (ensaio imunoenzimático)
EPM = Erro Padrão da Média
GM-CSF = Fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos
Hb = Hemoglobina
HE = Coloração Hematoxilina-Eosina
HTAB = Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IAA = Iodoacetamida
ICB = Instituto de Ciências Biológicas
ICAM = Molécula de adesão intercelular
IFN- α = Interferon alfa
IFN- β = Interferon beta
IFN- γ = Interferon gama
Ig = Imunoglobulina
IL = Interleucina
i.pl. = Intraplantar
i.p. = Intraperitonal
mg = Miligrama
 μ l = Microlitro
 μ g = Micrograma
MPO = Mieloperoxidase
n = Número de animais (ratos ou camundongos)
NAG = N-acetilglicosaminidase
NO = Óxido nítrico

PBS = Tampão fosfato de sódio

PDGF = Fator de crescimento derivado de plaquetas

rpm = Rotações por minuto

TMB = 3,3',5,5' – tetrametilbenzidina

TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa

TNF- β = Fator de necrose tumoral beta

UFMG = Universidade Federal de Minas Gerais

5-HT = 5-hidroxitriptamina (serotonina)

SUMÁRIO

1- Introdução	14
1.1-Processo de cicatrização tecidual.....	17
1.2-Látex de Caricaceae como fonte de proteases.....	19
1.2.1-A espécie <i>Carica candamarcensis</i>	21
1.3-Avaliação bioquímica e farmacológica do látex de <i>Carica candamarcensis</i>	22
2- Objetivos	26
2.1-Geral	26
2.2-Específicos	26
3- Materiais e Métodos	27
3.1-Materiais	27
3.1.1-Animais.....	27
3.1.2-Reagentes Químicos	27
3.1.3-Equipamentos	27
3.1.4- Demais Materiais utilizados.....	28
3.1.5- Soluções.....	29
3.2- Métodos	33
3.2.1-Obtenção da fração proteolítica P1G10 inibida ou não por iodoacetamida... 33	
3.2.2-Avaliação dos efeitos da P1 G10 inibida ou não por IAA sobre modelos experimentais de inflamação aguda e crônica.....	33
3.2.2.1-Medida de edema em pata de ratos.....	33
Avaliação da indução de edema pela administração local de P1G10.....	34
Avaliação da inibição de edema de pata pela administração sistêmica de P1G10	34
Determinação dos mediadores envolvidos no edema induzido por P1G10.....	34
3.2.2.2-Medida da migração celular para a cavidade peritoneal de camundongos..	35

Avaliação da migração celular induzida pela administração intraperitoneal de P1G10.....	35
Avaliação da inibição da migração celular induzida pela administração sistêmica de P1G10.....	36
3.2.2.3- Avaliação da atividade angiogênica.....	36
Determinação do conteúdo de hemoglobina (Hb).....	37
Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO) e da N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG).....	37
Análise Estatística.....	38
4-Resultados	40
5-Discussão	58
6-Conclusões	66
7-Referências Bibliográficas	67

1- Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2003), nas últimas duas décadas, o interesse nos fitoterápicos cresceu de modo surpreendente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (RATES *et al.*, 2001; BASSO *et al.*, 2005). Devido à importância e ao aumento na utilização desse tipo de medicamento, pesquisas vêm sendo realizadas para investigar atividades farmacológicas, como a cicatrizante, antiinflamatória e antitumoral através da utilização de diversas partes das plantas, sendo mais comumente relatado na literatura, o extrato bruto, frações, o óleo essencial provenientes das folhas, bem como componentes químicos isolados (DE CARVALHO JÚNIOR *et al.*, 2005).

Atualmente já se encontram fitoterápicos disponíveis no mercado. Dentre os quais, podemos citar, a *Arnica montana L.* utilizada por apresentar atividades farmacológicas como analgésica, antiinflamatória e antimicrobiana e o Cogumelo-do-Sol (*Agaricus blazei*), indicado como estimulador do sistema imunológico (FIRENZUOLI *et al.*, 2007; MIZUNO *et al.*, 2005). Além disso, já foram descritas substâncias isoladas com atividade analgésica (morfina e congêneres) e quimioterápicos aplicados no tratamento do câncer (vimblastina e vincristina) (citados em O'HARA *et al.*, 1998, HOAREAU & DASILVA 1999).

Apesar da grande quantidade de medicamentos de origem vegetal existentes no mercado, ainda não se encontram fármacos naturais com atividade cicatrizante eficaz. Tendo em vista essa deficiência, vários trabalhos de pesquisa vêm sendo elaborados visando não apenas o melhor tratamento, mas também alcançar a compreensão do complexo processo de cicatrização (BORGES, E. L. *et al.*, 2000).

No processo de cicatrização das feridas, as tentativas humanas com o uso de plantas no processo de reparo, se promovem desde o antigo Egito (3000 a 2500 ac) que utilizava o mel, fios de linho e diversos outros tipos de incremento no tratamento das lesões. As técnicas de Hipócrates (450 a 370 ac), como exemplo, foram fundamentais no princípio do tratamento de feridas. Além de implantar a manutenção da limpeza da área lesionada, sugeriu a irrigação de toda região com água corrente limpa, de preferência, previamente fervida, bem como, o uso do vinho e vinagre (extraído do fruto de *Vitis sp.*) (revisado por ANDRADE, 1999).

Em 1774, Scheele, químico sueco descobriu o cloro. O hipoclorito foi utilizado entre os anos de 1820 e 1830, como relatou o francês Labarraque, em descontaminação de feridas de superfícies; assim como as soluções de iodo utilizadas entre 1861 e 1865 (FERNANDES, 2000).

Entre o final de 1840 e a segunda Guerra Mundial foi incorporada a utilização de anti-sépticos e agentes tópicos com ação antimicrobiana, bem como, a proteção ao tratamento de feridas com coberturas secas. Este fato ocorreu como consequência às descobertas de Pasteur sobre a “Teoria dos germes”. Lister, em agosto de 1865, correlacionando sua prática com os achados de Pasteur, utilizou para tratamento de uma ferida exposta, a limpeza da mesma com água fenicada e curativo de algodão embebido em ácido fênico a 10%, com bons resultados. Sua iniciativa diminuiu os índices de gangrena e amputações em pacientes com tal agravo nas enfermarias de cirurgia da Universidade de Glasgow. Porém, o ácido fênico pode provocar desde um eritema até a necrose dos tecidos, dependendo do tempo de contato e da concentração das soluções, devido à sua propriedade queratolítica (rompimento das pontes de enxofre da queratina) e consequente poder de absorção rápida pela pele, com possibilidade de causar severas queimaduras, tendo assim, seu uso descontinuado (RIERA, 1969)

No final do século XIX e início do XX, as idéias sobre microorganismos de Pasteur começaram a ser aceitas e aplicadas no tratamento de feridas, havendo uma preocupação em cobri-las para protegê-las das contaminações e infecções (EAGLSTEIN, 1990). O uso do álcool tornou-se mais comum, assim como dos anti-sépticos metálicos. Por volta de 1920, surgiram os mercúrios orgânicos, como o mercúrio cromo, em substituição aos inorgânicos, para os quais as bactérias já haviam desenvolvidos resistência. A prata foi largamente disseminada nessa época para tratamento de feridas por queimaduras. Também, sais inorgânicos de alguns metais foram utilizados, como zinco, ferro e alumínio (ANDRADE, SEWARD & MELO, 1992)

A partir do século XX, surgiram os antibióticos tópicos, bem como as pomadas de corticóides. A solução de hipoclorito foi novamente introduzida para a limpeza de feridas em 1915, por Dakin (SIQUEIRA JÚNIOR, MORAES & LOPES, 1999), mas posteriormente contra-indicada em decorrência de seus efeitos deletérios aos fibroblastos, ceratinócitos e células endoteliais vasculares, além de provocar dor (LAXER & HANSBROUGH, 1991). O Ministério da Saúde do Brasil

contra indicou a utilização do hipoclorito, por ser tóxico e irritante às mucosas (GRAZIANO, SILVA & BIANCHI, 2000).

Entre os anos de 1920 e 1940, surgiram as pomadas contendo enzimas, destinadas ao desbridamento enzimático das feridas. No decorrer desse século, outras soluções anti-sépticas foram utilizadas, tais como violeta de genciana, clorexidina, quartenários de amônio, polivinil-pirrolidona-iodo (PVP-I), entre outras. (ANDRADE, M.N.B. *et al.*, 1992).

A partir de 1950, experimentos realizados em animais, com o intuito de observar a cicatrização, resultaram em experiências revolucionárias sobre este processo. Roove demonstrou que um ambiente úmido, sem crosta, aumentava a migração de células epiteliais através do leito da ferida, facilitando o seu fechamento (FIELD, C.K. & KERSTEIN, M.D, 1994). A partir de então, o princípio da cicatrização úmida foi aceito, pois promovia interação direta com o ambiente da ferida (EAGLSTEIN, 1990).

Pesquisas dos últimos anos demonstraram que as soluções anti-sépticas vêm causando mais transtornos do que benefícios no processo de cicatrização, por serem citotóxicas para fibroblastos, interferindo na formação de colágeno, retardando a epitelização e diminuindo a força tensional do tecido neoformado (DOUGHTY, D.B., 1992; GONZALEZ, L.M.C., 1997).

O aumento do interesse de pesquisadores, indústrias farmacêuticas e a população em geral, em descobrir uma forma de tratamento eficaz para o processo de cicatrização, incentivam um crescimento no número de estudos científicos sobre a utilização de fitoterápicos no processo de reparação tecidual.

Nos dias atuais, a terapia tópica de feridas é fundamentada em pesquisas científicas sobre a fisiologia de reparação tecidual, e norteado pelos seguintes princípios: remoção de tecidos necróticos e corpos estranhos do leito da ferida (desbridamento), identificação e eliminação dos processos infecciosos, obliteração dos espaços mortos, manutenção do leito da ferida úmida, promoção do isolamento térmico e proteção da ferida de traumas e de invasão bacteriana, sendo que a limpeza e a cobertura caracterizam as etapas da terapia tópica (YAMADA, 1999).

1.1-Processo de cicatrização tecidual

A cicatrização de lesões consiste em uma cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e a reconstituição do tecido. Nesse processo estão envolvidos diversos fenômenos bioquímicos e fisiológicos de modo que seja garantida a restauração tecidual (BORGES, E.L & CHIANCA, T.C.M., 2000), ocorrendo de forma interdependente e simultânea (SANTOS, 2000). De um modo geral, são fenômenos que podem ser divididos em quatro fases: (1) uma fase de coagulação, de início imediato após o trauma, caracterizada pela formação de um tampão hemostático primário (crosta hemato-fibrinosa), formado por plaquetas, ativação dos fatores de coagulação e liberação de mediadores químicos solúveis, responsáveis pelo desencadeamento dos estágios subseqüentes; (2) uma fase inflamatória, responsável por alterações vasculares e influxo de células inflamatórias (leucócitos polimorfonucleares, monócitos e linfócitos) para o sítio da lesão; (3) uma fase de proliferação, caracterizada pelo aumento de células endoteliais de pequenos vasos sanguíneos (angiogênese), fibroblastos e produção de matriz de colágeno, responsáveis pela formação do tecido de granulação, e início da proliferação de células epiteliais das camadas basais; e (4) uma fase reparadora, responsável pela remodelagem tecidual, com a substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo denso, e a recomposição celular da epiderme (PEREIRA, 2002; extraído de ROBINS *et al.*, 2005).

A fase inflamatória da cicatrização consiste em uma etapa de extrema importância no processo de reparo tecidual. Inicia-se imediatamente após a lesão, causando uma vasoconstrição por 5 a 10 minutos, inicialmente reflexa, propiciando o fechamento dos vasos lesionados. Em seguida, as células endoteliais retraem-se e perdem suas conexões, aumentando a permeabilidade vascular e permitindo a passagem dos elementos sangüíneos, como plasma, eritrócitos e leucócitos para o local da injúria. Este aumento de permeabilidade vascular, com extravasamento de elementos para o exterior do vaso forma um exsudato, cuja intensidade correlaciona-se com o tipo e grau de estímulo flogístico.

Citado por Phillips *et al.* (1995) e Kumar *et al.* (2005), a resposta inflamatória ocorre no tecido conjuntivo vascularizado, no plasma, nas células circulantes, nos vasos sangüíneos e nos componentes extravasculares do tecido conjuntivo, manifestando-se pelos sinais clínicos de dor, calor, rubor e edema. Kumar *et al.* (2005), relataram que o edema inflamatório é a marca registrada da inflamação aguda; este fenômeno, associado ao aumento da pressão hidrostática secundária à

vasodilatação, resulta em uma acentuada perda de líquidos e a um acúmulo no tecido intersticial, o que caracteriza o edema. Ainda, conforme Garcia-Leme *et al.*(1973), o processo inflamatório é desenvolvido e mantido graças à liberação de mediadores químicos solúveis (aminas vasoativas, citocinas, fator de ativação plaquetária, radicais superóxidos e derivados do ácido araquidônico); destacando-se, dentre estes, as citocinas (DINARELLO CA, WOLF SM., 1993). Neste sentido, para Mastorakos *et al.*(1993), as citocinas podem ser classificadas como antiinflamatórias ou pró-inflamatórias e, em alguns casos, com ambas ações (PEDERSEN BK, 2000), como acontece com a interleucina 6 (IL-6). Dentre as citocinas, que parecem ser importantes mediadores na resposta inflamatória aguda, destacam-se a classe de interleucina 1 (IL-1), que consiste de três polipeptídeos estruturalmente semelhantes; os dois primeiros polipeptídeos são representados pela interleucina 1 alfa (IL-1 α) e interleucina 1 beta (IL-1 β) e a terceiro é representado pelo antagonista de receptor de interleucina 1 (IL-1ra), além da IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (DINARELLO CA., 1991) .

Juntamente com todas estas alterações, que correspondem à resposta vascular, existe uma resposta celular (DOUGHTY,D.B. , 1992).

Algumas células são importantes nesta fase inflamatória da cicatrização: os neutrófilos são responsáveis pela eventual digestão de bactérias e tecidos desvitalizados e os monócitos diferenciam-se em macrófagos, por ação de fatores locais de diferenciação celular como o GM-CSF (LEE J,KIM Y,*et al.*, 2008) e auxiliam na fagocitose de bactérias e restos celulares. Após a injúria tecidual, são liberados mediadores inflamatórios tais como tripsina, triptase e outras proteases, IL-1 β , IFN- γ , VEGF, endostatina, peptídeos vasoativos e mediadores de origem lipídica, que irão auxiliar na regulação deste processo (CHEN *et al.*, 1993, SUZUKI *et al.*, 1995)

O fator de crescimento tecidual é liberado pelas células epidérmicas e plaquetas. Alguns fatores de crescimento, mediadores e proteases têm sido estudados sobre suas influências na cicatrização de feridas. Já se sabe que as collagenases e outras proteases produzidas por macrófagos e células epidérmicas orientam as fibras colágenas difusas, facilitando assim, a formação de tecido de granulação que, posteriormente, será substituído por tecido conjuntivo (ABBA, 1995).

Nos últimos anos tem-se dado muita atenção ao papel desempenhado pelas enzimas proteolíticas de origem vegetal no processo de reparação dos tecidos

danificados e seu efeito na retirada de tecidos necróticos, desvitalizados e infectados da lesão (SANCHEZ *et al.*, 1993, ROGENSKI *et al.*, 1998). Desta forma, a papaína vem sendo utilizada há algum tempo em estudos clínicos, com resultados favoráveis (SANCHEZ *et al.*, 1993, ROGENSKI *et al.*, 1998). Esta enzima, de origem vegetal extraída da *Carica papaya*, é, após o seu preparo, um pó de cor leitosa, com odor forte e característico. Em um estudo experimental de reparação tecidual de feridas cutâneas utilizando a papaína a 2% foi observado o desenvolvimento de tecido de granulação mais exuberante, apresentando maior número de fibroblastos e fibras colágenas, em relação ao grupo controle. A papaína atuou de forma eficaz nas fases inicial e de fibroplasia das feridas tratadas (SANCHEZ *et al.*, 1993). A solução de papaína a 2% é utilizada para promover a granulação e epitelização da ferida, e a 10%, no desbridamento de tecido desvitalizado (SILVA, 2003).

Estudos realizados por ROGENSKI *et al.*, (1998) afirmam que a papaína não danifica os tecidos íntegros, em virtude da ação da antiprotease plasmática, a antitripsina 1, que impede a ação das proteases nos tecidos saudáveis, não interferindo na integridade do tecido viável, porém deve-se ter precaução com o produto da digestão desta enzima, ou seja, o exsudato da ferida contendo esta substância, pode ser irritativa sobre a pele íntegra, sendo necessária trocas freqüentes de curativos, para evitar lesões na pele ao redor da ferida.

1.2-Látex de *Caricaceae* como fonte de proteases

A família *Caricaceae* contém diversas espécies frutíferas, todas de origem americana. Esta família é composta por um grupo de vegetal de largo interesse comercial, pelo fato do látex extraído de seus frutos serem fonte tradicional de enzimas proteolíticas (BRAVO *et al.*, 1994). Este látex é sintetizado por células especiais denominadas laticíferos que, além da síntese, também armazena o látex em seu citoplasma (KETWICK *et al.*, 2001). Por isso, o núcleo e as organelas desta célula localizam-se periféricamente, pois a maior parte do citoplasma da célula é ocupada pelo látex. Quando a planta sofre um processo de injúria, as células que armazenam o látex se rompem e extravasam o conteúdo do citoplasma em tubos ou canais laticíferos. Estes são os vasos nos quais passa o látex antes de ser extrusado da planta. Os canais laticíferos são encontrados praticamente em toda a planta, exceto na raiz (MOUSSAOUI *et al.*, 2001).

