

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Departamento de Bioquímica e Imunologia

MARIA LETÍCIA DE PAIVA AGOSTINI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-  
INFLAMATÓRIA DE UMA FRAÇÃO DO LÁTEX  
NATURAL DA SERINGUEIRA *Hevea brasiliensis* EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE EM  
CAMUNDONGOS**

RIBEIRÃO PRETO - SP  
2007

MARIA LETÍCIA DE PAIVA AGOSTINI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-  
INFLAMATÓRIA DE UMA FRAÇÃO DO LÁTEX  
NATURAL DA SERINGUEIRA *Hevea brasiliensis* EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Coutinho-Netto

Ribeirão Preto – SP

2007

**Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Agostini, Maria Leticia de Paiva

Avaliação da atividade anti-inflamatória de uma fração do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* em modelo experimental de colite em camundongos. Ribeirão Preto, 2007.

81 p. ; il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Coutinho-Netto, Joaquim.

1. *Hevea brasiliensis*. 2. Colite. 3. TNBS. 4. IL-10.  
5. Inflamação

*Aos meus pais,  
Minha irmã Giovana,  
e Irma, minha amada avó,  
Dedico este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

*À Deus,*

*Ao Prof. Dr. Joaquim Coutinho-Netto,*

grande cientista, pela confiança, por ter acreditado na realização deste trabalho, pelos ensinamentos, orientação e amizade dispensados nesses anos de convívio.

*Aos meus pais, Sergio e Silvana,*

pelo amor incondicional, pela instrução e apoio, que me permitem tornar a pessoa que sou a cada dia.

*À minha irmã Giovana,*

pelo exemplo, carinho e cuidado sempre presentes.

*À todos da família,*

pelo amor, união, positivismo e grande espírito esportivo que nos une.

*Ao Prof. Dr. João José Lachat,*

pela grande ajuda nas análises histopatológicas.

*À Prof<sup>a</sup>. Dra. Norma Tiraboschi Foss,*

por permitir a execução de parte do trabalho em seu laboratório.

*Aos técnicos Silvia, Lúcia, José e, especialmente, Verinha,*

pela assistência e apoio durante todo o período experimental, pelo companheirismo, alegrias e tristezas compartilhadas no laboratório.

*Aos meus co-orientadores não oficiais, René, Ruither e Pancinha,*  
por toda a força, amizade, pelos ensinamentos e trocas de experiências.

*Às colegas de laboratório: Vanessa, Larissa e, principalmente, Viviane (Bibs),*  
pela parceria, convivência e a paciência necessária no dia a dia.

*Aos amigos-irmãos Michele, Valéria, Mahmoud e Thiti,*  
por sempre incentivarem e estarem presentes na minha vida.

*À todos os grandes amigos,*  
por compreenderem minha ausência desde que iniciei esta nova empreitada, por permanecerem ao meu lado e me proporcionarem tantos momentos de alegria.

*Aos amigos da bioquímica: grande Félip, Marília, Paty, Lucas, Tassi, Pedro, Japs, Dri, Hugo, e os dos demais departamentos,*  
pelo companheirismo e todos os excelentes momentos que passamos juntos.

*Às queridas amigas recém adquiridas: Rosana e Sami*  
pela amizade, confiança, carinho, risadas (muitas risadas!)...você foram fundamentais na fase final desta caminhada!

*À Izilda,*  
por ajudar no preparo do material para estudo histológico.

*À Ceci,*  
pela boa vontade e auxílio na execução das técnicas de cultura de células e ELISA.

*À todos os funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia (FMRP-USP), principalmente à Ivone e Lúcia, por todo o suporte durante estes dois anos.*

*À CAPES, FAPESP e CNPq, pelo apoio financeiro.*

*À todos que contribuíram para este trabalho, que compartilharam esta caminhada, e que por ventura eu tenha esquecido de agradecer, meu sincero muito obrigada!*

*“Para ser grande, sê inteiro:  
nada teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa.  
Põe quanto és no mínimo que fazes.  
Assim como em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.”*  
*(Fernando Pessoa)*



# ***Resumo***

---

## RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais, incluindo a colite ulcerativa e a doença de Crohn, são as mais graves doenças inflamatórias crônicas do trato gastrintestinal em humanos. Algumas evidências mostram que o sistema imune desempenha uma função crítica no desenvolvimento e na manutenção destas doenças, mais especificamente, a produção descontrolada de algumas citocinas pró-inflamatórias tais como IL-12, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , entre outras. Estas evidências são confirmadas por modelos de inflamação intestinal em murinos, tais como a indução de colite experimental pela administração intrarectal de 2,4,6 ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). A partir deste modelo, que retrata uma resposta inflamatória intestinal mediada por células de linhagem Th1, avaliamos a atividade anti-inflamatória da fração cromatográfica do látex FrHbIII, que havia mostrado induzir a produção da citocina moduladora de respostas inflamatórias IL-10 *in vitro*. Após a indução de colite por TNBS, os animais tratados com a fração FrHbIII via oral apresentaram menor porcentagem de perda de peso, menor ocorrência de diarreia e prolapso retal, além de não haver ocorrido registro de mortalidade, em comparação aos animais que receberam apenas administração de TNBS. Grande melhoria foi observada também na análise histológica feita em secções do cólon destes animais, em comparação ao grupo em que a colite foi induzida, apresentando grande similaridade ao grupo controle. A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), um marcador de infiltrado inflamatório, foi avaliada em porções do cólon distal de cada grupo. No grupo de animais que receberam administração de TNBS, a atividade da MPO apresentou-se quatro vezes maior em relação ao grupo controle. No entanto, o grupo que recebeu administração de TNBS e tratamento com a fração FrHbIII, apresentou metade da atividade da enzima em relação ao grupo TNBS não tratado, indicando menor quantidade de infiltrado inflamatório. Dessa forma, concluímos que a fração cromatográfica FrHbIII possui ação moduladora de atividade inflamatória em colite em camundongos.

# ***Abstract***

---

## Abstract

The inflammatory bowel disease, including both ulcerative colitis and Crohn's disease, are major chronic inflammatory diseases of the gastrointestinal tract in humans. Some evidences have been revealed that immune system plays a critical role in the development and persistence of these diseases, more specifically, an imbalance production of some proinflammatory cytokines such as IL-12, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , etc. These evidences are supported by murine models for intestinal inflammation, such as experimental colitis induction by intra-rectal administration of 2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). Trough this model, that ressembles a Th1 cell mediated intestinal inflammation response, we assayed the anti-inflammatory response of the látex chromatographic fraction FrHbIII, that had reported to induce production of the inflammatory response modulating cytokine IL-10 *in vitro*. Before TNBS colitis induction, animals orally treated with FrHbIII fraction reported less percentage of weigth loss, less development of diarrhea and rectal prolapse, and no mortality incidence, compared with animals that received TNBS administration only. Improvements were observed in histological analysis made in colon segments of these animals, comparing with colitis group, with great similarity with control group. Myeloperoxidase activity (MPO), an infiltrating inflammatory marker, was nearly four fold greater in animals group that received TNBS administration, compared with control group, that received ethanol 50% only. However, animals group that received TNBS administration and FrHbIII treatment, the MPO activity was a half than the MPO activity of the non treated TNBS group. Based on the present data, we conclude that the latex cromathographic fraction FrHbIII have a potencial modulating activity on inflammatory response of murine colitis model.

# ***Abreviaturas***

---

## Abreviaturas:

Ac	Anticorpo
ANOVA	Análise de variância
APC	Célula apresentadora de antígeno
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
ConA	Concavalina A
DEAE-celulose	Dietilaminoetil celulose
DII	Doença inflamatória intestinal
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão da média
FrHb	Fração <i>Hevea brasiliensis</i>
GALT	Tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal
HE	Hematoxilina-eosina
HTABr	Brometo de hexadecil trimetil amônio
ICAM-1	Molécula de adesão intecelular-1
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL-	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo de histocompatibilidade maior
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NK	Célula “natural killer”
O-da	orto-dianisidina

PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
rpm	Rotações por minuto
SBF	Soro bovino fetal
TGF- $\beta$	Fator de crescimento e transformação beta
TGI	Trato gastrintestinal
Th	Linfócito T auxiliar
TNBS	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1	Molécula de adesão vasculocelular-1

# ***Sumário***

---



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>1.INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2.OBJETIVOS</b>	18
<b>3.MATERIAL E MÉTODOS</b>	20
3.1 - Obtenção do látex	21
3.2 – Coagulação do látex para obtenção do soro	23
3.3 – Cromatografia em DEAE-celulose	23
3.4 – Cultura de células mononucleares do sangue periférico	25
3.4.1 – Coleta de sangue periférico	25
3.4.2 – Obtenção das células	25
3.4.3 – Metodologia quantitativa ELISA	26
3.4.4 – Preparo da curva padrão	27
3.5. – Avaliação de atividade anti-inflamatória utilizando modelo de colite experimental em camundongos	28
3.5.1 - Animais de experimentação	28
3.5.2 - Indução da colite	29
3.5.3 - Monitoramento dos animais	30
3.5.4 - Análise histopatológica	30

3.5.5 - Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase	31
3.6 – Análise Estatística	32
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>33</b>
4.1 – Cromatografia em DEAE-celulose	34
4.2 – Produção de citocina IL-10 na presença da fração FrHbIII	36
4.3 – Avaliação de atividade anti-inflamatória	38
4.4 – Análise histopatológica de segmentos intestinais referentes ao cólon distal de animais induzidos à colite e tratados com a fração FrHbIII	45
4.5 – Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase	50
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>61</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>64</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>76</b>
8.1 – Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal	77
8.2 – Autorização dos voluntários doadores de sangue	78
8.3 – Tabela: Níveis de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de células na presença da fração cromatográfica do látex FrHbIII:	79
8.4 - Coloração utilizada: hematoxilina – eosina:	80

# ***Introdução***

---

## **1 - INTRODUÇÃO**

A porção intestinal compreende um dos maiores e mais complexos componentes do sistema imune. A mucosa do trato gastrointestinal (TGI) forma uma complexa barreira entre o hospedeiro e o conteúdo do lúmen, onde se encontra a maior parte de antígenos estranhos aos quais o organismo é exposto. Em adição às características estruturais das células epiteliais, que servem como barreira, está claro que um compartimento na superfície apical epitelial composto por produtos secretados por estas células, possuem uma função essencial na proteção da mucosa contra injúrias primárias (PODOLSKY, 1999). Além da proteção mecânica fornecida pelo muco e pelas “*tight junctions*” das células epiteliais, o sistema imunológico do trato gastrointestinal (TGI) apresenta função primordial no mecanismo de defesa. Está implícito nesta função sua habilidade de organizar uma resposta imune contra patógenos, enquanto é mantida a tolerância a antígenos luminiais benignos, derivados de proteínas alimentares e bactérias comensais (LINDSAY; HODGSON, 2001), sendo a resposta imune de mucosa distinta, focada mais intensivamente na supressão do que na promoção de imunidade (LIU; LEFRANÇOIS, 2004).

Devido à alta carga de antígenos que estão expostos às superfícies mucosas, o sistema imune gastrointestinal exibe uma resposta imunológica pequena à maioria destes antígenos. No entanto, este sistema também é capaz de induzir respostas imunes efetivas, mediadas por células leucocitárias e

anticorpos em direção a antígenos selecionados, tais como os encontrados nos alimentos, os bacterianos, etc (NEURATH et al., 2002).

Deve-se salientar que, respostas imunes exacerbadas contra microorganismos não patogênicos, podem ser prejudiciais ao hospedeiro e desencadear reações de hipersensibilidade contra antígenos alimentares ou bactérias comensais, levando assim ao desenvolvimento de doenças inflamatórias como a colite ulcerativa e a doença de Crohn (MOWAT, 2003; ISAACS et al., 2005; HANAUER, 2006).

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são uma família de doenças crônicas, idiopáticas, recidivantes e tecido-destrutivas, caracterizadas pela disfunção das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> da mucosa, produção alterada de citocinas, e inflamação celular, podendo levar a danos prolongados e ocasionalmente irreversíveis da função e estrutura gastrintestinal, mais precisamente na porção distal do intestino grosso e mucosa colônica (GONZALEZ-REY et al., 2006; BOUMA; STROBBER, 2003). As principais DIIs que ocorrem em humanos são subdivididas em dois fenótipos: doença de Crohn e colite ulcerativa.

A doença de Crohn é uma doença crônica caracterizada por inflamação transmural e granulomatosa, que pode causar inflamação em qualquer segmento do trato digestivo, como resultado de respostas imunes desreguladas contra antígenos intraluminais derivados da flora bacteriana comensal em indivíduos geneticamente susceptíveis (PODOLSKY, 2002). Aproximadamente 75% dos pacientes têm um envolvimento intestinal localizado de baixa monta, e 90% destes pacientes apresentam a doença no íleo terminal (JAGTAP et al., 2004).