Dentre os componentes presentes e identificados no látex de *Caricaceae*, se destacam as quitinases, inibidores de serino proteases e cisteíno proteases (AZARKAN *et al.*, 2004). Uma das funções propostas para o látex na planta que o produz é sua participação na defesa contra patógenos. A presença de inibidores de serino proteases atuaria contra herbívoros, que inibiriam enzimas digestivas causando uma disfunção e aumentando a chance de evitar um ataque recorrente pelo mesmo inseto herbívoro (AZARKAN *et al.*, 2004). Demonstrou-se, também, que as cisteíno proteases presentes no látex de *Carica papaya* possuem efeito tóxico sobre larvas de insetos herbívoros, sendo que larvas de lepidópteros acusaram efeitos tóxicos das proteases, os quais eram abolidos após tratamento das enzimas com inibidores da atividade proteolítica (HIRAYAMA *et al.*, 2004).

Outro papel fisiológico proposto para as enzimas proteolíticas do látex de *Caricaceae* está relacionado com o mecanismo de coagulação do látex após um processo de injúria. Foi descrito haver modificações na composição de peptídeos presentes no látex de *Carica papaya* quando este foi coletado em intervalos de tempos diversos após a incisão do fruto imaturo desse vegetal. Os dados mostraram que durante a coagulação do látex, vários peptídeos são processados de uma maneira ordenada (SILVA *et al.*, 1997). A ativação e processamento de proteases em seqüência e formação de coágulo no local da ferida sugerem um mecanismo de defesa e reparo tecidual similar ao encontrado em tecidos animais (MOUTIM *et al.*, 1999). Além dessa observação, estudos demonstram que enzimas proteolíticas de origem vegetal podem agir como sinalizadoras na via de transdução em células de mamífero. Para exemplificar, podemos citar a bromelina (mistura de cisteíno proteinases em *Ananus comosus*) que age como reguladora celular a partir de interações específicas com receptores localizados na membrana de células alvos, bloqueando a via Ras/Map quinases. Dependendo da célula, estas proteinases poderão estar envolvidas em processos de proliferação celular, desenvolvimento, inflamação e angiogênese (DERY *et al.*, 1998; MYNOTT *et al.*, 1999).

A partir do látex extraído de uma espécie de *Caricaceae*, a *Carica papaya*, obtém a papaína, que é a cisteíno protease mais bem estudada até o momento, no que se refere à sua seqüência de aminoácidos, estrutura terciária e mecanismo de ação (YAMAMOTO *et al.*, 1991). Esta protease apresenta utilizações comerciais em diversos processos industriais, tais como amaciante de carne, no curtimento de couros, clarificação de cervejas e solubilização de proteínas insolúveis (CASTRO,

1981; POULTER *et al.*, 1985), da mesma forma que vem sendo empregada na clínica como adjuvante digestivo nas deficiências da digestão de proteínas e nas dispepsias por putrefação de alimentos no aparelho digestivo. Também é usada como substância antiulcerosa promovendo um processo de cicatrização no tratamento de feridas (CHEN *et al.*, 1981; BEUTH *et al.*, 2001). Foi observado que um grupo de proteases, do qual fazia parte a papaína, foi capaz de reduzir a disseminação de metástases de carcinoma de pulmão em camundongos (WALD *et al.*, 1998), abrindo precedentes para o uso destas enzimas como substâncias antimetastáticas. Recentemente, uma mistura comercial de papaína com uréia tem sido amplamente empregada no processo de desbridamento enzimático de feridas (AYELLO *et al.*, 2004).

1.2.1- A espécie *Carica candamarcensis*

Dentre aproximadamente 50 espécies que compõem a família *Caricaceae*, a *Carica candamarcensis*, nativa da América do Sul, é encontrada predominantemente em altitudes superiores a 1000 metros, principalmente na região andina. Esta planta é mais conhecida atualmente como *Vasconcellea cundinamarcensis* e, popularmente, como “mountain papaya” ou “mamão da montanha” (WALRAEVENS *et al.*, 1999). Caracteriza-se morfológicamente por apresentar um tronco grosso que pode chegar até 10 metros de altura, sendo mais largo na base e, freqüentemente, ramificado na sua região apical, contendo uma coroa compacta de folhas nessa região. O fruto é elipsóide, de coloração amarelada quando maduro, possui cinco depressões largas e longitudinais, mede de 5 a 15 cm de comprimento e contém uma polpa delgada, aquosa e aromática, que somente pode ser consumida após o cozimento (LEON, 1987).

No látex de *C. candamarcensis* se encontram carboidratos, vitaminas e peptídeos de baixo peso molecular (BAEZA *et al.*, 1990), além de enzimas do grupo das cisteíno proteases dotadas de atividade proteolítica superior às encontradas em *C. papaya* (BAEZA *et al.*, 1990; BRAVO *et al.*, 1994).



Figura 1- Planta e fruto da espécie *Carica candamarcensis*.

1.3-Avaliação bioquímica e farmacológica do látex de *C. candamarcensis*:

Com base nas funções atribuídas ao látex de Caricaceae no processo de regeneração de injúrias na planta, participando na formação do coágulo e cicatrização, nosso grupo de pesquisa vem se dedicando ao estudo da caracterização bioquímica e farmacológica de proteases do látex de *C. candamarcensis*, buscando uma aplicação medicamentosa como cicatrizante para esse produto ou seus derivados. A caracterização bioquímica dos componentes do látex teve início com a coleta do mesmo a partir de incisões no epicarpo de frutos imaturos da espécie. O látex foi liofilizado e submetido a uma separação cromatográfica, através da coluna de gel filtração Sephadex G-10, sendo assim obtidas cerca de 60 frações, que foram agrupadas em dois picos principais (denominadas frações P1G10 e P2G10) conforme o perfil protéico e nível de atividade amidásica (GOMES *et al.*, 2005).

Os experimentos iniciais com estas frações demonstraram que a fração P2G10 apresentava atividade mitogênica em fibroblastos, semelhante ao EGF, sendo esta atividade dependente de sua natureza proteolítica. (SILVA *et al.*, 2003). De forma interessante, também foram obtidos e publicados pelo grupo resultados sobre a atividade mitogênica de duas proteases, agora purificadas em colunas CM Sephadex e Mono S, derivadas da fração P1G10 do látex (GOMES *et al.*, 2005). Uma dessas frações - CC23a - mostrou ser uma proteinase com massa relativa de 23.000 daltons, e estrutura monomérica determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Ao comparar a atividade proliferativa da CC23a com a

papaína, se observa um estímulo proliferativo (<20 %), ao passo que o estímulo da CC23a é 4 vezes superior (resultados não publicados). As seqüências dessa proteína e de uma segunda, também obtida por cromatografia em MonoS, foram depositadas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=16118824> e [28401931](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=28401931)). Também foi requerida a patente sobre estas proteases mitogênicas obtidas do látex de *Carica candamarcensis*, bem como a utilização das mesmas reservada aos professores pertencentes ao grupo de pesquisa liderado pelo professor Carlos Edmundo Salas, Miriam Teresa Paz Lopes e Abraham Schnidermann (US 2006/0153830 A1) (SALAS *et al.*, 2006).

Resultados obtidos com a fração P1G10 do látex de *C. candamarcensis* apresentaram atividade cicatrizante evidenciável sobre escoriações promovidas em camundongos “*Hairless*”. O efeito foi dose dependente entre 0,1 e 1% da fração incorporada em creme Polawax, com taxa de cicatrização superior às lesões controle (MELLO *et al.*, 2006; LEMOS *et al.*, 2006).

A neoformação vascular (angiogênese), etapa imprescindível da cicatrização por proporcionar o fornecimento de oxigênio e nutrientes necessários para sustentação do metabolismo celular e reparo tecidual, também foi avaliada com este derivado protéico. Para isso, implantes de polietileno previamente afixados na região subcutânea dorsal de camundongos Swiss receberam soluções de P1G10 nas concentrações de 0,1 e 1%. Após 8 dias de administração intra-implante, o conteúdo de hemoglobina presente nessas estruturas foi determinado. P1G10 a 0,1% promoveu um aumento de 57% na concentração de hemoglobina em relação ao controle. Por outro lado, a concentração de 1% provocou uma redução de 35%, o que pode ser explicado pela sobreposição da atividade proteolítica em relação à atividade mitogênica (MELLO, 2005).

A avaliação da toxicidade tópica mostra que a exposição à fração protéica P1G10 nas concentrações de 0,1 e 1% em peles íntegras e escarificadas de camundongos “*Hairless*” não promoveu qualquer alteração que pudesse ser caracterizada como um efeito toxicológico (irritação e corrosão). Já a concentração de P1G10 a 10% apresentou um potencial irritante moderado sendo, no entanto, a irritação reversível após 5 dias da última aplicação (MELLO, 2005). A toxicidade tópica crônica dessa fração também foi avaliada, onde se aplicou, durante três e seis meses, P1G10 na concentração de 0,1% (maior efeito cicatrizante) em

camundongos Swiss previamente depilados. Os resultados da análise histopatológica e da variação de peso dos órgãos selecionados mostram que não houve diferenças entre o grupo controle (veículo - Polawax) e o tratado com P1G10, indicando uma ausência de toxicidade no modelo estudado (LEMOS *et al.*, 2006).

Visando a avaliação da capacidade de cicatrização em outros tecidos, a fração P1G10 foi submetida a ensaios de atividade antiulcerogênica através da determinação de seus efeitos cicatrizante gástrico e citoprotetor. Quando comparada aos medicamentos utilizados na clínica em suas respectivas doses experimentais ideais, ranitidina (100 mg/kg) e omeprazol (10 mg/kg), a fração protéica (10 mg/kg) foi capaz de promover cicatrização de lesões induzidas, localmente, por ácido acético similar (não diferente estatisticamente) à do grupo tratado com o omeprazol (63%) e superior ao apresentado pela ranitidina (52%). Já a atividade citoprotetora gástrica sobre úlceras agudas, induzidas pela administração subcutânea de indometacina - 50 mg/kg, mostram que P1G10 (v.o.) nas doses de 0,1; 1 e 10 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente o índice de ulceração e o número de úlceras quando comparados aos controles, de modo dose-dependente (MELLO *et al.*, 2006; 2007).

Estudos toxicológicos, realizados até o momento, demonstram que as atividades de algumas das enzimas do citocromo P450, o consumo alimentar, o ganho de peso corporal, o peso do fígado e os valores de proteínas totais microsossomais encontrados nos grupos controle e tratado com P1G10 (334 mg/kg/dia durante 6 dias consecutivos, na dose total de 2 g/kg por via oral) não apresentam diferenças estatísticas significativas (MELLO, 2005). Além disso, os medicamentos atualmente utilizados – ranitidina e omeprazol - apresentam o inconveniente de alterar os parâmetros hepáticos e interagirem farmacocineticamente com outros fármacos. Também pudemos constatar que a fração P1G10 não apresenta efeito mutagênico avaliado pelo teste Ames (AMES *et al.*, 1973). O estudo foi feito com um painel de cepas de *Salmonella typhimurium* (TA 97, 98, 100 e 102), na presença e ausência de extrato S9 (extrato hepático de ratos tratados com fenobarbital). Os resultados mostraram que o número de colônias que sofreram reversão pelo tratamento com P1G10 (0,1 e 1% p/v) é semelhante ao de reversões espontâneas (controle negativo) e 10 vezes menores que o obtido após o tratamento com azida sódica (controle positivo) (dados não publicados). Essa ausência de toxicidade e de alterações nas enzimas hepáticas, aliada à comprovada atividade cicatrizante

(MELLO, 2005), coloca P1G10 como um promissor fármaco para o tratamento de cicatrizações de feridas bem como de úlceras gástricas.

Uma vez que nosso grupo mostrou atividade cicatrizante significativa promovida por fração proteolítica obtida do látex do fruto da *Carica. candamarcensis*, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de indução da resposta pró e antiinflamatória de cisteíno proteases com atividade cicatrizante isolada do látex da *C. candamarcensis* (fração P1G10) em doses e vias de administrações variadas, utilizando modelos experimentais *in vivo*

2- OBJETIVOS

2.1-Objetivo geral

Avaliar o potencial de indução da resposta pró e antiinflamatória de fração isolada do látex de *C. candamarcensis* (P1G10), utilizando modelos experimentais *in vivo*.

2.2-Objetivos específicos:

- Determinar a capacidade indutora de resposta inflamatória e/ou antiinflamatória aguda de P1G10, através da medida do edema induzido na pata de ratos e da migração ou recrutamento celular em peritônio de camundongos;
- Determinar os principais mediadores envolvidos no edema induzido por P1G10 em patas de ratos;
- Determinar a capacidade indutora de resposta inflamatória e/ou antiinflamatória crônica (angiogênese) de P1G10, utilizando o modelo de implante de esponja subcutâneo em camundongos;
- Avaliar o envolvimento da atividade proteolítica da fração P1G10, com o uso da fração inibida por iodoacetamida (IAA) nos efeitos acima pesquisados.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - MATERIAIS

3.1.1 - Animais:

Ratos Holtzman machos pesando entre 140-180 g, e camundongos Swiss machos, 20-25 g, foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do ICB/UFMG (CEBIO). Os animais foram mantidos com água e ração *ad libidum* em ciclo claro-escuro de 12/12 horas durante os experimentos.

3.1.2 - Reagentes químicos:

Difenidramina, Pizotifeno, Ditioneitol (DTT), Iodoacetamida (IAA), Resina “Sephadex G-10”, Carragenina, HTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio), TMB (3,3',5,5' – tetrametilbenzidina), p-nitrofenil, Peroxidase e Indometacina - **Sigma Chemical Co, St. Louis, MD, EUA.**

Dopalen (Ketamina 10%) e Xilasina 2% - **Sespo Ind e Com. LTDA, Jacareí, SP, Brasil**

Etanol absoluto, Etileno-diamino-tetracetato dissódico- (EDTA) P.A. e Triton X-100 - **Merck, Darmstadt, Alemanha.**

Reagente de hemoglobina - **Labest, Lagoa Santa, MG, Brasil**

3.1.3 - Equipamentos:

Agitador magnético modelo 252 - **Fizatron Equip. Eletr. Lab., São Paulo, SP, Brasil**

Balança eletrônica semi-analítica modelo. CT-200 - **Ohaus Corporation, Hanover, NY, USA**

Balança eletrônica analítica modelo. MT-200 - **Metter-Micronal Instrumentos S/A, São Paulo, SP, Brasil)**

Centrífuga Excelsa 2 modelo. 205_N - **Fanem-Fabr. Nac. Aparelhos eletrodomésticos, São Paulo, SP, Brasil**

Centrífuga refrigerada de média rotação, modelo. Z252MK equipada com rotor mos. 220.87.V01 - **Hemle Labortechnik Maschinenfabrik Berthold Hermle AG, Gosheim, Germany**

Deionizador de água por meio de osmose reversa - **Millipore Corporation, Bedford, MA, USA**

Espectrofotômetro de duplo feixe para faixas UV (ultra-violeta) e visível, modelo. UV-150-02 - **Shimadzu Corporation, Kioto, Japan**

Espectrofotômetro do tipo leitor de placas de Elisa com 8 x 12 cavidades **Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA.**

Estufa incubadora, munida de jaqueta de água e calibrada à temperatura de 36,5° C, atmosfera com controle de umidade e contendo 5% (v/v) de CO₂ - **Nuaire Equipaments, Plymoth, MN, USA**

Homogeinizador Ultra-Turrax - **Janke & Kunkel IKA- Labortenik, Germany**

Medidor de pH modelo. NT-PH2 - **Analion Aparelhos e Sensores Ind. & Com., Ribeirão Preto, SP, Brasil**

Microscópio óptico Olympus linha CB - **Micronal, São Paulo, SP, Brasil**

Microscópio óptico invertido modelo. CK2 - **Olympus Corporation, Lake Succes, NY, USA**

Pletismomêtro (modelo 1750) - **Ugo Basile, Itália**

3.1.4 - Demais materiais utilizados:

Câmaras de Neubauer - **Fenin-Optik, Blankenburg, Germany**

Discos de esponja de poliéster-poliuretano - **Vitafoam Ltd., Manchester, UK**

Membranas de filtros de difluorido de polivinilidene 0,22 µm e suporte metálico para filtro, tubos cônicos para microcentrífuga tipo “Eppendorf”, com capacidade para 1,0, 1,5 e 2,0 ml - **Millipore Corporation, Bedford, MA, USA**

Placas multicavidades 96 cavidades - **Nunc Inter Méd A/S, Roskilde, Denmark**

Pipetas automáticos com a capacidade máxima de 20, 200 e 1000 µl - **Gilson-Rainin Instruments Co., Emeryville, CA, USA e Eppendorf, Germany**

Ponteiras de polipropileno, tubos de polipropileno, com fundo cônico, de 15 e 50 ml de capacidade e dotados de tampa - **Cornig Incorporate, New York, NY, USA**

Tubo de polivinil PE160 - **Biovida, Brasil**

3.1.5 – Soluções:

Solução de Ácido Sulfúrico a 4M

H₂SO₄ (18M).....115,00 ml
 Água destilada.500,00 ml

Solução de albumina

Albumina bovina (Type V- Sigma).....3,00 g
 Água destilada.....100,00 ml

Solução anestésica Ketapun®

Xilasina 75 mg.....3,75 ml
 Ketamina 500 mg.....10,00ml

Solução detergente para o plestimômetro

Cloreto de sódio.....1,00 g
 Extran.....0,05 l
 Água destilada.2,00 l

Solução de difenidramina 2 mg/kg

Difenidramina.....10,00 mg
 Salina 0,9 %.....5,00 ml

Solução de dexametasona 0,5 mg/kg

Dexametasona.....	5,00 mg
PBS.....	10,00 ml

Solução de Drabkin

Reagente de hemoglobina (KCN 500mg/dl).....	10,00 ml
Água destilada.....	1,00 l

Solução de HTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio) 0,5%

HTAB	0,10 g
Tampão fosfato de sódio (80 mM e pH 5,4).	20,00 ml

Solução de indometacina 2,0 mg/kg

Indometacina.....	10,00 mg
Tris pH 8,0.....	5,00 ml

Solução de pizotifeno 2 mg/kg

Pizotifeno.....	10,00 mg
Salina 0,9 %.....	5,00 ml

Solução de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina a 2,24 M

p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina.....	0,76 mg
Tampão citrato-fosfato.....	1,00 ml

Solução de p-nitrofenol a 0,4 mM

p-nitrofenol.....	27,82 mg
Tampão citrato-fosfato pH 4,5.	500,00 ml

Solução de peroxidase

Peroxidase.....	1,00 mg (=200 U)
Tampão fosfato de sódio	2,00 ml

Solução salina 0,9%

Cloreto de sódio.....	0,90 g
-----------------------	--------

Água destilada.....100,00 ml

Solução de Triton X-100 a 0,1%

Triton X-100.....1,00 ml

Salina 0,9%.1,00 l

Solução de Turk

Violeta genciana.....100,00 mg

Ácido acético glacial.....30,00 ml

Água destilada.....70,00 ml

Tampão Tris

Tris12,11 g

Água destilada100,00 ml

O pH foi ajustado para 8,0 com solução 1 M de NaOH

Tampão citrato-fosfato

Ácido Cítrico 0,1 M.....300,00 ml

Fosfato de sódio 0,1M.....465,00 ml

Tampão fosfato de sódio 160 mM

Fosfato disódico (0,32M).....3,00 ml

Dihidrofosfato de sódio (0,32M).....47,00 ml

Água destilada.100,00 ml

O pH foi ajustado para 5,4 com solução 1 M de NaOH

Tampão Glicina a 0,2M

Glicina 0,8 M.....100,00 ml

Cloreto de sódio 0,8 M.....100,00 ml

Óxido de sódio 0,8 M.....100,00 ml

O pH foi ajustado para 10,6 com solução de NaOH (1M)

Tampão PBS sem EDTA pH 7,4:

Fosfato dibásico de sódio P.A. 1,15 g

Fosfato monobásico de potássio P.A.	0,25 g
Cloreto de sódio	8,20 g
Cloreto de potássio	0,20 g
Água destilada.....	1,00 l

O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido fosfórico 0,1 M e o tampão esterilizado por autoclavação a 120°C durante 20 minutos.

H₂O₂ (Peróxido de Hidrogênio) 1,2 M

H ₂ O ₂ (30% v/v).....	3,20 µl
Tampão fosfato de sódio (80mM e pH 5,4).	50,00 ml

TMB 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, 6,4 mM

TMB.....	1,54 mg
DMSO.....	1,00 ml

3.2 - MÉTODOS

3.2.1-Obtenção da fração proteolítica P1G10 inibida por iodoacetamida (IAA)

A fração P1G10 inibida ou não por IAA foi produzida e cedida gentilmente pelo Professor Carlos Salas Bravo, pertencente ao Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Durante todos os experimentos, foram utilizadas amostras de um único lote (604-04/06/2004). Estas foram mantidas em freezer com temperatura constante de -20°C. As atividades amidásicas foram realizadas periodicamente para verificar a manutenção da atividade proteolítica da amostra em função do tempo. As soluções aquosas de P1G10 foram preparadas sempre no mesmo dia da realização dos experimentos, com o objetivo de manter a função das enzimas proteolíticas presentes na fração.

3.2.2 - Avaliação dos efeitos da P1G10 inibida ou não por IAA sobre modelos experimentais de inflamação aguda e crônica

3.2.2.1-Medida de edema em pata de ratos (WINTER *et al.*,1962)

A mensuração do edema de pata consiste na imersão das patas posteriores de ratos Holtzman em uma solução detergente que preenche uma cubeta do hidroplestimômetro. Nesse recipiente estão presentes eletrodos sensíveis a modificações de volume do conteúdo, que emitem um sinal elétrico, que é transformado e lido em um equipamento de leitura digital. Ao posicionar a pata do animal no nível adequado, aciona-se um pedal para que a medida do volume seja registrada. Assim, os volumes das patas introduzidas na cubeta podem ser lidos em ml.

Avaliação da indução de edema pela administração local de P1G10

Cada grupo experimental continha 5 animais. Cem µl de salina 0,9%, ou P1G10 (10^{-5} -1mg / 100µl), ou P1G10 inibida por IAA (0,1 mg / 100 µl) ou Cg (100, e 500 µg / 100 µl) foram injetadas por via *i.pl* nas patas posteriores direita dos animais. As patas contralaterais (esquerdas) foram injetadas com salina estéril. Nos animais controle foram administrados 100 µl de salina somente nas patas posteriores direitas. O volume das patas foi medido imediatamente antes da administração de qualquer uma das amostras (0 h) e ½, 1, 2, 3, 4, 6 e 24 h após a injeção das mesmas. Os resultados foram expressos pela média da diferença (pata direita – pata esquerda) do volume (ml) deslocado ± erro padrão da média (EPM).

Avaliação da inibição do edema de pata através da administração sistêmica de P1G10

O volume das patas posteriores esquerdas e direitas foram medidos, e então P1G10 (0,1, e 20 mg/kg), ou salina 0,9% estéril ou indometacina (2mg / kg) foram administrados em um volume de 100 µl / 100 g do peso do animal por via *s.c.*, uma hora antes da administração de Cg intraplantar (250 µg / 100 µl/pata). A metodologia e os tempos das medidas das variações do volume foram empregados como anteriormente.

Determinação dos mediadores envolvidos no edema induzido por P1G10

Para estudar a participação de mediadores inflamatórios no edema de pata induzido por P1G10 (dose edematogênica de 0,1 mg/pata), o volume das patas posteriores esquerdas e direitas foram medidos e administrados por via *s.c.* Pizotifeno (2 mg/kg), (antagonista inespecífico de receptores de 5-HT), difenidramina (2 mg/kg), (inibidor inespecífico de receptores histamínicos) ou indometacina 2mg/kg (antagonista não específico de COX), salina 0,9% estéril e Tris pH 8,0 foram administrados em um volume de 100 µl/100g do peso do animal por via subcutânea,

uma hora antes da administração de P1G10 (100 µl / pata direita) e salina 0,9% (100 µl / pata esquerda). A metodologia e os tempos das medidas das variações do volume foram empregados como descrito anteriormente, porém as medidas foram realizadas até a 4 h, uma vez que o pico máximo do efeito edematogênico da fração ocorre entre 30 min e 1 h.

3.2.2.2 – Medida da migração celular para a cavidade peritoneal em camundongos

Avaliação da migração celular induzida pela administração intraperitoneal de P1G10

Como estímulo foi utilizado Cg 300 µg/200 µl positivo, salina estéril, e como teste, a fração P1G10 inibida ou não com IAA nas doses de 0,05 e 0,5 mg / 200µl ou, dexametasona (500 µg / kg) ou solução PBS.

Após 3h da administração por via *i.p.* das amostras, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. Foram injetadas 6 ml de PBS heparinizado (5 U.I./ml) na cavidade peritoneal. A seguir, o fluido foi recolhido através da exposição do peritônio por um orifício, após leve massagem do abdômem. Os lavados peritoniais foram recolhidos (aproximadamente 90% do volume injetado) utilizando-se pipetas plásticas de Pasteur, e adicionados em tubos plásticos de centrífuga. Os lavados foram centrifugados (1.200 rpm, 5 minutos a 4°C), os sobrenadantes descartados e os “*pellets*” suspensos em 1 ml de solução de albumina 3% para a realização de contagens celulares posteriores sob microscopia ótica. O número total de células presentes em alíquotas de 20 µl da suspensão de células adicionadas a 180 µl de líquido de Turk foi estimado através da contagem em câmara de Neubauer. Para a determinação dos tipos celulares presentes nestas suspensões, alíquotas de 100 µl dos lavados foram adicionados a 100 µl de albumina bovina 3% e processadas em cito-centrifuga, sendo que após secagem das lâminas em temperatura ambiente, foram submetidas à coloração pelo método May-Grumwald–Giemsa e procedida à contagem diferencial das células através de microscopia ótica, em objetiva de imersão.

Avaliação da inibição da migração celular pela administração sistêmica de P1G10

Como medida da atividade antiinflamatória da fração P1G10, esta protease inibida ou não por IAA (0,1 mg/kg), dexametasona (0.5 mg/Kg) ou PBS foram administrados por via subcutânea, uma hora antes do desafio com Cg (300 µg/cavidade, *i.p.*) e 3 h após, sacrificados e submetidos ao mesmo procedimento descrito anteriormente para obtenção, contagem e avaliação dos tipos celulares presentes.

3.2.2.3 - Avaliação da atividade angiogênica

A atividade angiogênica foi avaliada seguindo-se metodologia descrita por ANDRADE *et al* (1987). Desta forma, discos de esponja de poliéster-poliuretano medindo 8 mm de diâmetro por 5 mm de espessura foram usados como matriz para o crescimento do tecido fibrovascular. Um tubo de polivinil com diâmetro interno de 1,14 mm, diâmetro externo de 1,57 mm e com 12 mm de altura foi preso com linha de sutura no centro da cada disco de tal forma que o tubo permanecesse perpendicular à face do disco de esponja. Os implantes (discos de esponja com a cânula) foram confeccionados e colocados em álcool 70% v/v por no mínimo 24 h antes da implantação e, posteriormente, lavados para a remoção do álcool e esterilizados por fervura em água destilada durante 20 min antes de serem introduzidos nos animais.

Os animais foram previamente anestesiados com solução de Ketapun® *i.p.* e submetidos à tricotomia e assepsia da região dorsal com álcool 70°GL. Os animais foram então transferidos para a mesa cirúrgica com controle da anestesia durante todo ato cirúrgico. O implante foi colocado assepticamente em uma bolsa subcutânea, a qual foi feita por dissecação com uma tesoura de ponta romba, por 1 cm ao longo de uma incisão média dorsal. Posteriormente foi feita uma incisão de 2

mm na região interescapular do camundongo, permitindo a exteriorização da cânula. A incisão foi suturada com fio de nylon 3.0 usando ponto Donatti.

Os animais receberam 0,2 ml de solução de P1G10, nas doses de 0,5 e 5 mg/Kg por via subcutânea ou 0,05 e 0,5 mg de P1G10 em um volume de 50µl com ou sem iodoacetamida, intraesponja do segundo até o nono dia após a colocação dos implantes, sendo os animais sacrificados em câmara de CO₂ 10 dias após o implante. Após um período de 30 min realizou-se incisão mediana na região dorsal, e os discos de esponja foram cuidadosamente removidos, dissecados do tecido aderente, pesados e preparados para a dosagem de hemoglobina.

Determinação do conteúdo de hemoglobina (Hb) (ANDRADE, 1999)

A dosagem de hemoglobina foi realizada em implantes removidos no 10^o dia de experimento. Os animais foram sacrificados e os implantes retirados e pesados. Em seguida, as esponjas foram trituradas e homogenizadas em 2 ml de reagente de Drabkin. O homogenato foi centrifugado por 40 min a 10.000 g, 4°C, e o sobrenadante filtrado usando filtro 0,22 µm (Millipore). A concentração de hemoglobina das amostras foi determinada através de leitura espectrofométrica a 540 nm, usando leitor de microplacas de ELISA, sendo as leituras comparadas às de uma curva-padrão de Hb previamente estabelecida. A concentração de hemoglobina foi expressa em µg Hb/mg de peso úmido do implante.

Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO) e da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)

Após a dosagem de hemoglobina, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado dividido em 2 partes (uma, para a utilização da dosagem da atividade MPO e a outra parte para NAG), foram pesados e suspenso em 2,0 ml de tampão fosfato, pH 4,7 para dosagem de MPO. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 12.000 rpm durante 20 min a 4^o C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso em 2,5 ml de HTBA 0,5% pH 5,4. As

amostras foram centrifugadas em 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante coletado para o ensaio enzimático.

Para o ensaio, 25 µl de substrato TMB diluído em DMSO foram adicionados às amostras, incubadas a 37° C por 5 min. Após este período, as mesmas foram tratadas com 100 µl de ácido sulfúrico 4 nmol/l e a absorvância foi medida por espectrofotometria em 450 nm. Os resultados foram expressos em índice de atividade enzimática de MPO / mg de peso úmido do implante.

Parte do precipitado remanescente após a dosagem de Hb foi utilizada para o ensaio visando detectar os níveis da enzima N-acetil-β-glucosaminidase (NAG). O precipitado foi pesado e suspenso em 2,0 ml de solução salina 0,9% com Triton X-100 a 0,1% (4 °C). As amostras foram homogeneizadas em vórtex até obter uma suspensão homogênea e, posteriormente, centrifugada em 3000 rpm durante 10 min a 4°C. Para a realização do ensaio, foram adicionados 100 µl das amostras em duplicata a uma placa de 96 poços. Às amostras, foram adicionados 100 µl do substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-glicosaminida), diluído em tampão citrato/fosfato pH 4,5. Incubou-se a 37 °C durante 30 min. Por fim, foram adicionados 100 µl de tampão glicina 0,2M, pH 10,6. A absorvância foi medida por espectrofotometria em leitor de Elisa, em comprimento de onda de 405 nm. A atividade de NAG no implante foi calculada a partir de uma curva padrão de p-nitrofenol avaliada paralelamente. Este é um produto cromógeno da reação entre p-nitrofenil-N-acetil-β-glicosaminida com NAG /mg de peso úmido do implante.

3.2.4 - Análise estatística

Os resultados obtidos das medidas de edema (volume deslocado/ ml) foram expressos como média ± erro padrão da média, e comparados com os grupos controles em cada tempo de observação para isso foi utilizado o teste *t* de Student.

Para os demais modelos utilizados, as diferenças entre os grupos foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA), que verifica a significância das diferenças entre as médias (comparações múltiplas), sendo consideradas significantes quando os valores de *p* foram menores que 0,05. Análises *post hoc*

foram utilizadas quando necessário (Newman-Keuls para comparar as amostras testadas com o controle e Bonferroni, para comparar todos os grupos).