A colite ulcerativa ocorre como consequência de uma recidiva aguda ou crônica de doenças inflamatórias intestinais, e é confinada a todo o intestino, começando no reto e progredindo, aparentemente, de maneira contínua afetando outras porções intestinais (PAPADAKIS; TARGAN, 2000).

Tanto a doença de Crohn como a colite ulcerativa, são acompanhadas de sintomas clínicos tais como diarreia, prolapso retal, perda de peso e dores abdominais, e são histologicamente caracterizadas pela inflamação e ulceração da mucosa colônica (POPOV & OVODOVA, 2006).

Apesar da distinção feita entre o padrão destas duas doenças, em algumas ocasiões elas são juntamente consideradas devido às suas similaridades em termos de apresentação, patologia, investigação, complicações e tratamento.

Embora inúmeros estudos que estão sendo feitos a respeito das DIIs, a etiologia destas doenças permanece desconhecida (OHKAWARA et al., 2006), mas parece resultar de uma série de interações complexas entre susceptibilidade genética, meio ambiente e sistema imune (SCHREIBER, 2000; VIETH; TANNAPFEL, 2006). Indivíduos geneticamente susceptíveis, ou com alterações no sistema imune do TGI relacionadas a antígenos luminais, são propensos a desenvolver colite ulcerativa (MURAKAMI et al., 2002). É provável também que mecanismos autoimunes com produção de autoanticorpos, induzam danos teciduais através de citotoxicidade mediada por anticorpos (SHEVACH, 1999). Estudos de DII em modelos animais e humanos sugerem haver uma hiperresponsividade aos constituintes normais do intestino como uma das variadas causas da doença (SHEVACH, 1999). Ainda, é possível que exista uma alteração na permeabilidade intestinal que seja responsável pela inflamação, podendo este

mecanismo patológico ser desencadeado por vários agentes ambientais, incluindo agentes infecciosos e alimentos (SHANAHAN, 2001; SCHINKE et al., 2004; KORZENIK, 2005). Não se sabe, porém, se a alteração na permeabilidade intestinal é um fenômeno primário (geneticamente determinado) ou secundário à inflamação local. No entanto, em ambos os casos, a alteração na função da barreira intestinal, promove inflamação ao permitir a penetração de antígenos luminiais e ativar a resposta imune.

O sistema imune do TGI compreende em duas armas efetoras: resposta imune humoral (mediada por anticorpos) e imunidade citotóxica (LINDSAY; HODGSON, 2001). O tráfego de células inflamatórias para o intestino é mediado por uma série de interações complexas entre leucócitos circulantes e o endotélio vascular. Tais interações são reguladas pela expressão de uma série de moléculas de adesão e receptores de citocinas / quimiocinas presentes na superfície das células endoteliais e de leucócitos (GIORGOS; COMINELLI, 2006). Alguns dados sugerem que células apresentadoras de antígenos (APCs) - como macrófagos e células dendríticas (DCs) - células T alfa-beta e suas citocinas possuem função importante no orquestramento de uma resposta imune gastrointestinal específica. Em particular, as citocinas dos subtipos distintos de células T alfa-beta e a regulação transcricional da diferenciação destas células parecem ser de fundamental importância na imunidade do TGI (NEURATH et al., 2002).

Citocinas são mediadores polipeptídicos produzidos por células de linhagem linfóide (linfócitos) e mielóide (monócitos, macrófagos, plaquetas, neutrófilos, basófilos, mastócitos e eosinófilos), bem como por células epiteliais e

mesenquimais que atuam de maneira autócrina ou parácrina. São rapidamente sintetizadas e secretadas por células inflamatórias após estímulo, e induzem a produção de moléculas de adesão e outros mediadores inflamatórios como metabólitos reativos de oxigênio, além de mediadores lipídicos tais como: prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (ELSON et al., 1995). As citocinas estão envolvidas em uma variedade de processos biológicos, incluindo ativação, crescimento e diferenciação celular, e são centrais no desenvolvimento de inflamação e imunidade (PAPADAKIS; TARGAN, 2000).

Nas DIIs ocorre um desequilíbrio entre citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias, mais destacadamente, são detectados níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , que são secretadas por macrófagos, linfócitos, e neutrófilos polimorfonucleares (ROGLER; ANDUS, 1998). Esta atividade leva a uma amplificação da cascata inflamatória e à secreção de mais mediadores inflamatórios, enzimas, e radicais livres que causam injúria tecidual e estão implicados na patogênese da diarreia, permeabilidade mucosa e fibrose (SARTOR, 1994).

Alguns mediadores, incluindo a citocina TNF- $\alpha$ , ativam a transcrição gênica nas células endoteliais, resultando em mudanças no balanço homeostático, aumento de adesão leucocitária e aumento da permeabilidade vascular (MAZZON et al., 2005). Quando a homeostase da mucosa normal é rompida, há um desequilíbrio no balanço de citocinas, alteração da barreira epitelial ou perda de função das células imunorreguladoras, podendo levar à DII. Por outro lado, quando células epiteliais do intestino atuam como células apresentadoras de



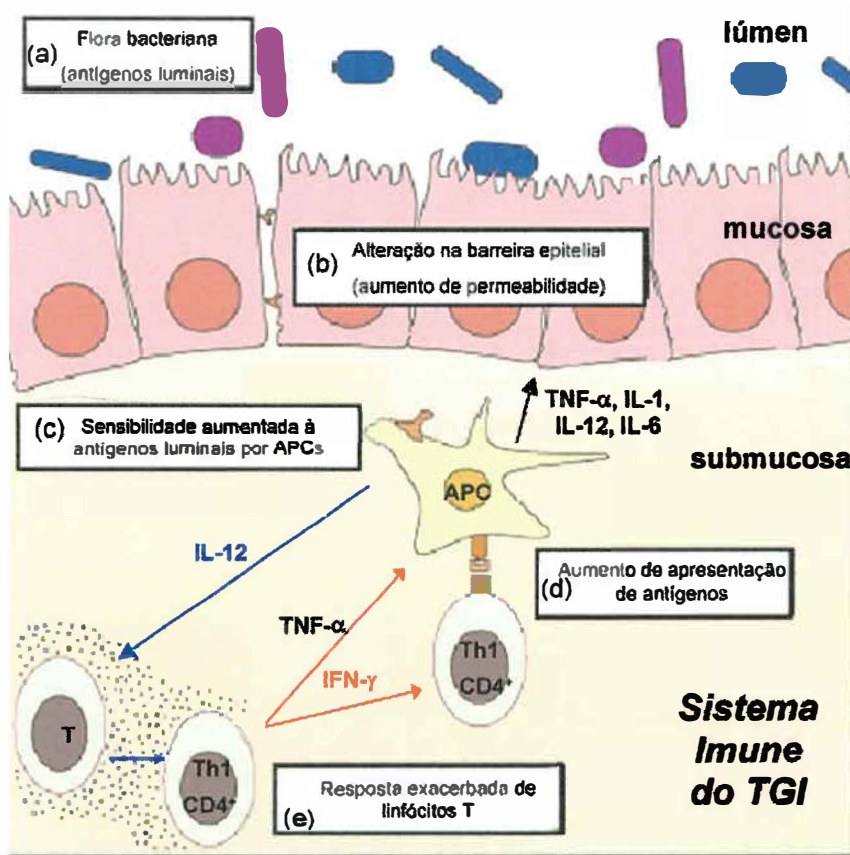
antígeno, não ocorre este tipo de resposta, devido à falta de moléculas co-estimulatórias (MIYAMOTO et al., 2005). Se um microorganismo penetra nas células epiteliais, estas expressam moléculas de complexo de histocompatibilidade maior (MHC) diferentes das clássicas de classe I e II. Estas moléculas, chamadas MIC-A e MIC-B, são reconhecidas pelas células T gama-delta do intestino, gerando respostas locais, que eliminam as células infectadas e permitem que o epitélio se regenere rapidamente (NEURATH et al., 2002).

Progressos relevantes ocorreram na caracterização de populações de células imunes e mediadores inflamatórios em pacientes com DII e em modelos de DII em murinos. Sabe-se que há infiltrado inflamatório em todas as camadas do intestino, composto principalmente por linfócitos, monócitos/macrófagos, plasmócitos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (YANG et al., 2002; RIJNIESE et al., 2006), com ocorrência de hiperplasia nas criptas, edema intersticial e ulcerações na mucosa intestinal (KRIEGLSTEIN et al., 2001).

Células como neutrófilos migram para o sítio de inflamação e liberam seus conteúdos tóxicos, como espécies reativas de oxigênio, podendo resultar em vasodilatação, ativação de fatores de transcrição nuclear, além de subsequente produção de citocinas inflamatórias, recrutamento e ativação de leucócitos, apoptose e necrose de células parenquimatosas (KRIEGLSTEIN et al., 2001). Tem sido sugerido que os neutrófilos contribuem marcadamente com danos teciduais e disfunção da mucosa em DII humana, bem como em modelos experimentais de colite (GUO et al., 1999).

Os macrófagos são ativados por interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), que é produzido pelas células Th1 ativadas. Os macrófagos ativados produzem citocinas como fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), IL-8, IL-1 e IL-12 (MAZZON et al., 2005). A IL-12 promove o desenvolvimento de respostas imunológicas pelas linfócitos Th1 (CD4<sup>+</sup>), que secretam IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , os quais geram respostas de hipersensibilidade com ativação macrofágica e formação de granuloma (PAPADAKIS; TARGAN, 2000). Os macrófagos participam do processo inflamatório até sua conclusão junto aos processos de desbridamento. Sua função antimicrobica se dá por meio da fagocitose e geração de radicais reativos, tais como óxido nítrico, radical superóxido, radical hidroxila e peróxido (WITTE; BARBUL, 1997).

A ativação e o recrutamento de leucócitos para o cólon são supostamente fundamentais na patogênese dos danos teciduais desta condição inflamatória intestinal crônica (KESHAVARZIAN et al., 1999). Os leucócitos já presentes no tecido e os recrutados liberam mediadores que modulam o dano tecidual no sítio inflamatório (RIJNIERSE et al., 2006). Em pacientes com DII, há estimulação de células T CD4<sup>+</sup> auxiliares, levando à exacerbação da resposta inflamatória no tecido linfóide associado ao trato gastrintestinal (GALT). Este desequilíbrio entre os mecanismos auxiliares e supressores na mucosa intestinal pode resultar em um processo inflamatório exagerado mantido devido à presença do antígeno no lúmen do intestino (SINGH et al., 2001; ALLEZ et al., 2004; MAUL et al., 2005).



**Figura 1:** Hipótese de processo patológico na Doença de Crohn. É possível que ocorra alterações na flora bacteriana (a) no contexto decorrente a defeitos na barreira epitelial, tal como aumento de permeabilidade devido à quebra de “*tight junctions*” intercelulares (b). Este processo permite a penetração de antígenos luminais desencadeando uma hipersensibilidade das células apresentadoras de antígenos (APCs) (c), que passam a liberar grandes quantidades de IL-12, citocina responsável pela maturação de linfócitos Th1 CD4<sup>+</sup>, bem como pela indução à liberação das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por estas células. Este processo desequilibrado de produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias desencadeia um aumento de apresentação de antígenos (d), e uma responsividade exacerbada de linfócitos T (e) e células fagocíticas, levando à formação de granulomas e lesões na mucosa intestinal.

É bem estabelecido que o TGI de pacientes com doença de Crohn apresenta uma dominância fenotípica de linfócitos Th1 CD4<sup>+</sup>, caracterizado pela produção de IFN- $\gamma$ , interleucina-12 (IL-12) e TNF- $\alpha$ , enquanto que o TGI de pacientes com colite ulcerativa a dominância é de linfócitos Th2 CD4<sup>+</sup>, caracterizados pela produção de fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ) e interleucina-5 (IL-5), porém, o padrão de citocinas produzidas na lesão inicial difere do que ocorre no desenvolvimento da lesão crônica.

Quanto ao balanço Th1/Th2, a resposta Th1 parece ser predominante em pacientes com doença de Crohn, além do mais, tem sido demonstrado que macrófagos desempenham um papel fundamental na formação de granuloma epitelióide não gasoso na mucosa intestinal, que é uma característica histopatológica da doença de Crohn, e que também está envolvido na resposta imune gastrintestinal (MAZZON et al., 2005). Estas constatações foram feitas a partir de estudos em modelos de colite animal, como por exemplo, o modelo de inflamação colônica induzido por administração intra-retal de ácido 2,4,6 trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) em camundongos, que mimetiza muitas características clínicas, histopatológicas e imunes da DC em humanos (NEURATH et al., 1995).