4 – RESULTADOS

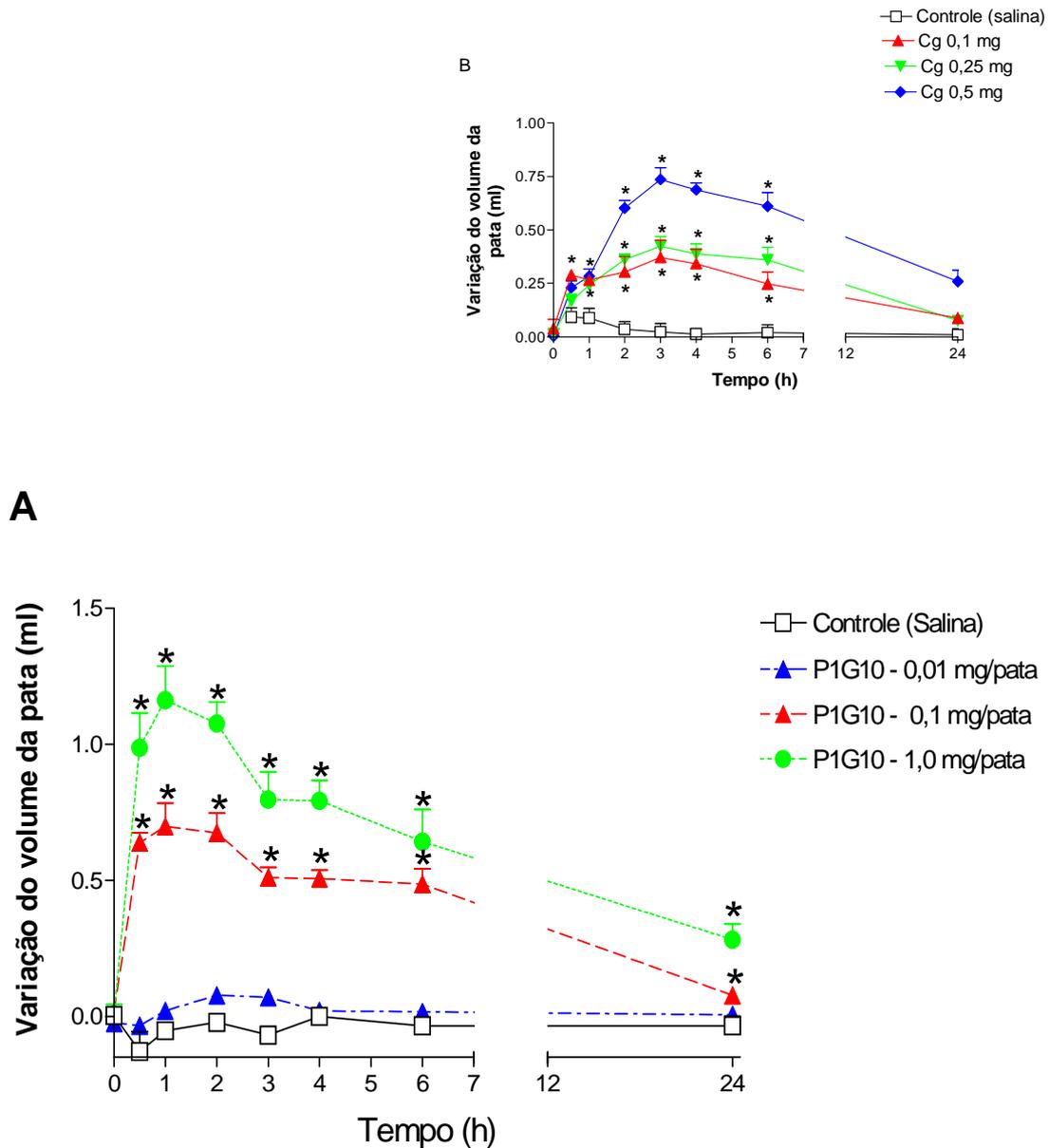
Em vista da capacidade cicatrizante que a fração P1G10 apresenta, tanto em lesões cutâneas como gástrica; se faz necessário entender o modo de ação dessas proteases. Dentre diferentes eventos que ocorrem na cicatrização, podemos destacar o processo inflamatório em que a liberação de mediadores, recrutamento de células e formação de novos vasos sanguíneos a partir de capilares pré-existentes são característicos. A seguir são descritos os resultados referentes ao estudo da ação de P1G10 na produção de edema, migração celular e angiogênese.

4.1–Efeito da administração local de P1G10 sobre a indução de edema (efeito edematogênico)

A capacidade de P1G10 em induzir edema em patas de ratos foi avaliada segundo metodologia descrita no item 3.2.3.1. Como controle positivo na produção de edema, o agente flogogênico carragenina (Cg) (0,1, 0,25 e 0,5 mg / pata) induziu edema de maneira dose-dependente, apresentando pico máximo nas 3^a e 4^a horas (0,26 ± 0,02; 0,24 ± 0,02; 0,28 ± 0,03 e 0,37 ± 0,07, 0,42 ± 0,02, 0,60 ± 0,03 ml, respectivamente), permanecendo o efeito até a 6^a hora (Figura 1B). Após 24 horas da injeção de Cg, se observa o retorno do volume da pata aos níveis basais (0,08 ± 0,02, 0,07 ± 0,01, 0,26 ± 0,05 ml, respectivamente) (dado não mostrado). A dose de 0,25 mg/pata foi escolhida para os estudos de edema subseqüentes por ser a dose frequentemente utilizada em experimentos encontrados na literatura.

Após administração *i.pl.* de P1G10 nas doses de 0,1 e 1 mg / pata (Figura 1A), observou-se efeito edematogênico ($p < 0,05$, Teste *t* de Student), com pico máximo na primeira hora (0,7 ± 0.1 e 1,2 ± 0.1 ml, respectivamente) quando comparada à salina (-0,05 ± 0,03 ml).

No entanto, em doses inferiores ou igual a 10⁻² mg/pata (10⁻²-10⁻⁵ mg/pata) não se observou atividade edematogênica nos diferentes intervalos de tempo avaliados (dados não mostrados).



4.2-Avaliação da participação de diferentes mediadores inflamatórios sobre o edema induzido por P1G10

Uma vez que os perfis edematogênicos de P1G10 e Cg diferiram, tanto em intensidade quanto no tempo necessário para seu desenvolvimento, procuramos caracterizar possíveis mediadores estariam envolvidos na resposta edematogênica após injeção da fração proteolítica em pata de ratos. Para isso utilizamos antagonistas de receptores de serotonina (pizotifeno), histamina (difenidramina), bem como um inibidor inespecífico da enzima ciclooxigenases (indometacina), e avaliamos o edema induzido por P1G10 na presença destes.

O edema causado por P1G10 (0,1 mg) na presença de pizotifeno ($0,21 \pm 0,05$; $0,20 \pm 0,04$; $0,18 \pm 0,01$; $0,10 \pm 0,04$ ml) foi significativamente menor do que o observado no controle ($0,39 \pm 0,06$; $0,30 \pm 0,04$; $0,27 \pm 0,05$; $0,23 \pm 0,04$ ml) para todas as medidas realizadas durante as 4 primeiras horas avaliadas ($p < 0,05$, Teste *t* de Student). Sob efeito de difenidramina e indometacina a redução do edema ocorreu, de maneira significativa, apenas na primeira hora ($0,25 \pm 0,07$ ml e $0,21 \pm 0,12$ ml, respectivamente) em comparação ao volume da pata com injeção de P1G10 ($0,39 \pm 0,06$ ml). ($p < 0,05$, Teste *t* de Student), conforme ilustrado na Figura 2.

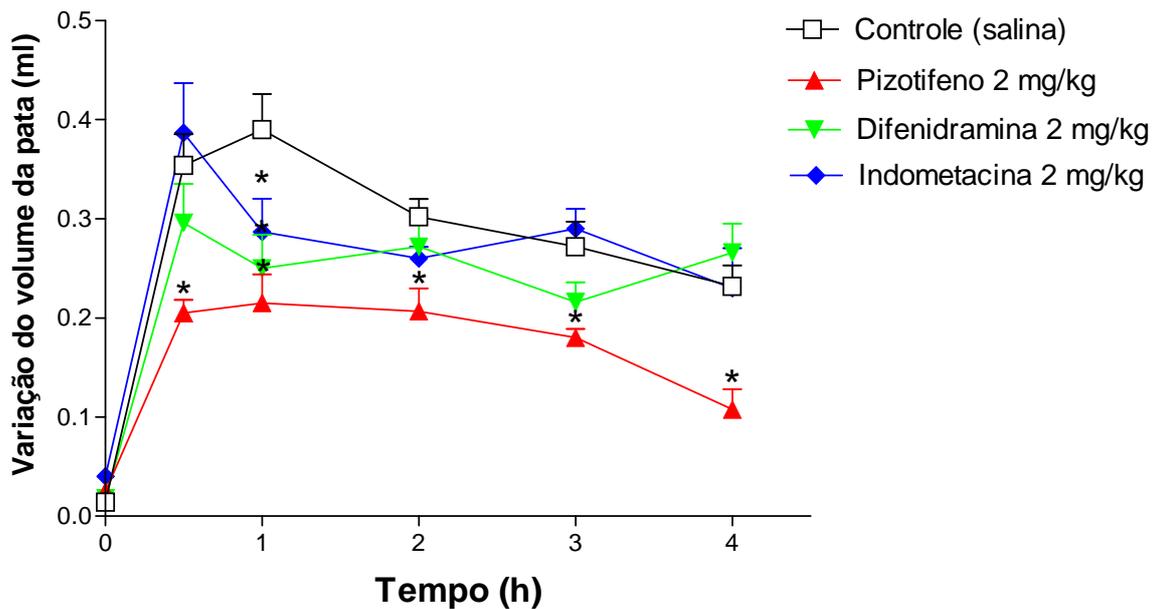


Figura 2: Participação de diferentes mediadores inflamatórios no edema induzido em pata de ratos. Salina fisiológica estéril, pizotifeno 2 mg/kg (antagonista inespecífico de receptores de 5-HT) , difenidramina 2 mg/Kg (antagonista inespecífico de receptores histamínicos) ou indometacina 2 mg/kg (inibidor inespecífico de COX) foram administrados por via s.c., em um volume de 100 μ l /100 g do peso do animal, 1 h antes da injeção *i.pl.* de P1G10 (0,1 mg / 100 μ l - pata direita) e salina fisiológica estéril (pata esquerda). Os animais do grupo controle receberam, pela mesma via, apenas salina fisiológica estéril (100 μ l) na pata posterior direita. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume entre a pata direita e a esquerda, de 5 animais, nos diferentes grupos. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, Teste *t* de Student).

4.3-Efeito da administração sistêmica de P1G10 sobre o edema induzido por Cg (efeito antiedematogênico)

O efeito antiedematogênico de P1G10 em patas de ratos foi avaliado nas doses entre 0,1-20 mg/kg administradas sistemicamente (s.c.), 1 hora antes da injeção *i.pl.* de Cg (0,25 mg/pata).

Na Figura 3 é mostrado o efeito antiedematogênico produzido por P1G10 nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg na terceira ($0,34 \pm 0,03$; $0,36 \pm 0,04$; $0,33 \pm 0,11$ ml, respectivamente, Cg – $0,81 \pm 0,14$ ml, ($p < 0,05$, Teste *t* de Student), e quarta hora ($0,35 \pm 0,11$; $0,38 \pm 0,08$; $0,29 \pm 0,11$ ml, respectivamente, Cg – $0,85 \pm 0,07$ ml, ($p < 0,05$, Teste *t* de Student). Doses inferiores a 5 mg/kg produziram efeitos semelhantes aos obtidos no controle com salina (dados não mostrados). A

indometacina (controle positivo) reduziu significativamente o edema induzido pela Cg a partir de 30 min até a quarta hora ($0,14 \pm 0,03$; $0,06 \pm 0,01$; $0,16 \pm 0,12$; $0,30 \pm 0,10$; $0,24 \pm 0,11$ ml, $p < 0,05$, Teste t de Student).

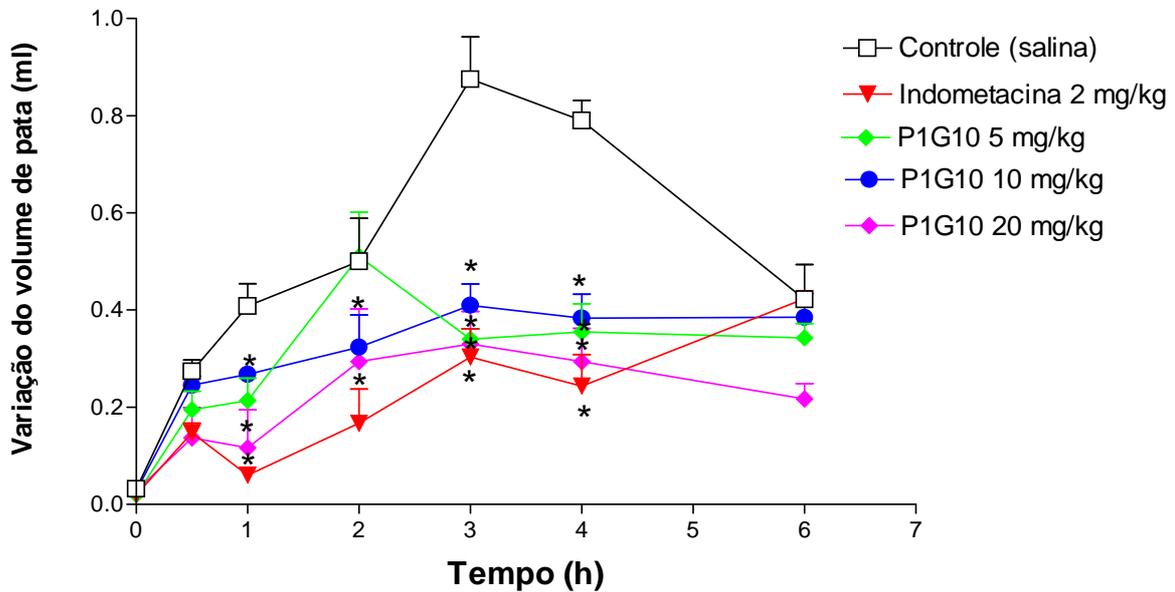


Figura 3: Efeito antiedematogênico de P1G10 sobre o edema induzido por Cg na pata de ratos. A fração foi administrada nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg, por via s.c, 1 h antes da injeção de Cg (0,25 mg/pata). Os animais do grupo controle receberam, pela mesma via, apenas salina fisiológica estéril (100 μ l) na pata posterior direita. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume entre a pata direita e a esquerda, de 5 animais, nos diferentes grupos. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, Teste t de Student).

4.4-Participação da atividade proteolítica de P1G10 na resposta edematogênica

Para verificarmos a importância da atividade proteolítica presente na fração P1G10 na indução do edema, induzido pela mesma, administrou-se P1G10 inibida com IAA (0,1 mg/pata, *i.p*) e, ambas as doses (P1-IAA + P1G10) administradas concomitantemente (0,05 mg de cada solução/pata), sempre no volume de 100 μ l/pata e avaliou-se a produção de edema em diferentes intervalos de tempo, durante o período de 4 h.

Com a administração de P1G10 inibida (0,1 mg/pata), não se observou a formação de edema nas patas injetadas, mostrando um perfil semelhante ao do

controle com salina ($0,04 \pm 0,01$; $0,15 \pm 0,01$; $0,18 \pm 0,02$; $0,13 \pm 0,05$; $0,14 \pm 0,01$; $0,12 \pm 0,03$ ml e $0,01 \pm 0,02$, $0,12 \pm 0,05$, $0,11 \pm 0,01$, $0,06 \pm 0,04$, $0,03 \pm 0,01$, $0,08 \pm 0,02$ ml, respectivamente, $p < 0,05$, Teste t de Student). No entanto, quando ambas as soluções (50 μ l P1G10 + 50 μ l P1G10+P1G10-IAA) foram administradas concomitantemente, observou-se a formação de edema nas patas de ratos em todos os tempos medidos nos mesmos níveis observados pela ação de P1G10 sem inibição (0,1 mg/pata) ($0,01 \pm 0,01$, $0,35 \pm 0,01$, $0,38 \pm 0,02$, $0,35 \pm 0,04$, $0,36 \pm 0,01$, $0,33 \pm 0,04$ ml e $0,06 \pm 0,02$, $0,41 \pm 0,03$, $0,43 \pm 0,02$, $0,36 \pm 0,02$, $0,38 \pm 0,01$, $0,32 \pm 0,07$ ml, $p < 0,05$, Teste t de Student) Figura 4.

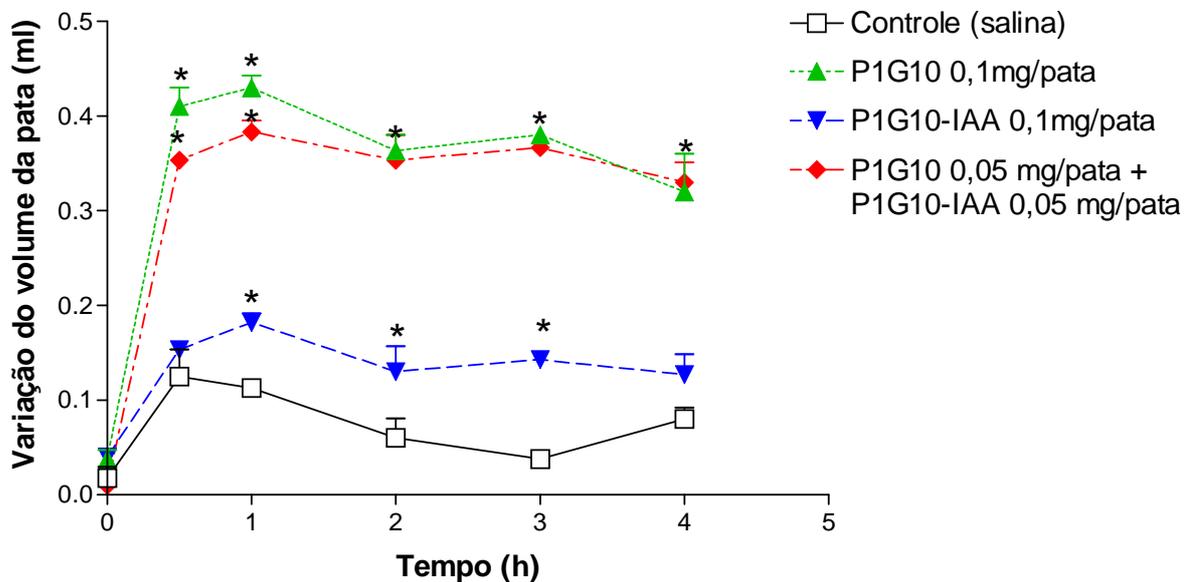


Figura 4: Medida de edema após administração *i.pl.* de P1G10, inibida ou não por IAA. P1G10 inibida ou não por IAA foram administradas *i.pl.* na pata direita do animal na dose de 0,1mg / 100 μ l. Os animais do grupo controle (C) receberam, pela mesma via, apenas salina fisiológica estéril (100 μ l) na pata posterior direita. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume entre a pata direita e a esquerda, de 5 animais, nos diferentes grupos. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, Teste t -Student).

4.5–Efeito da administração intraperitoneal de P1G10 e a importância de sua atividade proteolítica sobre o recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal

A continuidade do estudo do envolvimento de P1G10 no processo inflamatório se deu através de outro modelo *in vivo*, que permite avaliar o recrutamento celular induzido em peritônio de camundongos Swiss. Para isso, inicialmente, utilizamos, por via *i.p.*, doses de 0,05 ou 0,5 mg / 200 µl / cavidade de P1G10 com e sem tratamento pelo inibidor proteolítico IAA e como controle positivo, Cg 0,4 mg /200 µl / cavidade, com o intuito de avaliar a capacidade da fração em recrutar leucócitos (Figura 5).

Como mostra a Figura 6 A, na dose de 0,05 mg/cavidade de P1G10 não se observou diferença estatística no número de leucócitos recrutados ($19,7 \pm 4,4 \times 10^5$ células / ml) quando comparada aos controles negativos salina e DTT-IAA. Além disso, o número de células recrutadas por P1G10 diferiu significativamente do observado com a injeção de Cg ($30,2 \pm 12 \times 10^5$ células / ml, $p < 0,01$ e $0,05$ One way ANOVA, pós teste, Student-Newman-Keuls,). Quando aplicada P1G10 inibida por IAA, houve redução do número de leucócitos totais ($11,9 \pm 1,4$, $p < 0,05$ $p < 0,01$ e $0,05$ One way ANOVA, pós teste, Student-Newman-Keuls, em comparação com controle positivo Cg.

Apenas na maior dose de P1G10, observou-se recrutamento celular com um aumento significativo ($33,2 \pm 5,6 \times 10^5$ células/ml; $p < 0,01$ e $0,05$ One way ANOVA, pós teste, Student-Newman-Keuls, do número de leucócitos totais em relação aos controles negativos salina ($19,1 \pm 7,0 \times 10^5$ células/ml) e DTT-IAA dialisado ($15,3 \pm 3,0 \times 10^5$ células/ml), sendo esse número comparáveis ao recrutamento induzido pela Cg ($30,2 \pm 12 \times 10^5$ células/ml, controle positivo). Na mesma dose, com a inibição da atividade proteolítica, o efeito sobre o recrutamento de leucócitos foi reduzido para níveis equivalentes aos controles negativos ($14,0 \pm 3,0 \times 10^5$ células/ml, $p < 0,01$ e $0,05$ One way ANOVA, pós teste, Student-Newman-Keuls,, em relação a P1G10 e Cg) (Figura 5 B).

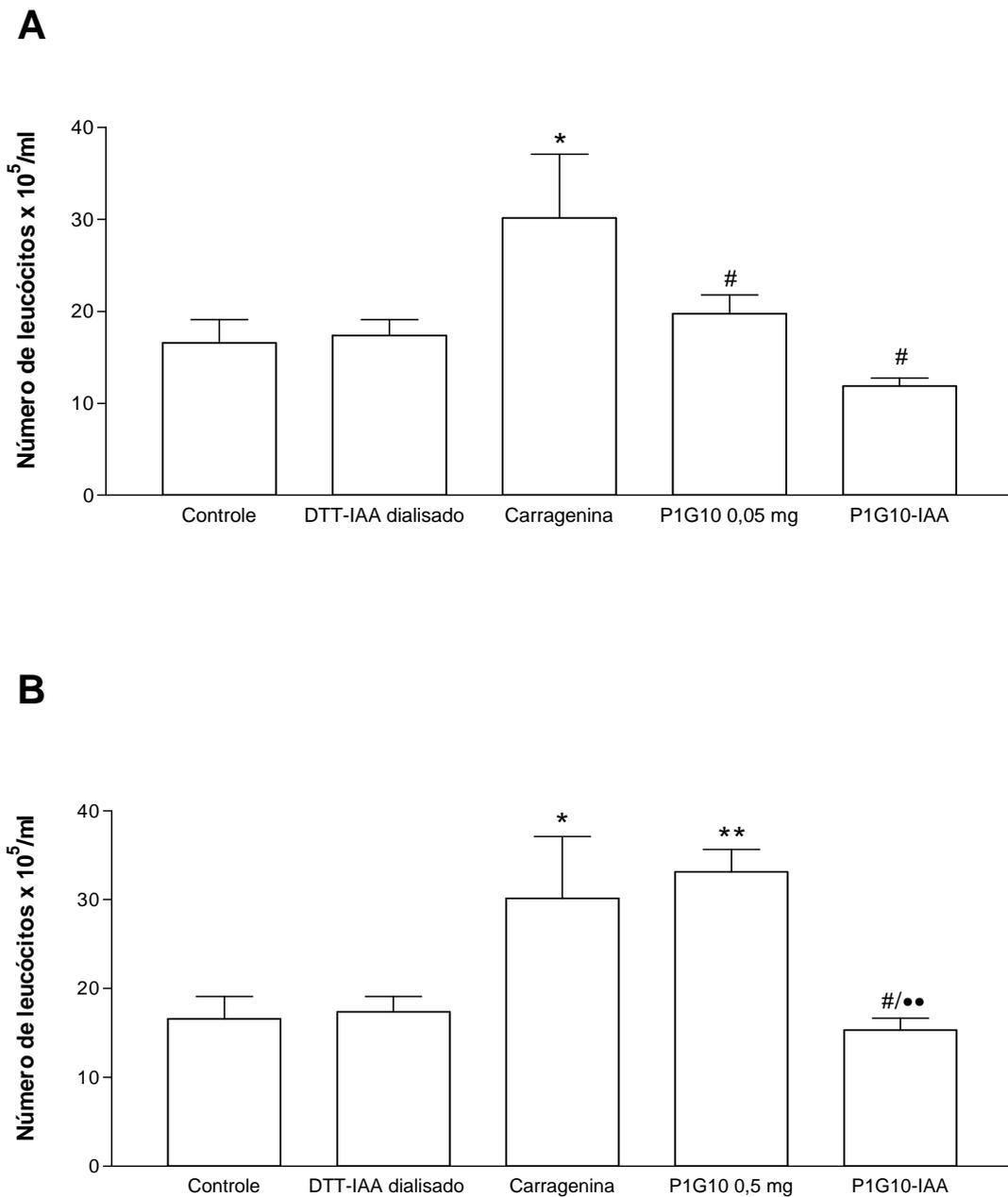


Figura 5: Recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos Swiss após a injeção intraperitoneal de P1G10 inibida ou não por iodoacetamida. P1G10 inibida ou não por IAA 0,05 e 0,5mg/200µl foram injetadas *i.p.*. Para o controle positivo foi utilizado Carragenina (0,4mg/200µl). O número de células presentes no lavado peritoneal após 3 h da injeção intraperitoneal das amostras foi contado em câmara de Neubauer sob microscopia óptica (aumento de 400X) sendo apresentado como a média do total de células ± EPM (One way ANOVA, pós teste, Student Newman Keuls, $p < 0,01$ e $0,05$). * e ** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle, com $p < 0,05$ e $0,01$ respectivamente. # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo carragenina, com $p < 0,05$, •• indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo P1G10, com $p < 0,01$ **A** - P1G10 inibida ou não por IAA na dose de 0,05 mg / 200 µl. **B** - P1G10 inibida ou não na dose de 0,5 mg / 200 µl.

Na contagem diferencial de leucócitos, o número de neutrófilos presentes na cavidade peritoneal de camundongos, após a administração de P1G10 na dose de 0,5 mg/cavidade aumentou ($26,2 \pm 4,5 \times 10^5$ células/ml) em relação aos controles salina ($1,0 \pm 1,2 \times 10^5$ células/ml, $p < 0,01$ e $0,001$ One way ANOVA, pós teste, Student-Newman-Keuls) e Cg ($14,4 \pm 5,9 \times 10^5$ células/ml, $p < 0,01$ e $0,001$ One way ANOVA, pós teste, Student-Newman-Keuls) O número dessas células presentes na cavidade foi menor ($13,4 \pm 2,9$ células/ml, $p < 0,001$ One way ANOVA, pós teste, Student-Newman-Keuls) com a administração de P1G10 inibida com IAA em relação aos controles positivos Cg e P1G10 (Figura 6).

Em relação ao número de monócitos recrutados, não houve diferença estatística em relação às amostras utilizadas (salina- $10,9 \pm 1,1$, P1G10 - $12,1 \pm 2,1$ e Cg - $15,7 \pm 6,2 \times 10^5$ células/ml). Por fim, não houve recrutamento de eosinófilos, em qualquer das situações (dados não mostrados).

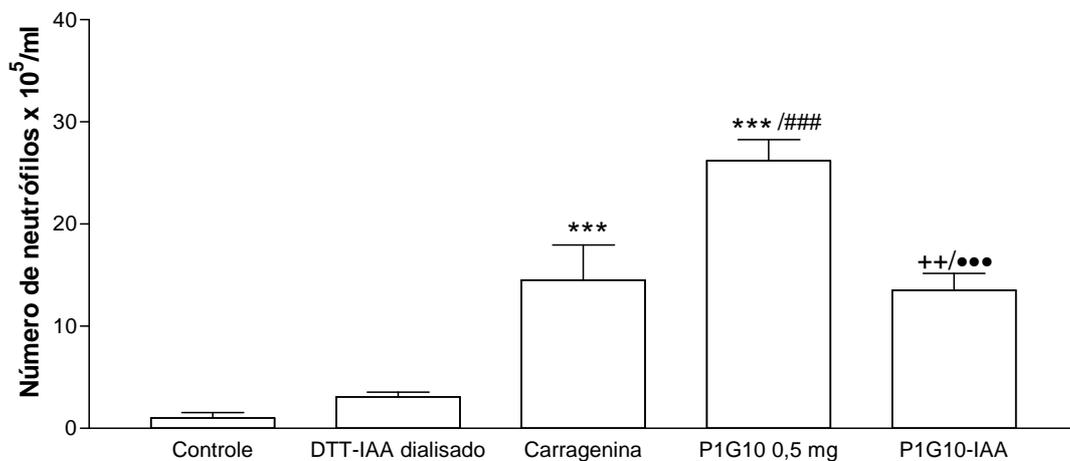


Figura 6: Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos Swiss após a injeção intraperitoneal de P1G10 inibida ou não por IAA. P1G10 inibida ou não por IAA 0,5 mg /200 μ l foram injetadas *i.p.*. A determinação da proporção de neutrófilos presentes na cavidade peritoneal após 3h da injeção *i.p.* das amostras, foi feita através da contagem diferencial de leucócitos em lâminas preparadas no citospin, sob microscopia óptica com imersão (aumento de 1000X), sendo apresentado como a média do total de células \pm EPM de 5 animais. ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle, com $p < 0,01$ e $0,001$, respectivamente; ### indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Carragenina, com $p < 0,001$; ++ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo DTT-dialisado, com $p < 0,01$; ●●● indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo P1G10, com $p < 0,001$ (One way ANOVA, pós-teste Student-Newman Keuls).

4.6-Efeito da administração sistêmica P1G10 sobre o recrutamento peritonial de leucócitos induzido por Cg

Para avaliarmos a possível atividade antiinflamatória de P1G10 no modelo de recrutamento celular no peritônio de camundongos Swiss, administramos P1G10 (1 mg / kg / 200 µl), dexametasona (0,5 mg/kg) e PBS por via s.c. 1 hora antes da injeção de Cg por via *i.p.* (0,3 mg / 200 µl)

Mostramos na Figura 7 A, que o pré-tratamento dos camundongos com a fração proteolítica (1 mg/kg) inibiu de forma significativa o número de leucócitos presentes na cavidade peritonial em resposta à injeção de Cg ($2,2 \pm 0,4$ e $4,8 \pm 0,6 \times 10^5$ células/ml, respectivamente, $p < 0,05$, One way ANOVA, pós teste, Student-Newman-Keuls,). Essa redução no número total de leucócitos também é observada quanto ao número de neutrófilos, como mostrado na Figura 7 B.

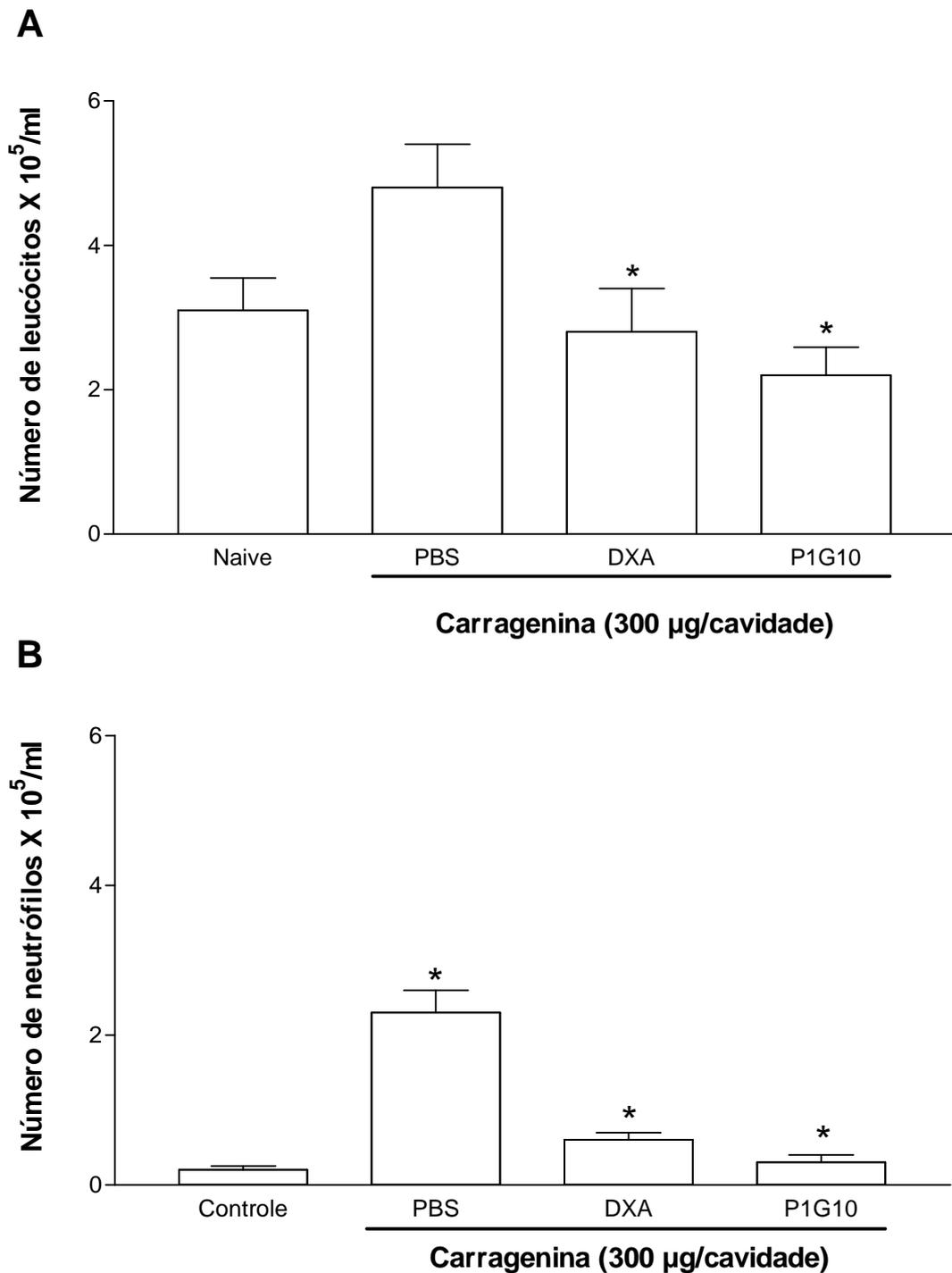


Figura 7: Efeito da administração sistêmica de P1G10 sobre o recrutamento de leucócitos em camundongos Swiss. O desafio foi feito com Cg 0,25mg/cavidade em PBS 1 h depois da administração s.c. de PBS, P1G10 1mg/kg ou dexametasona (DXA) 0,5mg/kg. Após 3h da injeção das amostras, determinou-se o número de total de leucócitos através da contagem em câmara de Neubauer sob microscopia óptica (aumento de 400X), e a proporção de neutrófilos foi feita através da contagem diferencial de leucócitos em lâminas preparadas no citospin, sob microscopia óptica com imersão (aumento de 1000X). Os dados são apresentados como a média \pm EPM (One way ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls, $p < 0,05$). * indica diferença

estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. **A**-Número total de leucócitos. **B**-Número total de neutrófilos.

4.7–Efeito da administração local de P1G10 sobre a angiogênese

A habilidade da fração P1G10 em regular a angiogênese foi avaliada, inicialmente através de sua administração direta no implante de esponjas canuladas no dorso de camundongos Swiss. O índice de atividade angiogênica foi medido através da quantidade de hemoglobina (Hb) contida no implante após o período experimental (10 dias). Mostramos, além do efeito promovido por diferentes doses de P1G10 administradas intraesponja, a dependência da atividade proteolítica na formação de novos vasos (Figura 8).

Assim apenas a dose de 0,05 mg /intraesponja da fração induziu angiogênese quando comparada ao controle – injeção de salina ($1,3 \pm 0,5$ e $0,4 \pm 0,2$ μg Hb/mg de peso úmido, respectivamente, $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $0,05$ One way ANOVA, pós teste, Student-Newman-Keuls).