Neste modelo, o desenvolvimento da inflamação intestinal é resultado de uma ligação covalente do agente haptênizante às proteínas autólogas da mucosa do hospedeiro, com um subsequente estímulo de hipersensibilidade prolongada aos antígenos próprios modificados por TNBS (FIORUCCI et al., 2002). Os maiores efeitos induzidos em camundongos através do uso do TNBS incluem

úlceras focais, distorção de criptas, depleção de células “globet” e, mais marcadamente, presença de granulomas, associado a sintomas clínicos como diarreia, prolapso retal e perda de peso (SUGIMOTO et al., 2002).

Este modelo exibe com consistência um desequilíbrio de citocinas regulatórias, mais especificamente uma produção excessiva de citocinas Th1 tais como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6, entre outras; e tem sido amplamente usado para a avaliação em ampla escala nas pesquisas por agentes potencialmente anti-colíticos e terapêuticos (CHENG et al., 2005). O TNF- $\alpha$  e a IL-6 induzem a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, ocorrendo subsequente a infiltração de células inflamatórias na região da camada mucosa. Este processo envolve selectinas, moléculas de adesão intercelulares-1 (ICAM-1), e molécula de adesão vasculocelular (VCAM-1), que são expressas na superfície do endotélio vascular, portanto, a regulação deste processo é muito importante no controle das DIIs (MAZZON et al., 2005).

Além do padrão de resposta imunológica direcionada aos perfis Th1 ou Th2, com a liberação de substâncias quimiotáticas e citocinas pró-inflamatórias, outro grupo distinto de citocinas, as quimiocinas (YANG et al., 2002), constituem um outro fator importante no desenvolvimento das inflamações intestinais. As quimiocinas são pequenas proteínas pro-inflamatórias que possuem um amplo perfil de atividades envolvidas no recrutamento e ativação de populações específicas de leucócitos nos sítios de inflamação, e possuem funções importantes no início e na manutenção da resposta inflamatória do organismo (YANG et al., 2002). Algumas evidências indicam que quimiocinas, bem como

seus receptores, estão envolvidos na patofisiologia de muitas doenças inflamatórias (CALIXTO et al., 2004).

O acúmulo de citocinas e quimiocinas e a ativação de células inflamatórias na mucosa intestinal causam danos teciduais que resultam em sintomas clínicos tais como diarreia sanguinolenta e dores abdominais (HALE et al., 2005).

As quimiocinas produzidas por células epiteliais intestinais são fundamentais no desenvolvimento dos infiltrados inflamatórios na colite ulcerativa (ECKMANN et al., 1993a), e são produzidas em resposta a constituintes bacterianos e citocinas secretadas por diversas células inflamatórias, assim como células endoteliais e epiteliais (ECKMANN et al., 1993a; ECKMANN et al., 1995). Estas proteínas são produzidas sob o estímulo de agonistas inflamatórios, podendo atrair e ativar vários tipos celulares e, portanto, participar dos mecanismos envolvidos na imunopatogênese das DII (MacDERMOTT et al., 1998).

Normalmente, inflamação termina com o reparo tecidual. O reparo da mucosa intestinal após alguma injúria ocorre através do efeito agregado de processos coordenados, cujas contribuições são dependentes muito mais à profundidade do que à extensão do dano (PODOLSKY, 1999). No entanto, nas DII o reparo não acontece ou é incompleto e ocorrem recidivas. As lesões precoces não cicatrizam e levam à inflamação crônica. A procura por agentes terapêuticos específicos, efetivos e seguros para as DIIS é um trabalho constante (LEAVY, 2006).

Hoje está claro que as células imunológicas tanto de origem linfóide quanto de origem mielóide têm uma função integral no reparo tecidual e nos

processos de reação inflamatória e defesa do organismo. As células imunológicas são vitais para a regulação do processo de reparo tecidual através da secreção de moléculas sinalizadoras, tais como as citocinas, linfocinas e fatores de crescimento (PARK & BARBUL, 2004). A produção desbalanceada de citocinas e mediadores inflamatórios por células  $CD4^+$  exerce importante papel na patogênese das DII (PAPADAKIS; TARGAN, 2002), e a participação destas células no processo inflamatório, centraliza-se na interação com o macrófago, mediada pela produção de citocinas estimuladoras da ativação, como  $IFN-\gamma$ , e de citocinas supressoras como  $TGF-\beta$  e interleucina-10 (IL-10) (DING; SHEVACH, 1992).

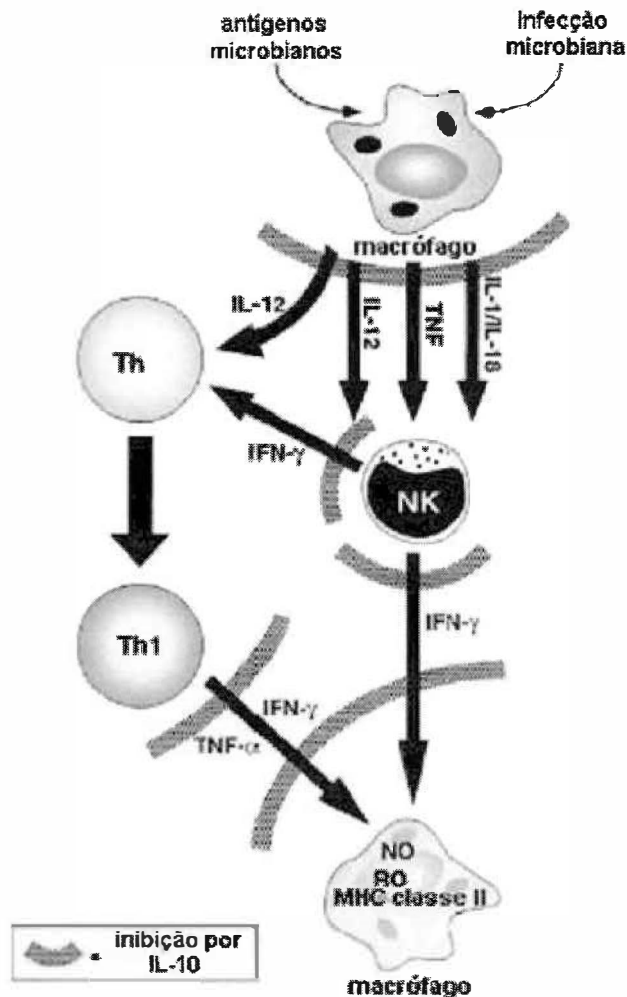
A IL-10 é uma proteína de 18,5 kDa, composta de 160 aminoácidos, responsável por uma ampla atividade imunorregulatória, atuando tanto no sistema imune inato quanto no sistema imune adaptativo (LINDSAY; HODGSON, 2001). Primeiramente reconhecida pela habilidade de inibir a ativação e as funções efetoras das células T, monócitos e macrófagos, é uma citocina pleiotrópica com diferentes efeitos nos diversos tipos celulares hematopoiéticos. A atividade imunorregulatória da IL-10 é baseada em sua habilidade de inibir tanto a síntese de citocinas, como a produção de quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de células pró-inflamatórias (MOORE et al., 2001) e a apresentação de antígenos. Desta forma, atua regulando o MHC de classe II e a expressão de moléculas coestimulatórias que são requeridas pelas células apresentadoras de antígenos em suas interações com as células T (LINDSAY; HODGSON, 2001).

Em adição a essas atividades, a IL-10 possui uma ampla escala de funções e age regulando o crescimento e diferenciação de uma grande variedade de células, incluindo timócitos, células B, células “*natural killer*” (NK), células T citotóxicas e auxiliares, mastócitos, granulócitos, células dendríticas, queratinócitos e células endoteliais (MOORE et al., 2001). A habilidade da IL-10 de inibir a produção de citocinas por células T e células NK ocorre de forma indireta, através da inibição da função das células acessórias (monócitos e macrófagos) (DING & SHEVACH, 1992).

A IL-10 modula a expressão de citocinas, mediadores solúveis e moléculas de superfície celular por células de origem mielóide (como neutrófilos, monócitos/macrófagos, basófilos, por exemplo), com conseqüências importantes na habilidade destas células de ativar e sustentar as respostas imunes e inflamatórias. Os efeitos da IL-10 na expressão de citocinas e função de macrófagos humanos são geralmente similares àquelas em monócitos, embora sejam menos pronunciados (BERKMAN et al., 1995). A liberação de IL-10 por monócitos é um fenômeno relativamente tardio, e pode ser estimulado por mediadores solúveis tais como TNF- $\alpha$  e lipopolissacarídeo (LPS), bem como em interações cognatas com células T ativadas (LINDSAY; HODGSON, 2001).

Apesar de muitos dos efeitos inibitórios da IL-10 em linfócitos T serem secundários à redução de citocinas pró-inflamatórias derivadas de monócitos, esta citocina possui um efeito regulatório direto na proliferação e diferenciação das células T através da inibição da liberação das citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$  por clones de células T ativadas (MALEFYT et al., 1993).





**Figura 2:** Representação esquemática das funções da citocina IL-10 na regulação da resposta inflamatória do sistema imune inato e adaptativo à infecções.

Doenças inflamatórias intestinais e outras respostas inflamatórias exacerbadas foram diagnosticadas em camundongos pela deficiência da IL-10, indicando que uma importante função da IL-10 *in vivo* é limitar respostas inflamatórias (KUHN et al., 1993). A significância clínica da expressão da IL-10 é apoiada por estudos que mostram que o aumento imunológico desta citocina

previne inflamação e danos à mucosa, em modelos de colite animal em humanos (SASAKI et al., 2005). Isto indica que o sistema citocinas constitui um objeto muito interessante de estudo, e promissor para o desenvolvimento de drogas antiinflamatórias clinicamente relevantes. Neste contexto, a identificação de pequenas moléculas derivadas de plantas capazes de interferirem seletivamente na produção e / ou função de citocinas pode constituir uma importante alternativa para o tratamento de muitas doenças inflamatórias (CALIXTO et al., 2004).

A matrina, um alcalóide purificado de plantas do gênero *Sophora*, mostrou melhorar a colite induzida por TNBS em camundongos, provavelmente através de um mecanismo terapêutico que pode estar relacionado à redução da produção de TNF- $\alpha$  colônico (CHENG et al., 2005).

Outro composto natural, a Bromelaina, um complexo natural de enzimas proteolíticas derivado do abacaxi mostrou diminuir a severidade das DIIs em modelo de colite em camundongos deficientes de IL-10 (IL-10<sup>-/-</sup>). Porém, embora os resultados com este modelo tenham sido satisfatórios, outros estudos em relação ao mecanismo biológico e identificação de componentes específicos da bromelaina, ou outras proteinases que sejam responsáveis por estes benefícios, ainda são necessários (HALE et al., 2005).

O látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* vem sendo há muito tempo estudado principalmente por suas propriedades angiogênicas e cicatrizantes. Este material mostrou produzir um acentuado aumento na vascularização, epitelização, acelerando o processo de granulação de feridas crônicas de variadas etiologias e

cicatrização completa em tempo mais curto e a um custo menor, quando comparado aos disponíveis no mercado (MRUÉ, 2001; MAURICIO, 2006).

Recentemente, Lamounier (2004) demonstrou que frações cromatográficas obtidas a partir deste látex, em especial a fração denominada FrHbIII, estimulavam a liberação de IL-10 por células leucocitárias, em estudos “*in vitro*”.

Em virtude desta descoberta e de evidências quanto à importância da citocina IL-10 como possível agente modulador das reações inflamatórias intestinais de DIIs, partiu o interesse de estudar a participação da fração FrHbIII na modulação de respostas inflamatórias em modelo experimental de colite em camundongos.

# ***Objetivos***

---

## **2 – OBJETIVOS**

**Geral:** Estudo da atividade anti-inflamatória da fração purificada do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*, em Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) experimental induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) em camundongos.

**Específico:**

- Isolar por cromatografia de troca iônica a fração FrHbIII a partir do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* ;
- Avaliar a produção da citocina IL-10 *in vitro* em cultura de células mononucleares humanas na presença da fração FrHbIII;
- Estudar a atividade anti-inflamatória da fração FrHbIII *in vivo* em modelo experimental de colite em murinos, avaliando:
  - a) sinais clínicos como perda de peso, diarreia e prolapso retal nos animais com DII induzida por TNBS e tratada com a fração FrHbIII via oral;
  - b) análise histopatológica de segmentos do cólon distal dos animais com DII induzida por TNBS e tratada com a fração FrHbIII;
  - c) atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em segmentos do cólon distal dos animais com DII induzida por TNBS e tratada com a fração FrHbIII.

# ***Material e Métodos***

---

### **3 - MATERIAL E MÉTODOS:**

#### **3.1 Obtenção do Látex:**

O látex natural foi extraído de árvores pertencentes a um único seringal, com clones da seringueira *Hevea brasiliensis* (RRhim 600 e GT-1), através de incisões na casca a uma altura de 60 a 90 cm em formato de meia espiral, o que é popularmente conhecido como sangria (Figura 3). Este procedimento ocasiona a exposição de células lactíferas que permitem a drenagem de um líquido de aspecto leitoso, que neste estado denomina-se látex natural. O látex natural é coletado em cubas de plástico fixadas no tronco da árvore, recolhido e adicionado a tambores de 50 L contendo amônia, na concentração final de 0,7%, com o objetivo evitar a autocoagulação. Este material pode ser estocado a 4°C pelo período de até um mês sem adulteração de suas propriedades físico-químicas, assim como de sua atividade biológica.

Durante todo projeto o material foi fornecido pela empresa Agrolatex, situada no município de Mirassol-SP, Brasil.



**Figura 3:** Coleta do Látex: A- Fotografia de um seringal localizado no interior de São Paulo demonstrando a plantação, de forma organizada, das seringueiras; B- Detalhe da incisão, em meia espiral, na casca da seringueira e correto procedimento de coleta do látex.



### **3.2 - Coagulação do látex para obtenção do Soro:**

O látex amoniacal, logo após a chegada no laboratório, foi coagulado pela adição de solução aquosa de ácido acético 2% na proporção 1:2 (v/v). A 500 mL de látex adicionou-se 1000 mL ácido acético 2,2%, sendo a mistura homogenizada e mantida em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. Após coagulação, o látex apresenta duas fases: fase sólida, constituída de borracha (isopropenóides polimerizados), e fase líquida, conhecida como soro. O soro foi extraído por compressão da borracha. A partir de 500 mL de látex natural, extraiu-se com este procedimento aproximadamente 1000 mL de soro.

### **3.3 - Cromatografia em DEAE-celulose:**

Na cromatografia em coluna de DEAE-celulose foi utilizado o tampão volátil bicarbonato de amônio como fase móvel, que foi preparado segundo SAMPAIO *et al.* (1983). Dois litros de hidróxido de amônio foram adicionados em água destilada (1:1 v/v), ambos a temperatura de 4°C. A esta solução, foram adicionados lentamente 12 Kg de gelo seco sob agitação periódica. O pH foi, então, corrigido para 7,8 com hidróxido de amônio. O frasco foi deixado em repouso por aproximadamente 12 horas a 4°C para cristalização do sal. O bicarbonato de amônio assim obtido foi filtrado em funil de placa sinterizada e lavado com álcool etílico destilado. O sal, espalhado sobre papel de filtro foi deixado em capela ventilada até secagem. Depois de seco, o sal foi armazenado em frascos hermeticamente fechados. Com este procedimento, consegue-se um sal com alto grau de pureza.

Para a purificação cromatográfica foi utilizada uma coluna de vidro preenchida com matriz DEAE-celulose (5 cm x 50 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01 M (pH 7,8).

O soro foi diluído em água destilada na proporção de 1:1 (v/v) e teve seu pH corrigido para 9,0 através da adição de NaOH 5,0 M, determinando-se a quantidade de base utilizada para cálculo aproximado da força iônica final, essencial para reprodutibilidade nos procedimentos cromatográficos. O soro diluído foi aplicado à coluna cromatográfica de dimensões 5,0 x 50 cm, à temperatura ambiente, e eluído com tampão bicarbonato de amônio 0,01 M, pH 9,0, em gradiente descontínuo e crescente de cloreto de sódio (0 M; 0,15 M; 0,25 M e 1,5 M) na forma “*step-wise*”. O fluxo empregado foi de 7 mL/min e o eluato monitorado a 280 nm em espectrofotômetro (Hitachi® U-2000). As frações foram coletadas na razão de 30 mL por tubo, com auxílio de um coletor (Gilson®). A cada adição das diferentes concentrações de cloreto de sódio, obteve-se: 1º pico (FrHbI) a 0,15 M, 2º pico (FrHbII) a 0,25 M e 3º pico (FrHbIII) a 1,5 M. O material, de acordo com o perfil cromatográfico, teve seus respectivos picos característicos reunidos e submetidos à diálise contra água destilada, liofilizados e armazenados a -20° C, para posterior análise de atividade biológica. Como foi anteriormente observado que o pico FrHbIII obtido nesta cromatografia tem a capacidade de promover a liberação de interleucina 10 (IL-10) em culturas de células mononucleares de sangue periférico (PMBC), o mesmo foi submetido a ensaios de avaliação de atividade anti-inflamatória em modelo “*in vivo*”.

### **3.4 – Cultura de células mononucleares do sangue periférico:**

#### **3.4.1 - Coleta de sangue periférico**

A coleta de sangue foi feita em doadores voluntários após esclarecimento dos objetivos do estudo e autorização por escrito (Anexo 8.2).

Foram coletadas amostras de 15 mL de sangue venoso de cada doador, obtida pela punção da veia braquial através do sistema Vacutainer heparinizado e siliconizado, após assepsia com álcool iodado, coletando-se 3 frascos, com 5,0 mL de sangue cada um.

#### **3.4.2 - Obtenção das células**

Para a separação das células mononucleares, o sangue coletado foi imediatamente diluído com o mesmo volume de meio de cultura (RPMI 1640, Sigma®) e a solução obtida colocada sobre o gradiente de Hystopaque (Ficoll – Paque plus, Amershan Biosciences®, GE). Tais células foram cultivadas seguindo o protocolo previamente estabelecido pelo Laboratório de Cultura de células da Prof. Dra. Norma T. Foss, da divisão de Dermatologia do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP.

O método foi desenvolvido sob condições de esterilidade, utilizando-se câmara de fluxo laminar. Foram pipetados 10 mL de sangue diluído lenta e cuidadosamente em um tubo de polipropileno de 5 mL, contendo 3 mL de Hystopaque. O preparado foi centrifugado a 400 x g durante 30 minutos para a formação de 4 camadas distintas: *superior*, contendo plasma, meio de cultura RPMI e plaquetas; *interface*, contendo células mononucleares; *média*, gradiente Ficoll-Hipaque®; e *inferior*, granulócitos e hemácias. A camada de células mononucleares

foi ressuspensa em 10 mL de solução salina isotônica e centrifugada a 350 x g durante 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se o processo 2 vezes. O pellet foi ressuspensa em 1,0 mL de meio de cultura. Após a avaliação da viabilidade das células mononucleares, com solução de azul de Trypan a 0.2%, procedeu-se a contagem das células em microscópio óptico com auxílio de uma câmara de Neubauer, seguindo a diluição 1:20 (v/v) em corante Turk (lisa hemácias e cora os glóbulos brancos para facilitar a contagem). As células encontradas nos 4 quadrantes foram somadas, multiplicadas por 50 ( $\text{mm}^3$ ) e, posteriormente, multiplicadas por 1000 para cálculo de células por mL. A suspensão de células foi diluída em meio de cultura enriquecido com 10% de soro bovino fetal (SBF) para obtenção de uma concentração de  $2,5 \times 10^6$  células/mL.

### **3.4.3 – Metodologia Quantitativa – ELISA**

Para a quantificação da citocina IL-10 foi utilizado o ensaio imunoenzimático ELISA.

Foram utilizadas placas de cultura de 96 poços (Costar®) esterilizadas por radiação  $\gamma$ , sendo as culturas de células mononucleares preparadas na concentração de  $1,5 \times 10^6$  células/mL contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) por poço. Culturas celulares contendo somente meio de cultura foram feitas para o controle de proliferação celular espontânea (Basal), e duplicatas contendo meio de cultura e 100  $\mu\text{L}$  do mitógeno Concanavalina A ( 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  – Sigma®) foram feitas para controle de estímulo à proliferação.

Foram realizadas diluições seriadas (1:10 v/v) da fração FrHbIII obtida a partir da cromatografia do látex em DEAE-celulose, esterilizada por filtração em filtros de 0,23  $\mu\text{m}$ , em meio de cultura estéril RPMI, de modo a se obter as concentrações de

150 µg/mL, 15 µg/mL e 1,5 µg/mL. As respectivas diluições (150 à 1,5 µg/mL) da fração FrHbIII foram adicionadas em volume de 100 µL nos poços correspondentes. As placas foram então acondicionadas em estufa de cultura de células automática, com atmosfera úmida com CO<sub>2</sub> 5%, a 37°C durante 72 horas. Após o período de incubação, os sobrenadantes destas culturas foram coletados com pipeta automática estéril e armazenados em microtubos a -20°C para posterior dosagem da citocina IL-10.

Os sobrenadantes das culturas de células mononucleares foram descongelados à temperatura ambiente, centrifugados a 1200 rpm durante 1 minuto para a remoção de possíveis partículas cristalizadas e as amostras diluídas (10 vezes) para a dosagem de IL-10 no momento do experimento.

### **3.4.4 - Preparo da curva padrão de IL-10**

A curva padrão foi obtida partindo-se de diluições seriadas de IL-10 (kit BD OptEIA™ Set Human IL-10, BD Biosciences Pharmingen – USA) nas concentrações de: 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6 e 7,8 pg/mL. O diluente, sem IL-10, foi utilizado como concentração padrão zero (pg/mL). Foi utilizada uma placa de 96 poços (Costar®), utilizando-se a coluna 1 da placa para a curva padrão. Após a diluição do Anticorpo de captura (clone JES3.19F1. Isotype: Rat IgG2a) purificado (1 µL/mL) para IL-10, adicionou-se 50 µL da solução por poço, seguindo um período de incubação de 16 horas a 4°C. A placa foi retornada à temperatura ambiente e foram adicionados 200 µL do tampão de bloqueio por poço, incubando-se novamente durante 2 horas nesta mesma temperatura. Cada poço foi aspirado e lavado por 4 vezes. Adicionou-se as diluições seriadas do padrão IL-10 na coluna 1, as suspensões de células cultivadas com ConA na coluna 2, e os sobrenadantes

obtidos da cultura diluídos em tampão nas outras colunas, utilizando-se 100 µL por poço. A placa foi incubada durante 16 horas a 4°C. Seguiu-se o procedimento de lavagem da placa por 5 vezes. Foram adicionados 100 µL do Ac de detecção (anti IL-10) biotilado (1 µg/mL – Clone JES3.12G8. Isotype: Rat IgG2a) em tampão de bloqueio Tween e a placa foi incubada durante 1 hora em temperatura ambiente. O procedimento de lavagem foi repetido por mais 5 vezes. Foram colocados 100 µL de HRP (enzima-conjugado) diluído 1000 vezes incubando a placa por 30 minutos em temperatura ambiente. O procedimento de lavagem foi, novamente, repetido por 5 vezes. Foram adicionados 100 µL do reagente colorido o-phenylenediamine/Sigma® (OPD) diluído em tampão próprio sob a proteção da luz, e a placa foi incubada durante 10 minutos. Foram colocados 50 µL de solução “stop” (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 16%) em cada poço para interromper a reação, obedecendo a mesma seqüência de colocação da solução substrato. A densidade ótica foi determinada nos 30 minutos decorrentes, em comprimento de onda de 490 nm utilizando-se leitor de ELISA (Titertek Multiskan MCC/340). Todo o experimento foi feito em duplicata.

### **3.5 – Avaliação de atividade anti-inflamatória utilizando modelo de colite experimental em camundongos:**

#### **3.5.1 - Animais de experimentação**

Foram utilizados camundongos Balb-c, fêmeas, com idade aproximada de 2 a 4 meses, fornecidos pelo biotério central do Campus da USP – Ribeirão Preto, mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Os animais foram divididos em 4 grupos, contendo 10 animais cada: *Controle* (C): composto por animais que receberam administração

do veículo álcool etílico 50% via retal e 0,5 mL água administrada por gavagem, com auxílio de uma cânula PE 10 acoplada a uma seringa de 1,0 mL, via oral; *Controle (C) + FrHbIII*: composto por animais que receberam o veículo álcool etílico 50% via intra-retal e tratamento com FrHbIII (5,0 mg/Kg), diluídos em 0,5 mL de água via oral; *TNBS*: composto por animais que receberam administração de TNBS diluído em álcool etílico 50% via retal e 0,5 mL de água via oral; e *TNBS + FrHbIII*: composto por animais que receberam administração de TNBS diluído em álcool etílico 50% via retal igualmente ao TNBS, mas submetidos a tratamento com FrHbIII (5,0 mg/Kg), diluídos em 0,5 mL de água via oral. Os camundongos foram mantidos dentro dos padrões normais de temperatura, umidade e ciclo de claro/escuro (12h/12h), com livre acesso à ração e água “*ad libitum*”. Todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela *Comissão de Ética em Experimentação Animal* da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, sob o protocolo de número 135/2006 (anexo 8.1).