A inibição da fração P1G10 com IAA (P1G10-IAA) na mesma dose que promoveu angiogênese apresentou um aumento ($1,7 \pm 0,4$ μg Hb/mg de peso úmido) da neovascularização quando comparada ao controle com DTT-IAA dialisado ($0,4 \pm 0,1$ μg Hb/mg de peso úmido, $p < 0,05$) assim como, quando comparada ao controle salina ($0,4 \pm 0,2$ μg Hb/mg de peso úmido, $p < 0,05$, One way ANOVA, pós teste, Student-Newman-Keuls), sem ser diferente do observado com P1G10 sem inibição ($1,3 \pm 0,5$ μg Hb/mg de peso úmido $p < 0,05$, One way ANOVA, pós teste, Student-Newman-Keuls)., demonstrando, dessa forma, que a capacidade de P1G10 em induzir a angiogênese é dependente de sua atividade proteolítica, conforme demonstrado na Figura 8 A e B.

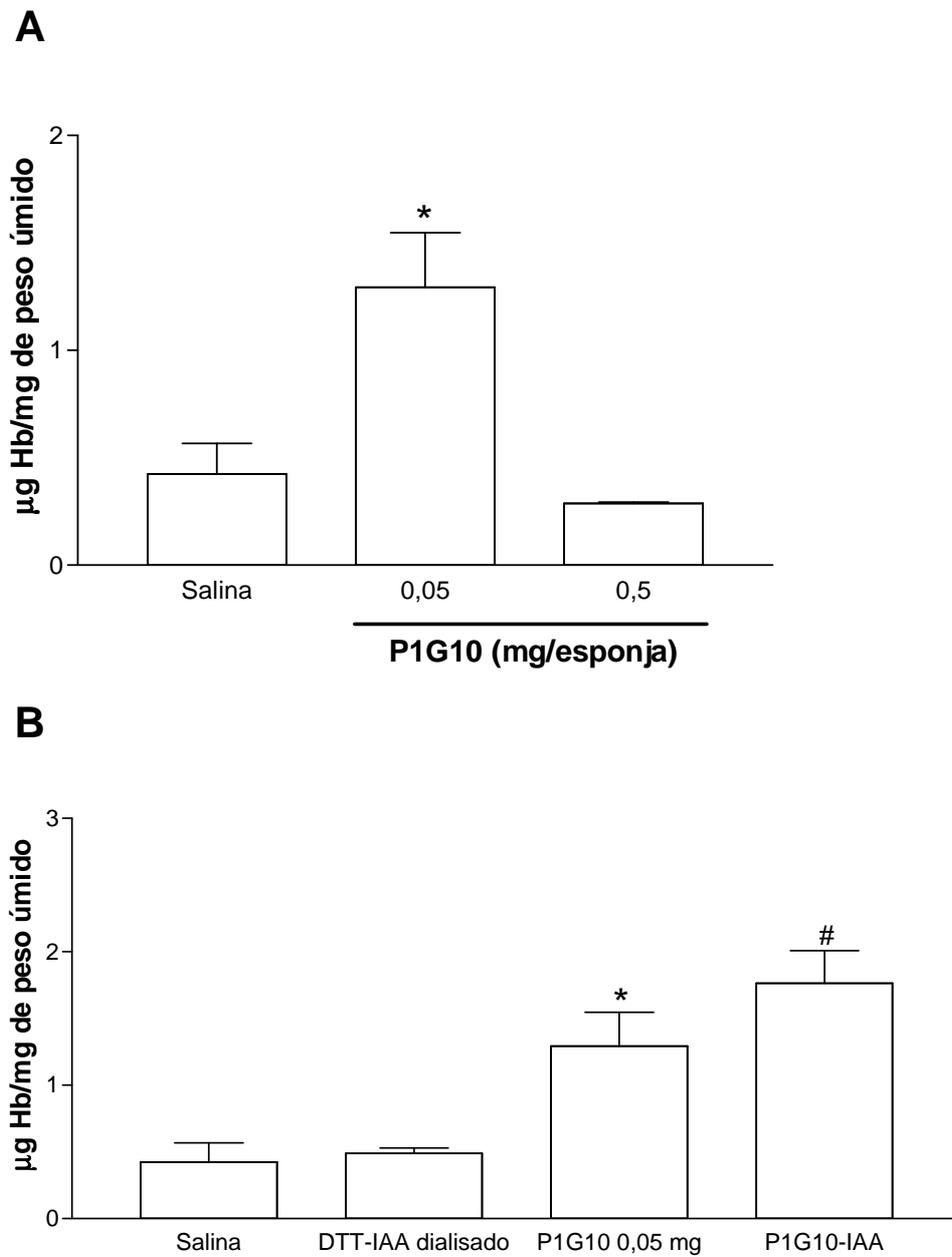


Figura 8: Neovascularização em esponjas implantadas em camundongos tratados com P1G10 inibida ou não com IAA: As esponjas de polietileno canuladas foram implantadas no dorso de camundongos Swiss. As amostras foram administradas durante 8 dias. A quantificação de hemoglobina (Hb) presente nas esponjas foi realizada por espectrofotometria no tecido fibrovascular. A – P1G10 nas doses de 0,05 e 0,5 mg/intraesponja. B – P1G10 inibida ou não com IAA, na dose de 0,05 mg/intraesponja. * # indicam resultados estatisticamente diferentes em relação aos respectivos controles (One way ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls, $p < 0,05$).

4.7.1–Efeito da administração local de P1G10 sobre o infiltrado inflamatório presente na esponja implantada

A avaliação do infiltrado inflamatório foi realizada através da estimativa da atividade leucocitária, mais especificamente de neutrófilos e macrófagos, no implante. O acúmulo de neutrófilos e macrófagos na esponja foi avaliado indiretamente pela medida das atividades da mieloperoxidase (MPO) e da *N*-acetil- β -*D*-glicosaminidase (NAG), respectivamente.

Na Figura 9 A mostramos que a administração de ambas as doses de P1G10 não foi capaz de alterar ($0,16 \pm 0,07 - 0,05$ mg; $0,16 \pm 0,02$ ml – $0,5$ MPO/mg de peso úmido) os níveis de atividade de MPO observados sob o tratamento com salina ($0,13 \pm 0,02$ MPO/mg de peso úmido).

De acordo com a Figura 9 B, a atividade da enzima NAG, foi significativamente maior na dose de $0,05$ mg de P1G10, em relação ao controle salina ($1,9 \pm 0,8$ e $0,5 \pm 0,3$ μ g /mg de peso úmido, respectivamente, $p < 0,01$, One way ANOVA, pós teste, Student-Newman-Keuls). Na dose de $0,5$ mg, embora se note um aumento dessa atividade ($1,24 \pm 0,16$ NAG/mg de peso úmido), este não se mostrou significativo.

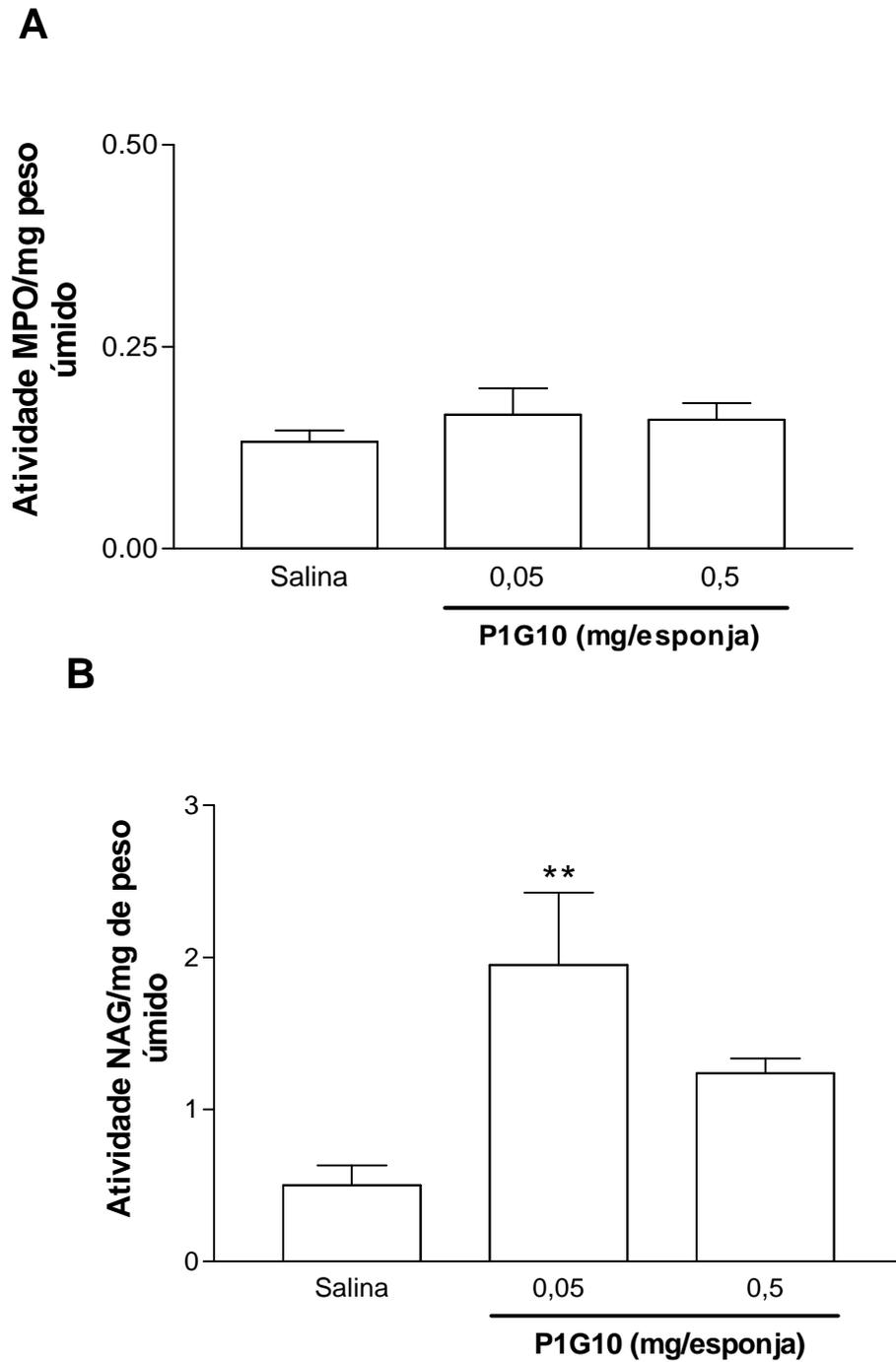


Figura 9: Atividade de Mieloperoxidase e N-Acetil-Glicosaminidase em implantes de esponja de camundongos Swiss tratados com P1G10. Neutrófilos e macrófagos acumulados no implante foram medidos indiretamente através da atividade de Mieloperoxidase (MPO) (A) e N-Acetil-Glicosaminidase (NAG) (B). As soluções de P1G10 foram administradas nas doses de 0,05 e 0,5 mg intraesponja, durante 8 dias. Os resultados foram expressos como média \pm EPM de 5 animais em cada grupo. ** indica resultado diferente estatisticamente do grupo controle, $p < 0,01$ (One way ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls).

4.8–Efeito da administração sistêmica de P1G10 sobre a angiogênese

Os efeitos de P1G10 sobre a angiogênese foram avaliados, após a administração sistêmica (s. c.) nas doses de 0,5 ou 5 mg/kg/dia durante 8 dias, sobre o modelo de implantes de esponja em camundongos Swiss. Desta forma, a administração sistêmica de P1G10 não alterou a formação de novos vasos nas doses avaliadas, uma vez que os níveis de Hb contidos nos implantes de esponja não apresentaram diferença significativa quando comparados aos do controle - salina ($2,27 \pm 0,23$ – 0,5 mg/kg, $2,7 \pm 0,71$ – 5 mg/kg e $1,92 \pm 0,31$ Hb/mg de peso úmido – salina, One way ANOVA, pós teste, Student-Newman-Keuls) (Figura 10).

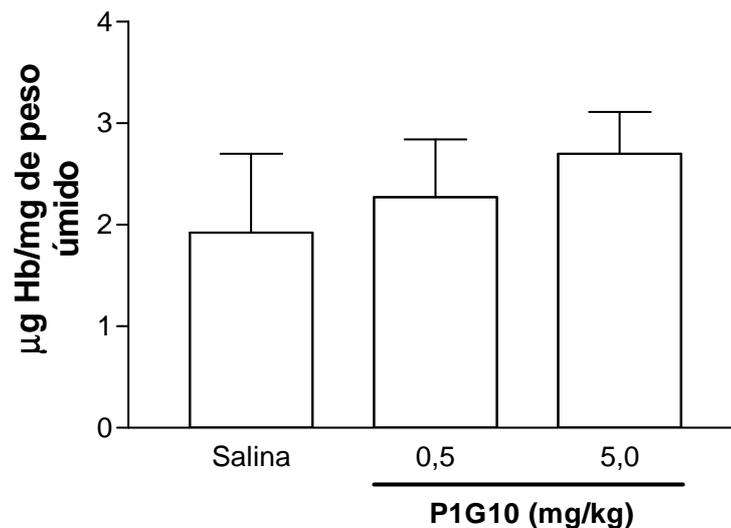


Figura 10: Dosagem de hemoglobina avaliada em implantes de esponja após administração sistêmica de P1G10: Camundongos Swiss com esponjas implantadas dorsalmente foram tratados com P1G10 0,5 e 5 mg / kg, durante 8 dias por via s.c.. A quantificação de hemoglobina (Hb) presente nas esponjas foi determinada por espectrofotometria ao final do período experimental. Os resultados foram expressos como média \pm EPM de 5 animais em cada grupo (One way ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls).

4 - DISCUSSÃO

A atividade cicatrizante tópica da fração P1G10 vem sendo demonstrada utilizando-se camundongos *hairless*, bem como camundongos *Swiss* depilados e submetidos à dermoabrasões (MELLO *et al.*, 2006; LEMOS *et al.*, 2006) e queimaduras (dados não publicados). Nesses estudos, as lesões tratadas com esta fração proteolítica apresentaram uma maior taxa de cicatrização em relação aos controles.

Atribuímos o mecanismo de cicatrização ocorrido nos trabalhos citados anteriormente, às enzimas do grupo das cisteíno proteases encontradas no látex de *Carica candamarcensis* dotadas de atividade proteolítica superior às encontradas em *C. papaya* (BAEZA *et al.*, 1990; BRAVO *et al.*, 1994). Sabe-se que algumas cisteíno proteases contidas em P1G10 apresentam atividade mitogênica (GOMES *et al.*, 2005) sendo essa uma característica favorável na cicatrização quando pensamos no remodelamento do tecido lesionado, considerando a possibilidade de que as mesmas mimetizem proteinases endógenas sintetizadas para que ocorra o remodelamento fisiológico do tecido presente na área da injúria (VAN WINKLES, 1967). Dessa maneira, podemos sugerir que a atividade cicatrizante observada se dê pela somatória ou sinergismo dessas características, não descartando a possibilidade de outras ações, como por exemplo, o papel de cisteíno proteases na inflamação, já que esta constitui uma das fases da cicatrização.

O uso de modelos experimentais que caracterizem os diferentes aspectos inflamatórios são ferramentas úteis para o estudo e a compreensão das diferentes etapas envolvidas no processo de reparo tecidual. Iniciamos nossos estudos utilizando um modelo experimental que reproduz, ao menos parcialmente, as alterações na permeabilidade vascular, e conseqüente exsudação de líquidos e de proteínas plasmáticas que contribuem para a formação de edema, etapa da fase aguda da inflamação. Esse modelo constitui um instrumento útil para a avaliação edematogênica/antiedematogênica de novos fármacos, ou de substâncias diversas. Desta forma, avaliamos os efeitos da P1G10 como indutor de edema inflamatório pela sua administração intraplantar, bem como, seu efeito, via subcutânea, sobre edema induzido por carragenina (Cg).

No estudo do envolvimento de P1G10 no processo inflamatório agudo, pudemos observar um aumento significativo no volume da pata com pico máximo na

primeira hora em doses maiores que 10^{-2} mg/pata. P1G10 foi capaz de promover um efeito edematogênico 7 vezes superior ao obtido com a administração de Cg em doses semelhantes (0,1 mg/pata) na primeira hora. Na terceira hora de medida, a fração proteolítica ainda apresentava uma potência superior à injeção do agente flogogênico (2 vezes). O edema produzido pelo látex de *Calotropis procera* (SHILVKAR & KUMAR, 2003) quando injetado na pata de ratos também produziu uma intensa resposta inflamatória dose-dependente, com efeito máximo na primeira hora, assim como descrito com a P1G10.