### **3.5.2 - Indução da colite**

A colite foi induzida de acordo com o método previamente descrito por NEURATH et al. (1995), com modificações. Os camundongos foram desprovidos de alimentação 12 h antes do experimento, recebendo apenas água *ad libitum*. Para indução da colite os animais foram previamente anestesiados com uma solução contendo: Ketamin – S(+) (50 mg/mL, Cristália®) e Dopaser (xilazina 20mg/mL, Calier®), dose 400 µL/20g animal, via intraperitoneal. Nos Grupos TNBS e TNBS + FrHbIII a colite foi induzida através de vagarosa administração via retal de 5,0 mg de TNBS em 0,1 mL de álcool etílico 50%, com auxílio de uma cânula de silicone adaptada em uma seringa de 1,0 mL, de modo que a extremidade da cânula ficasse

posicionada a cerca de 4 cm do ânus. Os Grupos Controle e Controle (C) + FrHbIII receberam, como descrito acima, apenas administração via retal de 0,1 mL do veículo álcool etílico 50%. Os animais foram então mantidos em posição vertical cerca de 2 minutos e retornados à suas caixas. Duas horas após a indução da colite e, diariamente durante 5 dias, os animais dos grupos C + FrHbIII e TNBS + FrHbIII receberam administração via oral, de 5 mg/Kg da fração FrHbIII diluídas em 0,5 mL de água por gavagem. Os animais dos Grupos Controle e TNBS receberam 0,5 mL de água via oral.

### **3.5.3 - Monitoramento dos animais**

Para verificar se a administração da fração FrHbIII após a indução da colite levaria a alterações clínicas, os animais de todos os grupos foram pesados com o auxílio de uma balança eletrônica (Toledo®) e visualmente inspecionados, diariamente, para verificação de diarreia e prolapso retal. A porcentagem de variação de peso no quinto dia foi calculada individualmente para cada animal, e posteriormente para cada grupo, em relação ao peso no dia 0 (dia da indução da colite).

### **3.5.4 - Análise histopatológica**

Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram seus intestinos excisados cirurgicamente, sendo seccionado cerca de 2,0 cm do cólon distal de cada animal. Para a avaliação do processo inflamatório, as peças foram fixadas em formalina tamponada 10%, incluídas em parafina, seccionadas e coradas por hematoxilina-eosina (HE). A análise histológica das secções foi feita através do uso de um microscópio óptico (Nikon Eclipse E800; Nikon Inc, Melville,



NY), com aumentos de 40, 100 e 200 X. A aquisição das imagens foi realizada por uma câmera digital (Nikon DXM1200; Nikon Inc, Melville, NY).

### **3.5.5 - Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase**

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), um indicador do acúmulo de leucócitos polimorfonucleares, foi determinada de acordo com método previamente descrito por BRADLEY et al. (1982), com modificações. Brevemente, um segmento de aproximadamente 50 mg de tecido do cólon distal de cada animal, de cada um dos grupos de animais, foi retirado, lavado com salina gelada, seccionado em pequenos fragmentos e congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente os fragmentos foram homogeneizados em 5,0 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,4, gelado, com auxílio de um polytron (KINEMATICA AG) 3 vezes durante 30 segundos em cada ciclo. Os homogenatos foram submetidos à centrifugação (SORVAL RC-5B) durante 30 minutos a  $12000 \times g$  e  $4^{\circ}\text{C}$ . Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram ressuspensos em 1,0 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 6,0, contendo brometo de hexadecil trimetil amônio (HTABr) 0,5% (p/v). As suspensões foram submetidas a um rápido ciclo de congelamento ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) e descongelamento ( $25^{\circ}\text{C}$ ), seguido de sonicação com auxílio de um sonicador (Vibra Cell®) por 15 segundos cada ciclo. As amostras foram centrifugadas (EPPENDORF CENTRIFUGUE 5417R CE) durante 20 minutos a  $14000 \times g$  e  $4^{\circ}\text{C}$ . Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Uma alíquota de 0,1 mL do sobrenadante de cada amostra foi adicionado a 2,9 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 6,0, contendo O-dianisidina hidrocloreto (O-da) (0,167 mg/mL) e peróxido de hidrogênio (0,0005% v/v), e a atividade da MPO das amostras avaliada através da leitura em espectrofômetro

(Hitachi® U-2000) a 460 nm e 25°C. A mudança na absorvância foi registrada em intervalos de 30 segundos durante 3 minutos. Uma unidade (U) da atividade específica da MPO é dada pela degradação de 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sup>-</sup> pela enzima por minuto a 25°C, e o valor final da atividade da MPO expressa em unidade por grama de tecido úmido (U/g). O cálculo desta atividade é feito da seguinte maneira: Atividade MPO (U/g) = (A<sub>460</sub>) x 13,5 / tecido úmido (em gramas), no qual A<sub>460</sub> é a variação de absorvância à 460 nm entre 1 a 3 minutos após o início da reação. O coeficiente 13,5 foi determinado empiricamente de forma que 1 unidade (U) de atividade de MPO representa a quantidade de enzima que reduzirá 1 µmol de peróxido por minuto.

### **3.6 – Análise Estatística:**

Os dados de avaliação da diferença dos processos de inflamação intestinal entre os grupos experimentais e controle, foram feitos através da Análise de variância “ANOVA one-way” (método de Dunnett's). A avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase foi feita através da Análise de variância ANOVA seguindo “Bonferroni's test”. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando p < 0,05.

# ***Resultados***

---

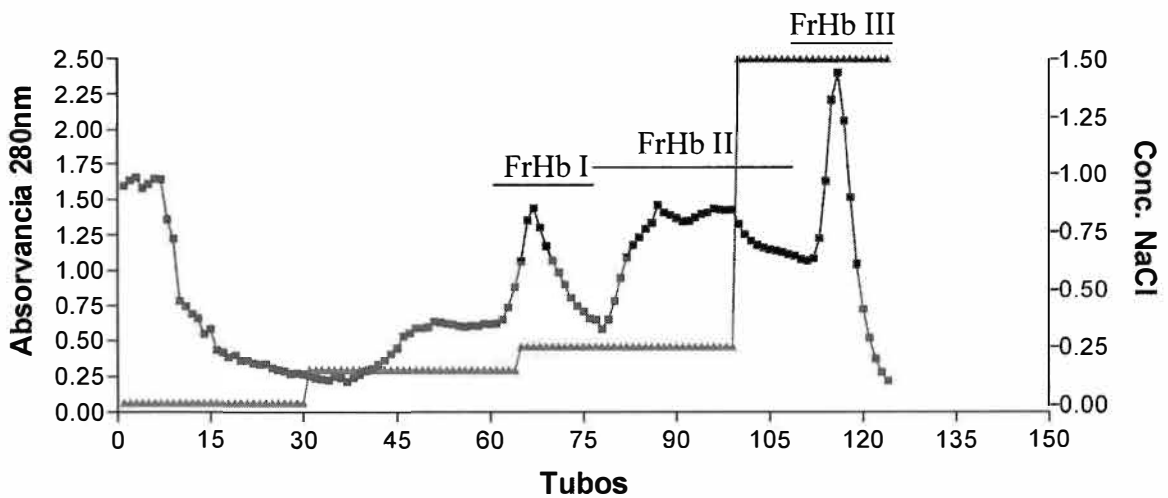
## **4 - RESULTADOS:**

### **4.1- Cromatografia em DEAE-celulose:**

Em uma primeira etapa de purificação do material extraído do látex (soro), foi utilizada cromatografia em resina de DEAE-celulose. Esta resina possui a característica de comportar-se como uma trocadora aniônica. A interação depende do potencial eletrocinético da molécula no meio, que é dado pela relação carga/superfície da molécula. Outra característica importante desta resina é sua alta capacidade de processamento de material.

O soro extraído do látex natural amoniacal, da seringueira *Hevea brasiliensis*, teve a quantidade de proteínas determinada pelo método de LOWRY (1951) modificado por HARTREE (1972), sendo a concentração média das proteínas das preparações, de 0,36 mg/mL, correspondendo a um total de 720 mg de proteína total aplicado na coluna (2 L de soro).

Após completa eluição do material e acompanhamento do perfil por leitura espectrofotométrica da absorvância no comprimento de onda ( $\lambda=280$  nm), obteve-se o seguinte perfil cromatográfico:



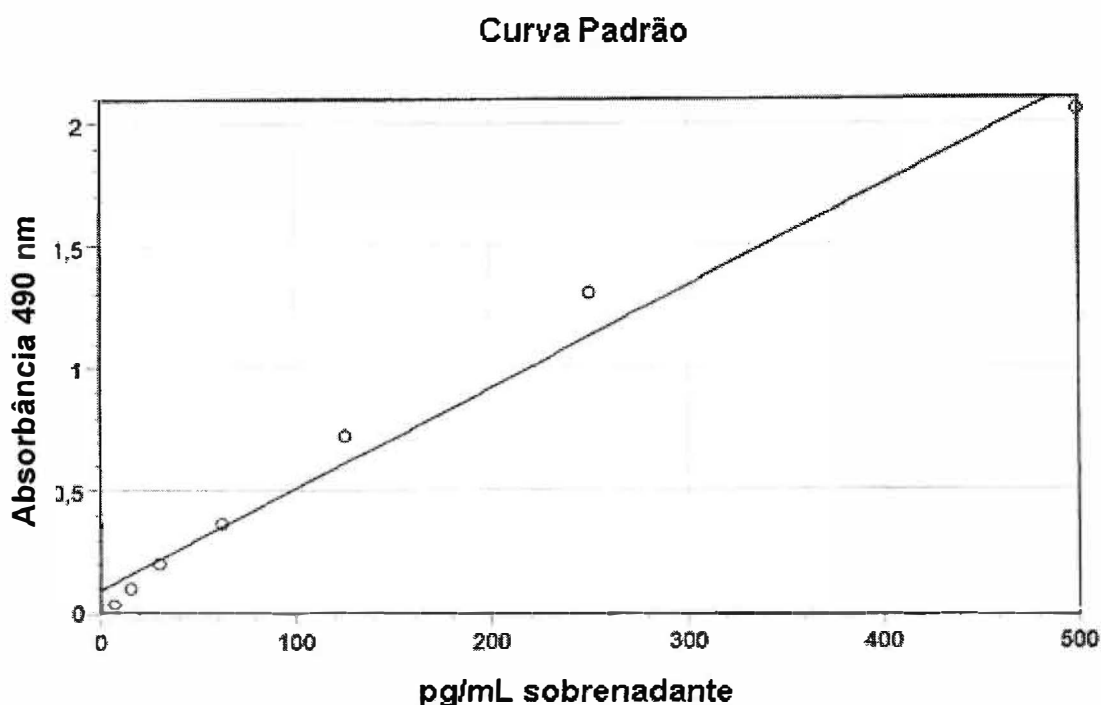
**Figura 4:** Perfil cromatográfico de 2L de soro do látex pH 9,0, aplicados em coluna DEAE-celulose (5,0 X 50,0cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01M, pH 9,0. A eluição foi realizada em gradiente descontínuo e crescente de cloreto de sódio (0; 0,15; 0,25 e 1,5 M) empregando-se um fluxo de 7 ml/min. O eluato foi monitorado em  $\lambda=280$  nm. As frações foram designadas de FrHb I, FrHb II e FrHb III.

A fração FrHbIII foi dialisada contra água destilada, liofilizada e armazenada à  $-20^{\circ}$  C para posterior análise de atividade biológica.

**4.2 – Produção de citocina IL-10 na presença da fração FrHbIII:**

As células de dois doadores voluntários sadios foram cultivadas na presença da fração cromatográfica do látex FrHbIII nas concentrações crescentes de 1,5 µg/mL, 15 µg/mL e 150 µg/mL.

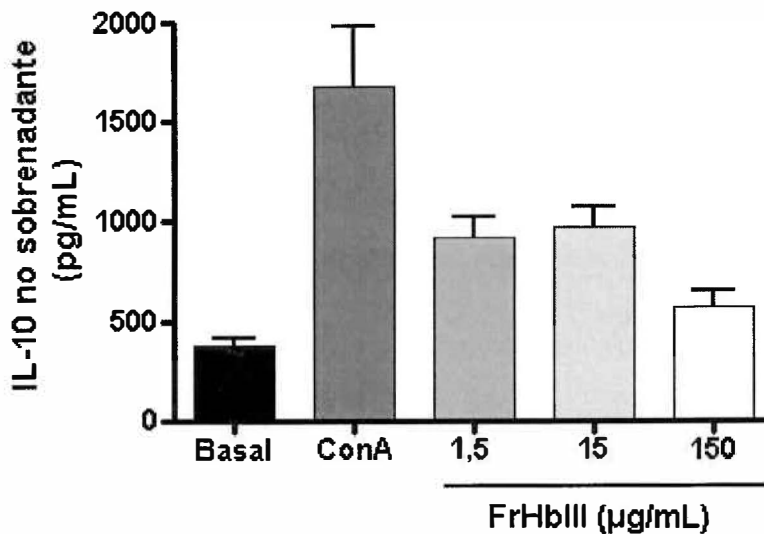
A Figura 5 representa a curva padrão da quantificação de IL-10 por ELISA nas condições experimentais descritas em Material e Métodos.



**Figura 5:** Curva padrão de dosagem da citocina IL-10. Esta curva padrão foi obtida através de diluições seriadas da citocina IL-10 nas concentrações de: 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6 e 7,8 pg/mL. O diluente, sem IL-10, foi utilizado como concentração padrão zero (pg/mL).

A Figura 6 mostra a quantificação da citocina IL-10 nos sobrenadantes obtidos das culturas de células mononucleares do sangue periférico, em condição basal (sem estímulo), estimuladas por Concaivalina A, e tratadas com a fração FrHbIII.

Os valores de IL-10 produzidos nas culturas dos doadores estão representados nas Tabelas do Anexo 8.2. Os dados desta tabela estão representados no gráfico a seguir:



**Figura 6:** Níveis de IL-10 (pg/mL) nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares cultivadas somente na presença do meio de cultura (Basal), na presença do meio de cultura com adição de Concaivalina A (50µg/mL), e na presença do meio de cultura com adição da fração cromatográfica do látex FrHbIII ( $p < 0,05$ ).

Observa-se na Figura 6, que a presença da fração cromatográfica do látex FrHbIII, induziu significativamente a liberação da citocina IL-10 (pg/mL;  $p < 0,05$ ) nas concentrações 1,5 e 15  $\mu\text{g/mL}$  em relação à liberação basal. Uma diminuição significativa da liberação na concentração 150  $\mu\text{g/mL}$  pode ser observada.

Os resultados da quantificação da citocina IL-10 expostos referem-se a uma projeção inicial baseada na avaliação desta citocina nas diferentes concentrações da fração FrHbIII. Os níveis de produção da citocina IL-10 foram comparados sob o ponto de atividade específica, que refere-se à capacidade do material testado de liberar a citocina levando-se em consideração a concentração do mesmo.

### **4.3 – Avaliação de atividade anti-inflamatória:**

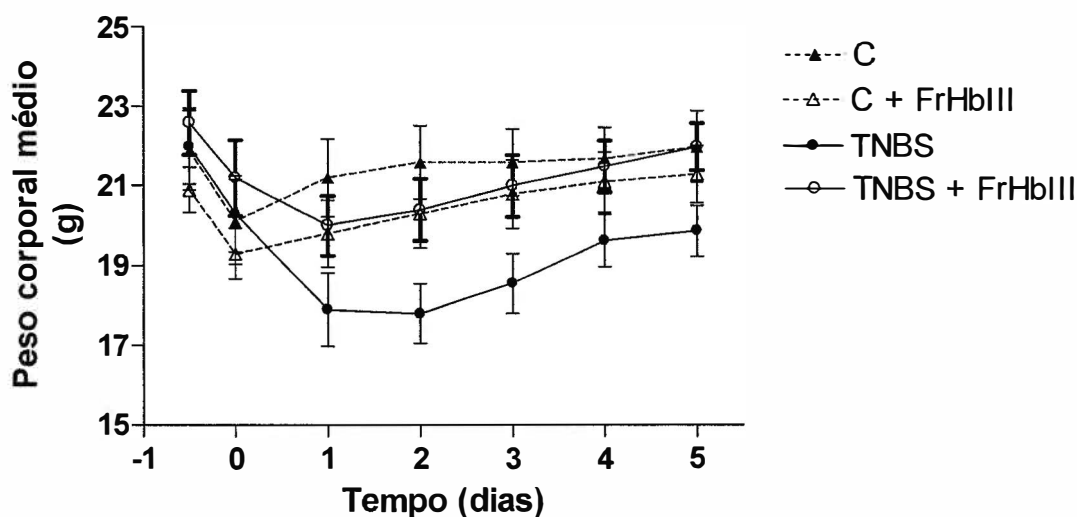
A avaliação da atividade anti-inflamatória da fração FrHbIII foi testada em modelo pré-estabelecido de colite em camundongos, através da administração de TNBS diluído em álcool etílico 50%. O álcool etílico age rompendo a barreira epitelial da superfície mucosa enquanto que o TNBS age como um hapteno, ou seja, os produtos da reação do TNBS com as proteínas da mucosa intestinal, atuam como antígenos estranhos ao organismo, os quais produzem uma reação inflamatória mediada principalmente pelas citocinas IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

Durante o desenvolvimento de processos inflamatórios intestinais, parâmetros clínicos como perda de peso, ocorrência de diarreia e prolapso retal constituem pontos críticos a serem avaliados como uma das formas de se estabelecer o diagnóstico e, principalmente, acompanhar os tratamentos destas

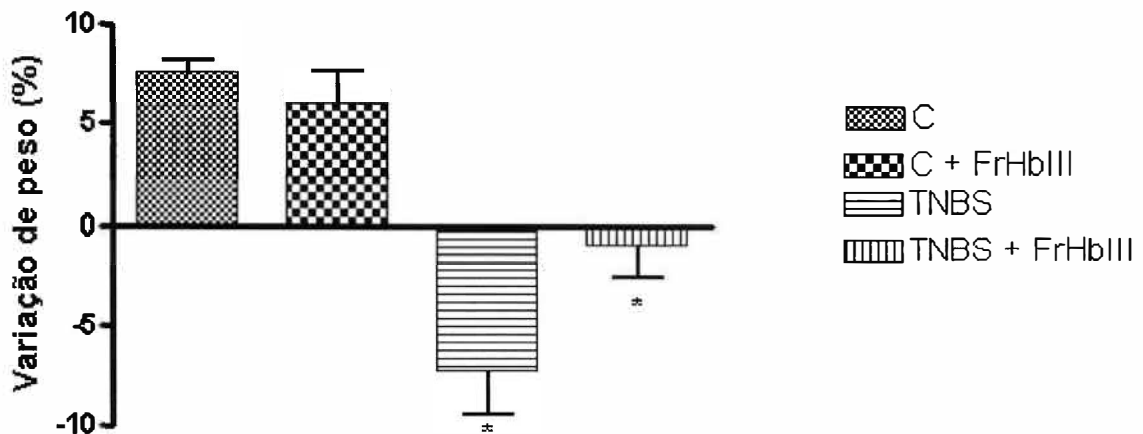


patologias. Os resultados observados nos animais durante os 5 dias de tratamento estão representados nos gráficos a seguir:

a) Variação do peso após indução de colite: a Figura 7 mostra a variação do peso obtido diariamente dos animais dos grupos Controle, Controle tratado com a fração FrHbIII, TNBS e TNBS tratado com a fração FrHbIII.



**Figura 7:** Variação de peso do grupo de animais controle (C e C + FrHbIII), após indução de colite (TNBS), e tratados via oral com a fração FrHbIII (TNBS + FrHbIII). A variação de peso indicada entre o período -1 e 0 corresponde ao período de jejum a que os animais são submetidos antes do experimento (12 h). O tratamento do grupo C, C + FrHbIII, TNBS e TNBS + FrHbIII iniciou-se no dia 0. O gráfico representa a média  $\pm$  EPM do aumento ou perda de peso que foi monitorado diariamente. (n = 10 animais / grupo)

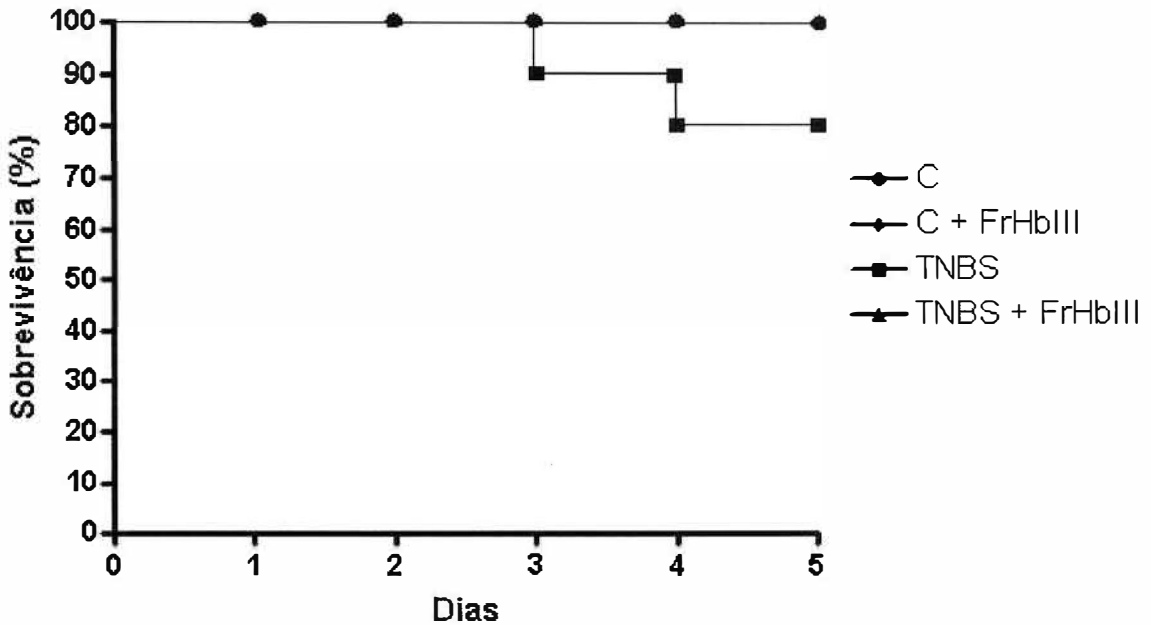


**Figura 8:** Variação de peso em porcentagem (%) após indução de colite (dia 0) e o 5º dia de tratamento com a fração FrHbIII. O gráfico representa a média  $\pm$  EPM do aumento ou perda de peso, verificado diariamente, durante os 5 dias de tratamento, comparando ao dia 0. ( $P < 0,01$ ).  
\*  $P = 0,01$  comparado ao grupo TNBS. ( $n = 10$  animais / grupo)

As mudanças de peso individuais dos animais de cada grupo foram registradas diariamente. Como mostrado nas Figuras 7 e 8, o grupo controle que recebeu administração apenas de álcool etílico 50% ganhou peso corporal. Os animais do grupo TNBS - que receberam apenas administração de água por via oral - perderam peso corporal gradualmente nos primeiros dois dias após a indução da colite, e passaram a recuperar gradualmente o peso a partir do terceiro dia, porém, ao final do quinto dia de experimento, ainda não haviam recuperado o peso inicial correspondente ao dia do experimento (dia 0). Por outro lado, os animais do grupo TNBS + FrHbIII - que receberam tratamento via oral com a fração FrHbIII (5 mg/kg) - perderam peso corporal apenas no primeiro dia após a

indução da colite, recuperando o peso gradualmente a ponto de atingir o peso inicial correspondente ao dia 0, aproximando-se do peso observado no período de 12 h que antecedem o experimento (período de jejum). Os animais do grupo C e C + FrHbIII ganharam peso corporal gradualmente durante todo o período de experimento, atingindo o peso corporal médio observado do período antecedente ao jejum. Na Figura 8, está representada a variação do peso corporal obtida durante os 5 dias de experimento, em relação ao dia 0. Observa-se um aumento de peso significativo dos animais do grupo controle (C) e controle tratados com a fração FrHbIII (C + FrHbIII), sem diferença significativa entre os grupos, e diminuição significativa do peso corporal dos animais que foram submetidos à indução de colite por TNBS ( $p \leq 0,01$ ) em relação aos animais dos grupos controles. Porém, observa-se que o grupo que foi induzido à colite por administração de TNBS e que receberam tratamento via oral com a fração FrHbIII, embora tenham apresentado perda de peso significativamente maior durante os 5 dias de experimento, em relação aos grupos controle ( $p \leq 0,01$ ), mostraram recuperação de peso expressiva, quando comparados ao grupo TNBS ( $p=0,01$ ).