Com o objetivo de avaliarmos os mediadores inflamatórios envolvidos no edema de pata induzido por P1G10, pré-tratamos os animais com pizotifeno (um inibidor inespecífico de serotonina), difenidramina (antagonista da histamina, seletivo para receptores H_1) e indometacina (inibidor da enzima ciclooxigenase da via do ácido araquidônico), 1 hora antes da injeção *i.pl.* de P1G10. Os resultados demonstram que o edema induzido pela fração na primeira hora avaliada é dependente da ação de histamina e serotonina, bem como da produção de prostaglandinas. Resultados semelhantes foram obtidos com o látex de *Calotropis procera* que apresentou atividade edematogênica dependente da liberação dos mesmos mediadores. GUIMARÃES *et al* (2004), em estudo semelhante, investigou a capacidade do veneno de *Bothrops lanceolatus* rico em proteases, em induzir edema de pata em ratos Wistar, por sua injeção *i.pl.*. A produção de edema dose e tempo dependente, bem como, os mediadores inflamatórios envolvidos nesta resposta, foram semelhantes aos resultados obtidos com P1G10, embora o edema tenha sido evidenciado nos primeiros quinze minutos. Outros autores evidenciam a participação de produtos derivados do ácido araquidônico pelas vias de ciclo e lipoxigenases, do mesmo veneno na produção de edema e aumento da permeabilidade vascular (LÔBO DE ARAÚJO *et al.*, 2000).

Demonstrada a participação de alguns mediadores inflamatórios no modelo de edema induzido por P1G10, procuramos avaliar a importância da atividade proteolítica desta fração sobre este efeito. Assim, observamos que a fração P1G10 inibida por IAA apresentou atividade edematogênica diminuída quando administrada na pata de ratos, indicando que esse efeito é dependente de sua atividade proteolítica. Os mecanismos envolvidos nessa resposta ainda não foram estudados, porém acreditamos que as proteases contidas em P1G10 possam induzir a liberação de mediadores como a histamina, serotonina e prostaglandinas pelos neutrófilos

infiltrados e pelos mastócitos, em resposta à lesão tecidual promovida pela atividade proteolítica.

Com o objetivo de avaliarmos o efeito antiedematogênico da P1G10, esta fração foi administrada por via subcutânea 1 hora antes da injeção *i.pl.* de Cg. Nossos resultados demonstram que o pré-tratamento dos animais com esta fração reduziu o edema na pata induzido pela Cg na terceira e quarta hora, tempo em que são liberados prostaglandinas por este agente flogogênico (VINEGAR, 1998). A inibição da produção de prostanóides, como sugerido pelo resultado, pode também, ser justificado pela semelhança entre as curvas de inibição produzidas pela fração e pela indometacina, clássico inibidor inespecífico das ciclooxigenases (VINEGAR, 1998).

Na seqüência, nos propusemos verificar se a atividade proteolítica da fração estaria envolvida no efeito antiedematogênico. A administração sistêmica de P1G10 inibida com IAA não alterou essa atividade, portanto P1G10 inibe o edema inflamatório induzido por Cg de forma independente da ação proteolítica contida na fração.

Ainda não há estudos sobre a inibição enzimática das cisteíno proteases presentes na bromelina. A atividade antiedematogênica de promovida pela administração sistêmica de bromelina pode ser independente da sua atividade proteolítica. Essa enzima, pertencente à classe das cisteíno proteases, é obtida do extrato aquoso do talo e do fruto da espécie *Ananas comosus*, conhecida popularmente como abacaxizeiro, que contém uma grande diversidade e quantidade de enzimas proteolíticas, principalmente cisteíno proteases, com demonstrados efeitos antiinflamatórios potencialmente benéficos (COOREMAN W.M. *et al.*, 1976, MAURER HR., 2001). Também podem ser encontradas peroxidases, fosfatase ácida, vários inibidores de protease e compostos orgânicos ligantes de cálcio. O principal mecanismo de ação da bromelina parece ser sua natureza proteolítica, porém evidências sugerem uma atividade dependente de ações hormonais e imunomodulatórias via sinalização intracelular (JÚNIOR, E. R. S *et al.*, 2005). Diversos estudos experimentais e clínicos revelaram que a bromelina possui atividade antiinflamatória, antiedematogênica, antitrombótica, fibrinolítica, antiulcerogênica e cicatrizante. Essas atividades estão relacionadas com a diminuição dos níveis de bradicinina nos locais de inflamação, diminuição da liberação de derivados do ácido araquidônico, diminuição da formação de fibrina e

aumento da fibrinólise. No entanto, os princípios ativos, responsáveis pelas ações da bromelina, ainda não estão totalmente caracterizados (<http://www.pronatu.com.br>). Dessa forma, a atividade antiedematogênica da bromelina no modelo de edema de pata está descrita como sendo mediada pela diminuição dos níveis de bradicinina, resultando em diminuição da permeabilidade celular e por consequência, diminuição do edema (KUMAKURA S *et al.*, 1988) também pelos níveis de prostaglandinas (principalmente de PGE₂ e tromboxano A₂) e por fim, por uma modulação de moléculas de adesão na superfície celular (HALE L.P, 2004).

O recrutamento de leucócitos do sangue para o espaço intersticial é um mecanismo chave do processo inflamatório e tem sido descrito na patogênese de várias doenças. É um processo multifásico e coordenado, envolvendo várias etapas: rolamento, adesão e transmigração (SPRINGER, 1995). Este fenômeno exhibe o predomínio de diferentes tipos celulares dependendo do estímulo flogístico. As principais células descritas nesse processo são os macrófagos residentes nos tecidos (DEFIFE *et al.*, 1999), assumindo papel fundamental nos mecanismos de defesa do organismo. (WITTE *et al.*, 1997) e os neutrófilos, constituindo as células predominantes do exsudato inflamatório nas primeiras 24 horas após o início do processo (LAWRENCE *et al.*, 1994).

Com o objetivo de avaliarmos os efeitos da P1G10 sobre a migração de leucócitos, a fração (inibida ou não por IAA) foi administrada como desafio no peritônio ou sistemicamente, tendo como estímulo inflamatório a Cg. Desta forma, a administração intraperitoneal de P1G10 na dose de 50 µg pode ser considerada inerte, pois não induziu recrutamento de leucócitos, em comparação com a injeção de salina, enquanto que a dose de 500 µg induziu um recrutamento de leucócitos, que consistiu predominantemente de neutrófilos. A presença dessas células nos sítios inflamatórios é importante no controle da inflamação e se faz via degranulação monócitos, macrófagos, linfócitos T, linfócitos B, eosinófilos, células dendríticas, células NK, tímócitos, plaquetas, células musculares cardíacas e endotélio, cuja presença e ativação em um local lesionado originam uma resposta inflamatória local (MENTEN *et al.* 2002; MAURER & VON STEBUT, 2004).

Uma possibilidade para a explicação desse efeito seria a produção/liberação de mediadores inflamatórios, assim como descrito por PETRICEVICH *et al* (2000) em estudos com venenos de botróficas, ricos em proteases, em particular TNF α e IL-1, bem como de NO os quais poderiam agir como importantes indutores de

alterações sistêmicas inflamatórias. Por outro lado, HALE *et al* (2002) verificaram que a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida por bromelina, nas mesmas condições experimentais, se mostrou dose-dependente, sendo que este efeito se deveu a uma regulação na expressão de moléculas de adesão celular na superfície de leucócitos e monócitos.

O pré-tratamento dos animais com P1G10 1 hora antes da administração *i.p.* de Cg, inibe o recrutamento de neutrófilos. Efeito de inibição do recrutamento celular de bromelina, também, foi confirmado no modelo de pleuresia induzida por Cg (MAJIMA, M *et al.*, 1997). FITZHUGH *et al.* (2008) mostraram que na presença de bromelina houve redução significativa da migração de leucócitos induzida pela IL-8 para a cavidade peritoneal em estudos *in vitro* e *in vivo*. Esses autores descrevem ainda, que a bromelina poderia favorecer a remoção de receptores da quimiocina CD18 como um mecanismo potencial para esse efeito. Além disso, a expressão CD18 tem participação fundamental no rolamento (JUNG & LEY, 1999).

A inflamação é classificada em aguda e crônica de acordo com os eventos morfológicos observados. As principais características da inflamação aguda são a exsudação de fluido e proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos, predominantemente neutrófilos. Em nossos estudos utilizando modelos experimentais *in vivo* de inflamação aguda, concluímos que a dose de P1G10 que promove cicatrização cutânea quando administrada localmente apresentou atividade inflamatória aguda, condição importante para o reparo do tecido. Por outro lado, P1G10 mostrou atividade antiinflamatória quando administrada sistemicamente nos modelos de edema e recrutamento celular. P1G10, quando administrada na pata provoca O edema induzido na pata de ratos pela injeção *i.pl.* de P1G10 ocorreu devido à liberação de mediadores inflamatórios como serotonina, PGs e histamina. No modelo de migração celular utilizado, se sugere um efeito proteolítico dependente, após administração local.

Em processos de cicatrização de feridas após a realização de implantes de materiais biomédicos, percebe-se a presença da neovascularização, passo importante do processo inflamatório (WITTE & BARBUL, 1997). Objetivando avaliar o efeito de proteases contidas em P1G10 sobre a inflamação crônica, foi utilizado um modelo *in vivo* de angiogênese inflamatória, que tem como base o implante subcutâneo de esponja de poliuretano no dorso de camundongos. O procedimento é

simples, de fácil reprodução e bem tolerado pelo animal e, pode ser usado para estudar a angiogênese inflamatória e tumoral, além de também ser usado no estudo de técnicas de transferências de gene para estimular terapias angiogênicas (WANG *et al.*, 2000, HASAN *et al.*, 2004). A implantação de discos de esponja subcutâneo do animal simula uma reação inflamatória gerada por um corpo estranho no organismo. A dosagem do conteúdo de hemoglobina (Hb) intra-implante quantifica indiretamente, o número de vasos sanguíneos presentes no tecido (PASSANITI *et al.*, 1992).

Conforme metodologia descrita previamente, P1G10 nas doses de 0,05 e 0,5 mg / intra-implante foram administrados durante 8 dias consecutivos. Como resultado, encontramos intensa vascularização apenas na dose de 0,05 mg / intra-implante) em relação ao controle. Para verificar se esse efeito era dependente da atividade proteolítica da fração, P1G10 inibida por IAA foi administrada, resultando em um efeito semelhante ao da fração não inibida, sugerindo, assim, um mecanismo angiogênico independente da ação proteolítica. Sistemicamente, no entanto, P1G10 não apresentou atividade angiogênica em qualquer das doses investigadas.

A migração de células inflamatórias no interior do implante após a administração local de P1G10 foi avaliada através da atividade enzimática de N-acetilglicosaminidase (NAG) e de mieloperoxidase (MPO) (Bailey 1988; Cross, *et al.*, 2003; Barcelos *et al.*, 2005), enzimas liberadas por macrófagos e neutrófilos, respectivamente, servindo assim, como indicadores de suas presenças nos tecidos.

Os macrófagos, células provenientes dos monócitos circulantes, residem nos tecidos, onde se encontram diferenciados segundo as características de cada tecido (DEFIFE *et al.*, 1999), assumindo papel fundamental nos mecanismos de defesa do organismo. Os macrófagos deixam os vasos 18 a 24 h depois de iniciada a exsudação, acumulando-se rapidamente, passando a serem as células predominantes no tecido depois de 48 h (WITTE *et al.*, 1997). Sua presença em grande quantidade em tecidos inflamados pode indicar o início da fase crônica do processo. Os valores da atividade de NAG no implante contendo a fração proteolítica mostraram que na dose angiogênica (0,05 mg / implante) houve um recrutamento de macrófagos estatisticamente diferentes do controle e da maior dose testada.

Em relação à presença de neutrófilos, o tratamento com P1G10 na dose angiogênica não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle. Os

neutrófilos, por sua vez, são células características da inflamação aguda em resposta a estímulos não imunogênicos, sendo as primeiras a deixarem os vasos sanguíneos (LAWRENCE *et al.*, 1994), constituindo as células predominantes do exsudato inflamatório nas primeiras 24 horas após o início do processo. Nossos resultados são claros em demonstrar a ausência de neutrófilos, em oposição ao infiltrado de macrófagos, indicativo de inflamação crônica, corroborando assim, com os resultados obtidos quanto à neovascularização.

As dosagens de MPO e NAG não nos permitem afirmar se houve uma inibição da migração e/ou proliferação das células inflamatórias; ou se ocorreu uma migração e proliferação normal, porém com uma atividade celular diminuída. Entretanto, podemos especular com base em estudos mais específicos realizados previamente por outros autores (SHU *et al.*, 2000; KAWAZAKI & AKAZAUA, 2000), que possa estar ocorrendo um ou mais desses efeitos, concomitantemente. Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que a fração P1G10 obtida da *Carica candamarcensis*, possa regular em parte este processo, embora os mecanismos envolvidos nesta regulação ainda não estejam completamente esclarecidos; para tal, mais estudos serão necessários.

Estudos realizados por POZZI *et al* (2000), descrevem que metaloproteases e serino proteases estariam envolvidas na angiogênese, entretanto, poderiam estar atuando de formas opostas nesse processo. As metaloproteases são capazes de gerar moléculas com atividade antiangiogênica (endostatina e angiostatina). Por outro lado, um trabalho realizado por BERGERS *et al* (2000) sugeriu o envolvimento da metaloprotease MMP-9 na liberação de VEGF. Desse modo, essas enzimas poderiam tanto estimular como inibir a formação de novos vasos sanguíneos.

SHI *et al* (2003) sugerem que outras vias proteolíticas, também, possam desempenhar um papel na neovascularização. Em relação a este aspecto, o papel das cisteíno proteases permanece incerto. As cisteíno proteases presentes em mamíferos podem ser divididas em caspases e catepsinas, sendo estas últimas encontradas predominantemente dentro de lisossomos no interior das células (TURK *et al.*, 2003). Algumas das catepsinas são expressas em quase todas as células (catepsinas B, C, F, H, L, O e X) e outras, em células específicas (catepsina S, células apresentadoras de antígenos; catepsina K, osteoclastos e células do epitélio bronquial; Catepsina V, células do epitélio tímico e catepsina W expressa em linfócitos T citotóxicos) (GUNCAR *et al.*, 2000). À catepsina S têm sido atribuídas

várias funções que a torna uma boa candidata a participar da degradação da matriz durante a angiogênese. A primeira, por degradar a elastina extracelular, cujos produtos resultantes foram descritos como promotores da angiogênese (NAKMAN, GB., 1997). Outra função nesse processo seria pelo aumento da expressão e secreção de catepsina S, pelas células endoteliais, quando estimulada por citocinas inflamatórias e fatores angiogênicos. Além disso, a inibição da atividade dessa catepsina reduziu a formação de novos vasos sanguíneos (SHI *et al.*, 2003).

Existem várias etapas na indução de neovascularização nas quais a fração administrada localmente poderia estar atuando, como na vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, devido à demonstrada capacidade edematogênica, possivelmente promovendo degradação de estruturas matriciais, por sua atividade proteolítica ou ainda, promovendo a migração e proliferação das células inflamatórias. Porém acreditamos que as doses sistêmicas utilizadas foram insuficientes para aumentar a produção de fatores angiogênicos e/ou estimular alguma etapa da cascata angiogênica.

5 - CONCLUSÃO

- Uma vez que ficou aqui demonstrada a ação de P1G10 sobre eventos do processo inflamatório importantes na reparação tecidual, sugerimos que esses efeitos aliados às atividades debridante e mitogênica da fração contribuem para a cicatrização cutânea.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abba AA, Afzal M, Al-Moharab FI, Baez-Giangreco A. Kikuchi disease: A clinicopathological analysis of 13 cases from Riyadh Central Hospital Ann Saudi Med. May;15 (3):288-90, 1995.

Ames BN. Carcinogens are mutagens: their detection and classification. Environ Health Perspect. Dec; 6:115-8, 1973.

Andrade, S.P., Machado, R.D.P., Teixeira, A.S., Belo, A.v., Tarso, A.M & Beraldo, W.T. Sponge-induced angiogenesis in mice and pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. Microvasc. Res., 54, 253-261, 1997.

Andrade MNB, Seward R, Melo JRC. Curativos. Rev Méd Minas Gerais; v 4, p: 228-36, 1992.

Azarkan, M., Wintjens, R., Looze, Y. and Volant, D.B. (2004). Detection of three wound-induced proteins in papaya latex. Phitochem., v. 65(5): 525-534; 2004.

Ayello, E.A. and Cuddigan, J.E. (2004). Debridement: controlling the necrotic/cellular burden. Adv. Skin Wound Care., 17(2): 66-75.

Baeza, G., Corea, D. and Salas, C.E. (1990). Proteolytic enzymes in *Carica candarmacensis*. J. Sci. Food Agric., 51: 1-9; 1990.

Bailey, P.J. Sponge implants as models. Method Immunol., 162, 327-334, 1988.

Barcelos, L.S., Talvani, A., Teixeira, A.S., Vieira, L.Q., Cassali, G.D., Andrade, S.P. & Teixeira, M.M. (2005). Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. Journal of Leukocyte Biology, 78, 352-358.

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2, p. 737-744, 2000.

Beuth, J., Ost, B., Pakdaman, A., Rethfeldt, E., Bock, P.R., Hanisch, J. and Schneider B. Impact of complementary oral enzyme application on the postoperative treatment results of breast cancer patients- results of an epidemiological multicentre retrolective cohort study. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 47: 45-54, 2001.

Borges, E. L.; Chianca, T. C. M. Tratamento e cicatrização de feridas – Parte 1. *Nursing, São Paulo*, n. 21, p. 24-29, 2000.