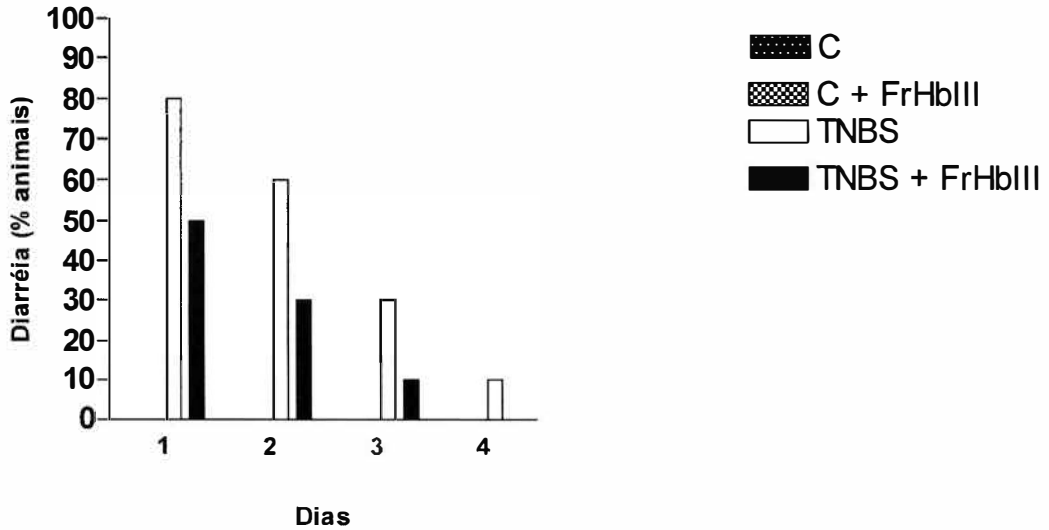
b) taxa de sobrevivência:



**Figura 9:** Taxa de sobrevivência dos animais após indução de colite por TNBS e tratamento com a fração FrHbIII.

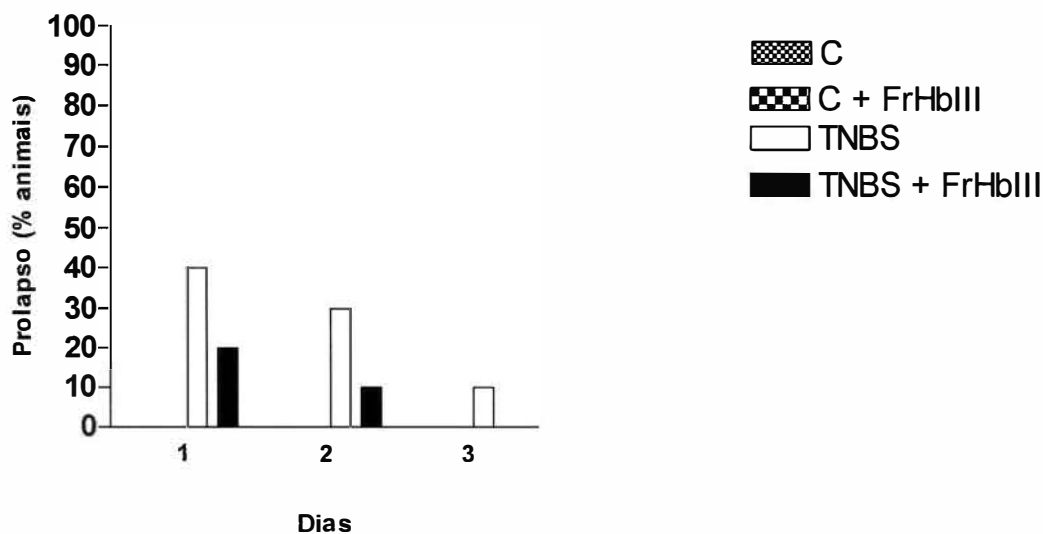
Podemos observar pela figura 9 que a indução de colite pela administração de solução de TNBS resultou em um índice de até 20% de mortalidade no grupo TNBS após 5 dias de experimento. No entanto, o grupo que recebeu tratamento com a fração FrHbIII após indução da colite, apresentou índice zero de mortalidade, assim como ocorreu nos grupos C e C + FrHbIII.

c) diarreia:



**Figura 10:** Porcentagem de animais que apresentaram diarreia durante o período de experimento. Os animais do grupo C receberam administração de álcool etílico 50% via retal e água via oral, os animais do grupo C + FrHbIII receberam administração de álcool etílico 50% via retal e a fração FrHbIII diluída em água, via oral, os animais do grupo TNBS receberam administração de TNBS diluído em álcool etílico 50% via retal e água via oral, e os animais do grupo TNBS + FrHbIII receberam administração de TNBS diluído em álcool etílico 50% via retal e tratamento com a fração FrHbIII diluída em água via oral.

d) prolapso retal:



**Figura 11:** Porcentagem de animais que apresentaram prolapso retal durante o período de experimento. Os animais do grupo C receberam administração de álcool etílico 50% via retal e água via oral, os animais do grupo C + FrHbIII receberam administração de álcool etílico 50% via retal e a fração FrHbIII diluída em água, via oral, os animais do grupo TNBS receberam administração de TNBS diluído em álcool etílico 50% via retal e água via oral, e os animais do grupo TNBS + FrHbIII receberam administração de TNBS diluído em álcool etílico 50% via retal e tratamento com a fração FrHbIII diluída em água via oral.

Ao avaliar os animais que foram submetidos à indução de colite (Grupo TNBS), observamos que estes desenvolveram diarreia severa (Figura 10) e prolapso retal (Figura 11) em escala significativamente maior que os animais que receberam tratamento com a fração FrHbIII (Grupo TNBS + FrHbIII). Não foi observado ocorrência de diarreia e prolapso retal nos grupos Controle e C + FrHbIII.

### **4.4 – Análise histopatológica de segmentos intestinais referentes ao cólon distal de animais induzidos à colite e tratados com a fração FrHbIII:**

Para determinarmos se as alterações clínicas (diarréia, prolapso retal e perda de peso) observadas nos animais dos grupos TNBS e TNBS + FrHbIII estariam relacionadas à alguma alteração histopatológica, ou até mesmo a danos teciduais no intestino dos animais analisados, segmentos do cólon distal foram seccionados, fixados e processados para análise histológica.

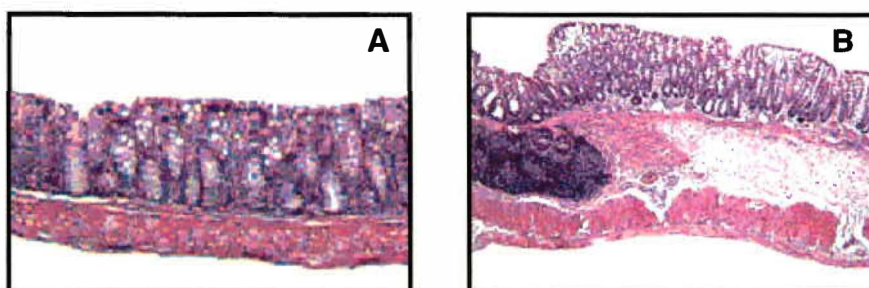
Pode-se observar na Figura 13 que o cólon dos animais do grupo controle (C), bem como do grupo controle tratado com a fração FrHbIII (C + FrHbIII) apresentou aspecto histológico compatível com a normalidade, mostrando um epitélio com grande número de criptas dispostas lado a lado e extremamente ricas em células caliciformes. Lâmina própria com aspecto normal e sem pigmentos de hemossiderina visíveis. Na base das criptas está a lâmina muscular da mucosa, seguida da submucosa, ambas sem sinais de inflamação. Logo abaixo vê-se os estratos circular e longitudinal das túnica musculares e finalmente a capa serosa, todas elas com aspectos histológicos correspondentes à normalidade.

Já o cólon do grupo TNBS apresentou imensas alterações histológicas em suas diversas camadas (Figuras 12 e 13), como extenso edema da submucosa, desorganização geral das criptas com pontos onde foram quase totalmente destruídas. Há uma nítida redução das células caliciformes e intensa infiltração de células inflamatórias na mucosa e submucosa, distinguindo-se facilmente a infiltração de leucócitos polimorfonucleares. Em alguns pontos a muscular da mucosa é descontínua, ocorrendo uma intensa infiltração de linfócitos, que se estende até às camadas musculares. Nota-se aumento do número de vasos e

áreas nitidamente hemorrágicas. Ulcerações ocorrem por toda a submucosa, estendendo-se às camadas musculares e, em alguns locais, atingindo inclusive a capa serosa. Em síntese, tem-se uma severa colite caracterizada por destruição de criptas, redução das células caliciformes, extenso edema, focos de ulceração hemorrágica, intensa e difusa infiltração de neutrófilos e linfócitos na mucosa e submucosa, e necrose focal dos estratos musculares.

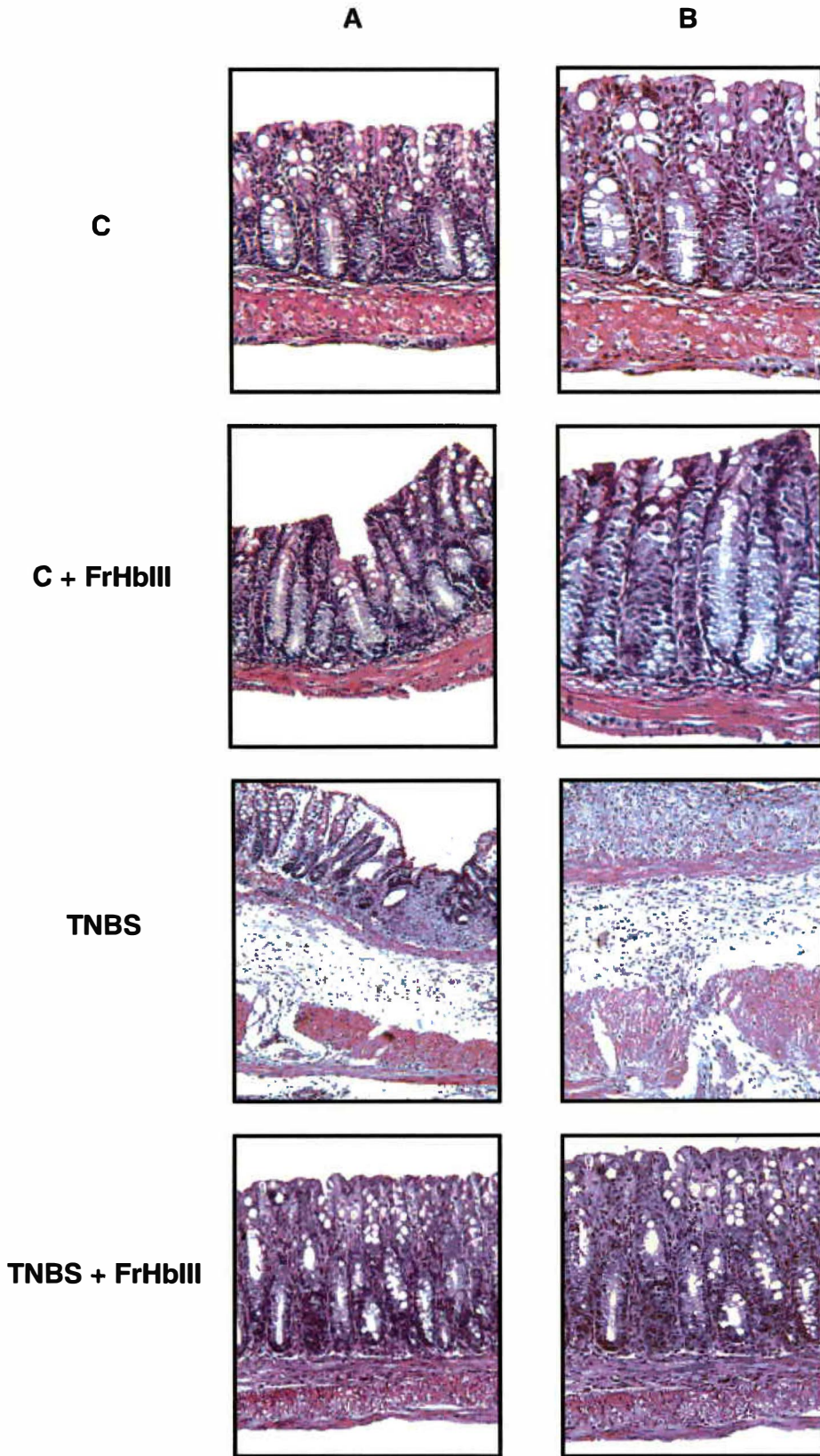
No entanto, a análise histopatológica do cólon dos animais do grupo TNBS + FrHbIII (Figura 13) é possível observar que o tratamento com a fração FrHbIII (5 mg/kg) reduziu de forma significativa a extensão e a severidade das alterações histológicas descritas no grupo TNBS. Ainda que seja possível notar discreta quantidade de leucócitos polimorfonucleares infiltrados, indicando persistência de características inflamatórias no cólon, as criptas estão bem preservadas e o número de células caliciformes é igual ou muito próximo à normalidade. Não são observadas úlceras e as capas musculares estão íntegras e aparentemente sem alterações (Figuras 12 e 13).