Bravo, C. E. S.; Gomes MTR; Lopes, Miriam Teresa Paz ; Silva, C. A. ; Mello, Vanessa Joia de ; Ferreira, R. S. ; Rodrigues, K. C. L. . A mitogenic protein fraction in latex from *Carica candamarcensis* Planta Medica, Alemanha, v. 69, p. 926-932, 2003.

Bravo, L.M., Hermosilla, J. and Salas, C.E. (1994). A biochemical comparison between latex from *Carica candamarcensis* and *C. Papaya*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 27: 2831-2842;

Castro, I.R. (1981). Studies on papain production. *Natural Sci. Depart. Bureau Tech. J.*, 233: 81-88.

Chen, C.F., Chen, S.M., Chow, S.Y and Han, P.W. Protective effects of *Carica papaya* Linn on the exogenous gastric ulcer in rats. *Am. J Chin Med.*; v 9, p: 205-212, 1981.

Chen, J. D, Kim, J. P. Zhang, K. Sarret, Y. and Woodley, D. T. Epidermal growth factor (EGF) promotes human Keratinocyte locomotion on collagen by increase the $\alpha 2$ integrinas subunit. *Ex. Cell Res*, v 209, p:216-223, 1993.

Cross, A. S.; Sakarya, S.; Rifat, S.; Held, T. K.; Drysdale, b. E.; Grange, P. A.; Cassels, F. J.; Wang, L. X.; Stamatou, N.; Farese, A.; Casey, D.; Powell, J.; Bhattacharjee, A. K.; Kleinberg, M. & Goldblum, S. E. Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. *J. Biolog. Chem.*, 278(6), 4112- 4120, 2003.

Carvalho Junior, A. D. ; Abrantes, F. M. ; Menezes, M. A. ; Leal, A. S. ; Cardoso, V. N. ; Oliveira, M.C. . Use of labeled cisplatin obtained by direct irradiation in a preliminary biodistribution study. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, n. special, p. 95-98, 2005.

Cooreman, W.M., S. Scharpe, J. Demeester and A. Lauwers, 1976. Bromelain, biochemical and pharmacological properties. *Pharm. Acta Helv.*, 4: 73-7

Dery, O. Corvera, C.U. Steinhoff M. and Bunnett N. W. *Am. J. Physiol.* V 274 p: 1429-1452, 1998.

Dinarello CA, Wolf SM. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 1993; 328: 106-113.

Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonist. *Blood* 1991; 77: 1627-1652.

Doughty, D.B. Principles of wound healing and wound management. In: Bryant R. A. acute and chronic wound; nursing management. St. Louis: Mosby Year book, 1992.cap.2, p 31-68.

Drabkin, D. L. and Austin, J. H. Spectrophometric constants for common hemoglobin derivates in human, dog and rabbit blood. *J. Biol. Chem*, v 98, p: 719-733, 1932.

Eaglstein, W. H. et al. New directions in wound healing; wound care manual. 5. ed Princeton: Convatec, 1990.

Defife K, Anderson JM, McNally A, Collier T, Jenney C. Monocyte, macrophage and foreign body giant cell interactions with molecularly engineered surfaces. *J Mater Sci Mater Med.* 1999 Oct-Nov;10 :579-88.

F. Firenzuoli¹, L. Gori¹ and G. Lombardo. *The Medicinal Mushroom Agaricus blazei Murrill: Review of Literature and Pharmacological-Toxicological Problems*, 2007.

Fernandes, L.M. Úlcera de pressão em pacientes críticos hospitalizados: uma revisão integrativa da literatura. 2000.168f. (dissertação Mestrado em enfermagem, área enfermagem Fundamental) – Escola de enfermagem, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2000.

Field, C.K.; Kerstein, M. D. Overview of wound healing in a moist environment. *Am. J. Surg*, Easton, v167, n.1A, p. 2S-6S, 1994.

Fitzhugh, DJ, Shan S, Dewhirst, MW, Hale, PP. Bromelain treatment decreases neutrophil migration to sites of inflammation, *Clin. Immunol*, p.1-9, 2008.

Guimarães, A.Q., Cruz-Hofling, M.A., Araújo, P.M.F., Bon, C., Lôbo de Araújo, A., 2004. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. *Inflamm Res.*, 53, 284-91.

Gomes, M.T.R., Mello, V. J., Rodrigues, K.C., Bemquerer, MP. , Lopes, M. T: P., Faça, V. M., Salas, C. E. isolation of two plant proteinases in látex from *Carica candamarcensis* acting as mitogenic for mammalian cells. *Planta Med*, v 71, p: 244-248, 2005.

Garcia-Leme J, Hamamura L, Leite MP, Rocha e Silva M. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenan and by heating. *Br J Pharmac* 1973; 48: 88-96.

Gonzalez, L.M.C. Ações do enfermeiro nas lesões de pele: processo e agentes auxiliares da cicatrização. *HC Enf.*, São Paulo, v. 1, n.2, p.10-11, 1997.

Graziano, K.U.; Silva, A.; Bianchi, E. R. F. Limpeza, desinfecção, esterilização de artigos e anti-sepsia. In: Fernandes, A.T.; Fernandes, M.O.V.; Ribeiro Filho, N. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. São Paulo: Atheneu, v. 1, cap.11, p. 266-305, 2000.

Guimarães AQ, M.A. Cruz –Hofling, PM.Ferreira de Araújo, C. bon, Lôbo de Araújo. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. *Inflamm. Res*, 53, p. 284-291, 2004.

Guncar, G., Klemencil, I., Turk, B., Turk, V., Carmona, A.K., Juliano, L. and Turk, D. Crystal structure of cathepsin X: a flip-flop of the ring of His23 allows carboxy-monopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease. *Structure*, 8: 305-313, 2000.

Hale, LP, Greer PK, Sempowski GD. Bromelain treatment alters leukocyte expression of cell surface molecules involved in cellular adhesion and activation. *Clin Immunol*, 104, p.183-190, 2002.

Hale, L.P., 2004. Proteolytic activity and immunogenicity and isolated pathogens during of oral bromelain within the gastrointestinal tract of mice. *International Immunopharmacol.*, 4: 255- 264.

Hasan, J.; Shnyder, S. D.; Bibby, M.; Double, J. A.; Bicknell, R. & Jayson, G.C. Quantitative angiogenesis assays in vivo – a review. *Angiogenesis*, 7, 1-16, 2004.

Hirayama, K. K., Kohno, K, Hirayma, C., Nakamura, M., Tateishi, K, Tamura, Y, Hattori, M. and Kohno, K. Papain Protects papaya trees from herbivorous insects: role of cistein proteases in latex. *Plant J*, v 37, p 370-378, 2004.

Hoareau, L. and daSilva, E. J.medical plants: a re-emerging health aid. *Electronic journal of Biotechnology*, v 2, p 56-70, 1999. disponível em: <http://www.ejb.org/content/vol2/issue2/full2/>. Acesso em 19 set 2008.

J Riera, The dissemination of Lister's teaching in Spain. *Med Hist.* 1969 April; 13(2): 123–153

Júnior, E. R. S., Carson, F. W.; Cloutier, M.M., Guernsey L.A. , Schramm C. M., Wu, C. A., Thrall, R.S. Bromelain exerts anti-inflammatory effects in an ovalbumin-induced murine model of allergic airway disease. *Cell Immunol*; 237 (1) p 68-75, 2005.

Ketwich, R. G. O. Latex and Laticifers. *Ency. Life Sci, NPG*, p 1-6, 2001.

Kumar, V.; Cotran, R.S.; Schoen, F.J. Robbins – *Patologia estrutural e funcional*. Ed. Elsevier. 7a ed, 2005.

Laxer, JA., Hansbrough, JF. The cytotoxic effects of commonly used topical microbial agents on human fibroblasts and keratinocytes. *J Trauma*, v 31, n 6, p.775-784, 1991.

Lawrence, W., and Diegelmann, R. Growth factors in wound healing. *Clin. Dermatol.* 12: 157, 1994.

Leon, J. *Botánica De Los Cultivos Tropicales* lica, 445; 1987

Lôbo de Araújo, A., Souza, A.O., Cruz Hofling, M.A., Flores, C.A., Bon, C., Bothrops lanceolatus (Fer de lance) venom induces edema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. *Toxicon* 38, 209–221, 2000.

Kim HK, Lee JJ, Lee JS, Park YM, Yoon TR Rosmarinic Acid Down-Regulates the LPS-induced Production of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) and Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha (MIP-1 alpha) via the MAPK Pathway in Bone-Marrow Derived Dendritic Cells. *Mol Cells*. Sep 18; 26(6), 2008.

Effect of bromelain on kaolin-induced inflammation in rats. Kumakura S, Yamashita M, Tsurufuji S. *Eur J Pharmacol.* Jun 10;150(3):295-301, 1988.

Lemos, F. O., Mello, V.J., Cassali, G. D., Salas, C.E., Lopes, M.T.P, Pre-clinic evaluation of proteases from *C. candamarcensis* as termal healing principles. First Internacional Symposia about Pharmacology of Natural products and blacpma, 2006.

Majima, M., Kawashima, N., Hiroshi, I., Katori, m. Effects of an orally active non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist, FR173657, on plasma exudation in rat carrageenin-induced pleurisy. *Br. J. Pharmacol.*121, 723-730, 1997.

Mastorakos G, Chrousos GP, Weber JS. Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1993.

Maurer, M.; Von Stebut. E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, v.36, p. 1882-1886, 2004.

Menten, P.; Wuyts, A.; Van Damme, J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev.*, v. 13, n. 6, p. 455-481, 2002.

Mello, J. V. Tese de doutorado. Avaliação da atividade cicatrizante Gástrica/cutânea e de parâmentos toxicológicos da fração purificada P1G10 do látex obtido de *Carica candamarcensis*, 2005

Mello VJ,Gomes MT, Lemos FO, Delfino JL, Andrade SP, Lopes MT, Salas CE The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology* Vol. 15 (4), 237-44, 2008.

Mello V J ; Gomes, M. T. ; Lemos, F. O. ; Delfino, J. L. N. ; Andrade, S. P. ; Lopes, M. T. P. ; Salas, C. E. . Plant proteinases: the gastric protective and healing role of cystein proteinases from *C. candamarcensis*. *Phytomedicine*, v. 14, p. 1-8, 2007.

Mizuno TK. *Agaricus blazei* Murrill medicinal and dietary effects. *Food Rev Int* 1995;11:167–72.

Moussauoui, A., Nijs, M, Paul, C. Wintjens, R., Vincentelli, J., Azarkan, M. and Looze, Y. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the

context of their possible participation in the plant defense mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.*, v 58, p: 556-570, 2001.

Moutim, V., Silva, L.G., Lopes, M.T.P., Fernandes G.W. and Salas, C.E. Spontaneous processing of peptides during coagulation of latex from *Carica papaya*. *Plant Sci.*, v 142, p: 115-121, 1999.

Mynott, T.L., Ladhams, A., Scarmato, P. and Engwerda, C.R. Bromelain, from pineapple stems, proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinase-2 in T cells. *J. Immunol.*, v 163, p: 2568-2575, 1999.

Nackman GB, Karkowski FJ, Halpern VJ, Gaets HP, Tilson MD. Elastin degradation products induce adventitial angiogenesis in the anidjar/dobrin rat aneurysm model. *Surgery*. 122, p. 39-44, 1997.

O'Hara, M., Kiefer, D. Farrell, K. Kemper, K. A review of 12 commonly used medicinal herbs. *Archives of family medicine*, v 7, p 523-535, 1998.

Passaniti, A., Taylor, R.M., Pili, R., Guo, Y., Long, P.V. Haney, J.A., Pauly, R.R., Grant, D.S & Martin, G.R. A simple quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenesis agents using reconstituted basement membrane heparin and fibroblast growth factor. *Lab invest.* 67, 519-528, 1992.

Pedersen BK. Exercise and cytokines. *Immunol Cell Biol* 2000; 78: 532-5.

Pereira, M.T., Lopes, M.T.P., Meira, W.O. and Salas, C.E. (2001). Purification of a cysteine ptoteinase from *Carica candamarcensis* L. and cloning of a genomic putative fragment coding for this enzyme. *Prot. Express. Purificat.*, 22: 249-257.

Phillips J, Murry P, Crocker J. *The biology of disease*. England: Blackwell Science, 22-29, 1995.

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS. Pró-Reitoria de Graduação. Sistema de Bibliotecas. Padrão PUC Minas de normalização: normas da

ABNT para apresentação de projetos de pesquisa. Belo Horizonte, 2007. Disponível em <<http://www.pucminas.br/biblioteca/>>. Acesso em: 07 de agosto de 2008.

Poulter, N.H. and Caygill, J.C. (1985). Production and utilization of papain, a proteolytic enzyme from *Carica papaya* L. *Tropical Sci.*, 25: 123-137.

Pozzi A, Moberg PE, Miles LA, Wagner S, Soloway P, Gardner HÁ. Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin 1 α knockout mice cause tumor vascularization. *ProcNatl Acad Sci. USA* , 97, p.2202-2207, 2000
Rates S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, Volume 39, v 5, p 603-613, 2001.

Robbins, S. L., et al. – *Patologia estrutural e funcional* 3^a ed. Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2005, 1422 p.

Rogenski, N. M. B.; Baptista, C. M. C.; Sofia, M. H. – O uso da papa ína a 2% nas lesões provocadas oela S índrome de Fournier: a propósito de 14 casos. *Rev. Paul. Enf.*, v.17, n 1/3, p. 39-45, 1998.

Sanchez neto, R.; Barone, B.; Teves, D. C.; Simões, M. J.; Novo, N. F.; Juliano, Y. – Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. *Acta Cir. Bras.*, 8(1);18-23, 1993

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, 2000. 306p.

Siqueira Júnior, J. F.; Moraes, S. R.; Lopes, H. P. atividade antimicrobiana de águas sanitárias disponíveis no mercado nacional. *Ver. Brás. Odontol.*, Rio de Janeiro, v. 56, n.2, p. 57-60, 1999.

Silva L. G., Lopes, M. T. P., Garcia, O. S. and Salas C. E, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30, 615-619, 1997.

Silva, C.A., Gomes, M.T.R., Ferreira, R.S., Rodrigues, K.C.L., do Val, C.G., Lopes, M.T.P., Mello, V.J. and Salas C.E. (2003). A mitogenic protein fraction in latex from *Carica candamarcensis*. *Planta Med.*, 69: 926-932.

Silva L. G., Lopes, M. T. P., Garcia, O. S., Salas C. E, Changes in protein profile during coagulation of latex from *Carica papaya* (1997). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30(5), 615-619.

Shi, GP, Sukhova, M. Kuzuya, Q. Ye, J.Du,Y.Zahang, J-H. Pan, M.L. Lu, X.W. cheng, A. Iguchi, S. Perreu, A.M.E.Lee, H.A. Chapman, P.Libby. Deficiency of the cysteine proteases cathepsin S impairs microvessel growth. *Circulation research*, p.493-5000, 2003.

Shivkar YM, Kumar, VL. Histamine mediates the pro-inflammatory effect of latex of *Calotropis procera* in rats. *Mediators of inflammation*, 12(5), 299-302, 2003.

Springer TA. (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol.* 57:827-72.

Suzuki, Y; Tanihara, M; Nakagawa, M; Turukawa, A; Masuda, C; Terasawa, K; Ichikawa, Y; Mizushima, Y. Na interleukin -1 biding region oligopeptide from the human type IL1 receptor reduces acute inflammation delayed hipersensitivity reaction and lethal ebdoxemia in animals. *J. Interferon Cytokine Res*, v 15, n 12, p. 1083-1088, 1995.

Tailor, A., Tomlinson, A., Salas, A., Panes, J., Granger, D.N., Flower, R.J., Perretti, M., 1999. Dexamethasone inhibition of leucocyte adhesion to rat mesenteric postcapillary venules: role of intercellular adhesion molecule 1 and KC. *Gut* 45, 705–712.

Turk, D. and Guncar, G. Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. *Acta Crystallogr.*, v 59, p: 203-213, 2003.

Van Winkles W. The fibroblast in wound healing. *Surg Gynecol Obstet.*, v 124, p369, 1967.

Vinegar, R.; Truax, J.F.; Selph, J.L.; Johnston, P. R.; Venable, A. L.; McKenzie, K.K.; Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Fed. Proc.*, 46(1): 118-146 (1987).

Wald, M., Olejar, T., Pouckova, P. and Zadinova, M. (1998). Proteinases reduce metastatic dissemination and increase survival time in C57BL6 mice with the Lewis lung carcinoma. *Life Sci.*, 63(17): 237-243.

Walraevens, V., Vandermeers-Piret, M. C., Vandermeers, A. Gourlet, P. and Robberecht, P. Isolation and primary structure of the CCI papain-like cysteine proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* hook. *Biol. Chem.*, v 380, p 485-488, 1999.

Winter, C.A.; Risley, E.A. and Nuss, G.W.— Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111: 544-547, 1962.

Witte, M.B. & Barbul, A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*, 77, 509-28, 1997.

Yamada, B. F. A. Terapia tóptica de feridas: limpeza e desbridamento. *Ver. Esc. Enf. USP, São Paulo*, v. 33, p.133-140, 1999.

Yamamoto, D., Matsumoto, K., Ohishi, H., Ishida, T., Inoue, M., Kitamura, K. and Mizuno, H. (1991). Refined x-ray structure of papain-E-64-c complex at 2.1 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 266(22): 14771-7.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)