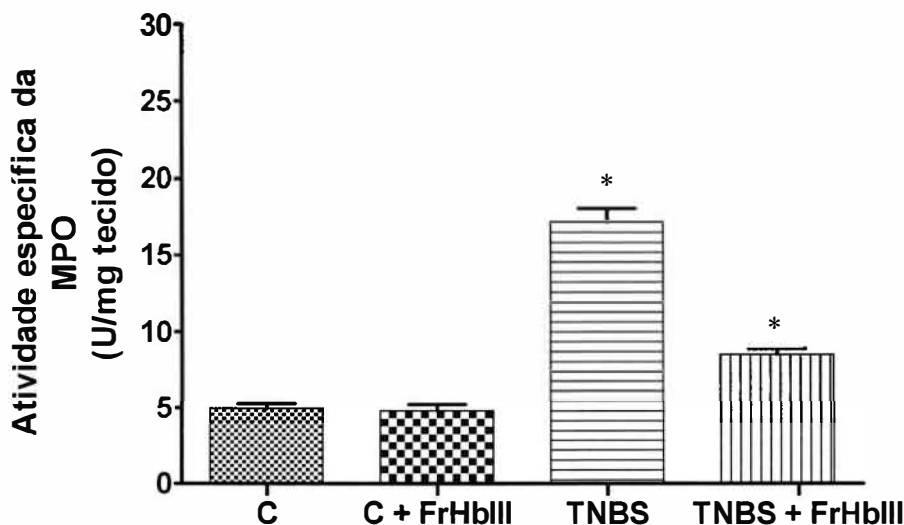
**Figura 12:** Alterações histológicas encontradas no cólon do grupo TNBS em relação ao grupo controle, corados por HE. Grupo controle (A) recebeu apenas administração via intra retal de álcool etílico 50%. Grupo TNBS (B) recebeu administração via intra retal de álcool etílico 50% e ácido trinitrobenzeno sulfônico. Observa-se profundas alterações estruturais causadas pela indução da colite no grupo B, com espessamento da parede do cólon, presença de infiltrado inflamatório, edema e deformidade das paredes intestinais. Aumento original: 40X.

**Figura 13:** Análise histológica do cólon dos animais com colite induzida por TNBS, tratados com a fração FrHbIII, em relação aos grupos controles. Grupo controle (C), recebeu administração via intra retal de álcool etílico 50%. Grupo controle tratado com fração FrHbIII (5mg/kg) (C + FrHbIII) recebeu administração via intra retal de álcool 50% e tratamento diário com a fração FrHbIII via oral. Grupo TNBS (TNBS) recebeu administração via intra retal de álcool 50% e ácido trinitrobenzeno sulfônico. Grupo TNBS tratado com fração FrHbIII (5 mg/kg) (TNBS + FrHbIII) recebeu administração via intra retal de álcool 50% ácido trinitrobenzeno sulfônico e tratamento diário com a fração FrHbIII via oral. Observa-se grande melhoria quanto à reação inflamatória e preservação dos tecidos do grupo TNBS + FrHbIII em relação ao grupo FrHbIII em relação ao grupo TNBS, apresentando características histológicas muito próximas à normalidade (grupo C). Aumento original: 100X (A) e 200X (B).



**4.5 – Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidas (MPO):**

A enzima mieloperoxidase (MPO) está expressa em altos níveis em leucócitos polimorfonucleares. O acúmulo destas células na região de uma lesão é uma característica de processo inflamatório, e a quantificação da enzima MPO é usada para estimar a intensidade do infiltrado inflamatório presente em tecidos lesionados. Na Figura 14, observa-se a variação da atividade da enzima mieloperoxidase, quantificada no 6º dia de experimento (dia 5), em segmentos do cólon dos animais dos grupos experimentais.



**Figura 14:** Variação média de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) entre os grupos ao final do experimento (5º dia após indução da colite).  $p < 0,01$ . \*  $p < 0,01$  comparado ao grupo TNBS.

Ao avaliarmos a atividade específica da enzima mieloperoxidase (MPO), observamos que esta foi significativa ( $p < 0,01$ ) e cerca de quatro vezes maior no grupo TNBS em relação aos grupos C e C + FrHbIII, indicando grande quantidade de infiltrado inflamatório agudo. No entanto, o grupo que recebeu tratamento com a fração FrHbIII após indução da colite (TNBS + FrHbIII) apresentaram redução significativa da atividade da MPO em relação ao grupo TNBS, indicando efetividade do tratamento, e um breve aumento da atividade significativo ( $p < 0,01$ ) quando comparado aos grupos controles, indicando presença de infiltrado inflamatório, mas de pequena monta. Estes dados podem ser corroborados na Figura 13, na qual observa-se intensa presença de infiltrado inflamatório nos cortes histológicos dos cólons dos animais em que a colite foi induzida pela administração de TNBS, em contraste com a leve presença de infiltrado inflamatório nos cortes histológicos dos animais do grupo em que a colite foi induzida por TNBS e receberam tratamento com a fração FrHbIII via oral.

# ***Discussão***

---

## 5 - DISCUSSÃO

Os estudos em relação à patogênese das DIIs e os possíveis agentes terapêuticos para o tratamento destas doenças têm sido de grande importância nas últimas décadas. É dado que a severidade do processo inflamatório intestinal pode ser conseqüência da diminuição dos mecanismos regulatórios envolvidos na homeostase da mucosa intestinal, e muitos destes processos têm sido atribuídos à deficiência da produção de uma das principais citocinas envolvidas na regulação de respostas inflamatórias do organismo, a IL-10. A importância desta citocina na regulação da imunidade da mucosa intestinal tem sido demonstrada pelo desenvolvimento de DII em camundongos com deficiência de IL-10 (FIOCCHI, 1998). Dados os potentes efeitos imunossupressores da citocina IL-10, ela passou a ser examinada como um agente terapêutico em potencial para as DIIs em humanos. Sabendo-se que a fração FrHbIII obtida por cromatografia do látex natural da *Hevea brasiliensis*, estimula a liberação desta citocina “*in vitro*” (LAMOUNIER, 2004), neste trabalho avaliamos a efetividade antiinflamatória desta fração, em modelo de colite em camundongos.

O látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*, apresenta uma constituição química heterogênea, com os seguintes componentes: *cis*-poliisopreno, carboidratos, lipídeos, fosfolipídios e proteínas, estas últimas representando até 1,7% do total. Após a extração, o látex natural apresenta-se instável e coagula rapidamente, o que limita sua utilização, a menos que adequadamente processado. Separou-se, por meio de coagulação da borracha, o

látex natural em duas fases: 1- uma fase sólida, constituída de poliisoprenóides (borracha) e 2- Fase aquosa contendo todos os componentes hidrossolúveis do látex (proteínas, carotenóides, carboidratos, pigmentos, etc.), denominada soro. O soro foi então submetido a uma primeira etapa de purificação, realizada através da cromatografia em coluna de DEAE-celulose, que foi escolhida pela alta capacidade de adsorção de polifenóis, substâncias comuns encontradas em plantas (Prof. Dr. J. R. Giglio, comunicação pessoal), que dificultam os processos cromatográficos, principalmente por se ligarem fortemente às resinas das colunas de fase reversa ODS-C4, C8 e C18 (HPLC).

A cromatografia foi realizada pela aplicação direta do soro (pH=9,0) na coluna, da qual obtivemos um perfil cromatográfico apresentando três picos (Figura 4).

Iniciamos os estudos experimentais com culturas de células mononucleares avaliando a fração cromatográfica do látex correspondente ao 3º pico cromatográfico, determinada FrHbIII, ou seja, sua possível potencialidade na modulação da resposta inflamatória, mediada pela liberação da citocina IL-10. É fato conhecido que quando os linfócitos são ativados, ocorre primeiramente uma ativação com expansão clonal, que determinará entre outros, a produção de citocinas (ABBAS, 2003). Para avaliar a capacidade de indução da produção da citocina IL-10 pela fração FrHbIII, foram realizadas culturas de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC), incubadas com diferentes concentrações da fração FrHbIII. Nossos resultados mostraram que as culturas de células mononucleares na presença da fração FrHbIII liberam maior quantidade de IL-10 (568,47 a 918,86 pg/mL) do que as culturas controle (basal – 375,74 pg/mL),



como pode ser verificado na Figura 6. A maior concentração da fração analisada (150  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentou menor produção de IL-10 em comparação às concentrações menores (1,5 e 15  $\mu\text{g/mL}$ ), o que pode ser explicado por uma maior concentração protéica, que exerce maior efeito oncótico sobre as células, suprimindo a linfoproliferação nesta concentração, ou então, pode-se sugerir que em altas concentrações a fração FrHbIII apresente efeito tóxico para as células em meio de cultura.

O estímulo à liberação de IL-10 registrado *in vitro* sugere que este componente do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* potencialmente poderia ter efeito regulador da fase inflamatória, visto que esta citocina sinaliza uma resposta do tipo Th2, supressora de linfócitos T e de ativação de macrófagos.

Com base nesses dados, avaliamos os efeitos da fração FrHbIII via oral em camundongos em que se induziu colite pela administração de TNBS. O TNBS age como um hapteno que, associado ao etanol 50%, provoca colite experimental com ulcerações e inflamações permanentes no cólon de camundongos. O etanol 50% age rompendo a barreira epitelial mucosa do intestino, e o TNBS/hapteno age como um determinante antigênico capaz de induzir resposta imune, quando acoplado a um transportador (MORRIS et al., 1989). O transportador, neste caso, são as próprias proteínas das células da mucosa da parede intestinal e, quando associadas a um hapteno, passam a ser reconhecidas como antígenos estranhos ao organismo, desencadeando uma resposta inflamatória no local (LITTLE; EISEN, 1966). Este tipo de reação inflamatória provocada pelo TNBS apresenta

muitas similaridades clínicas e imunológicas tais como as observadas na Doença de Crohn em humanos (NEURATH et al., 2000).

Como esperado, em nossos experimentos foi possível observar que os animais nos quais a colite foi induzida pelo TNBS em camundongos, sem o tratamento com a fração, apresentaram perda de peso corporal nos primeiros dias após a indução, recuperando-o lenta e gradativamente após o terceiro dia de experimento, não recuperando ao final do quinto dia, o peso inicial correspondente ao dia 0 do experimento (Figura 7). Além disso, esses animais apresentaram grande incidência de diarreia e prolapso retal (Figuras 10 e 11). A severidade destes fatores pode explicar o índice de mortalidade registrado neste grupo de animais, que corresponde a 20% do total do grupo (Figura 9). As perdas de peso registradas e a dificuldade na recuperação do peso corporal inicial registrado neste grupo de animais podem ter sido consequência de alguns fatores, incluindo má absorção de nutrientes nos animais nos quais houve o desenvolvimento da doença e a severidade da diarreia observada neste grupo.

Por outro lado, no grupo de animais que foram submetidos à indução de colite e receberam tratamento oral diário com a fração FrHbIII (5 mg/kg) foi possível observar perda de peso apenas no primeiro dia após a indução da colite. Após o segundo dia este grupo apresentou ganho de peso gradativo, chegando a recuperar o peso inicial registrado no dia do experimento (Figura 7). Nesses animais a incidência de diarreia e prolapso retal foi significativamente menor em comparação ao grupo de animais que não recebeu tratamento com a fração (Figuras 10 e 11), adicionalmente foi observado um índice de mortalidade 0 (Figura 9). Em vista disso, é possível observar que a administração da fração

FrHbIII (5 mg/kg) feita primeiramente 2h após a indução da colite e, diariamente, durante os 5 dias subseqüentes, implicou em melhorias significativas quanto aos sinais clínicos (diarréia, prolapso retal, perda de peso) relacionados à colite, indicando uma provável atividade anti-inflamatória da fração FrHbIII.

A presença de infiltrado inflamatório na lesão foi estimado pela determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Esta enzima é encontrada em neutrófilos e, em menor quantidade em monócitos e macrófagos (KRAWISZ et al., 1984). A avaliação da atividade desta enzima fornece uma estimativa reprodutível e quantitativa do infiltrado inflamatório em tecidos. Os dados da avaliação da atividade da enzima MPO estão demonstrados na figura 14. Corroborando com os sinais clínicos e os dados das análises histológicas, a atividade da enzima MPO apresentou-se destacadamente maior e significativa ( $p \leq 0,01$ ) no grupo de animais nos quais a colite foi induzida pela administração de TNBS (17,13 U/mg tecido). Este fato confere com dados que demonstram maior quantidade de infiltrado inflamatório registrados em cólon de animais com doenças inflamatórias intestinais. Após 5 dias de tratamento com a fração FrHbIII (5 mg/kg), a atividade da MPO colônica dos animais foi significativamente reduzida (8,50 U/mg tecido), indicando que havia menor presença de neutrófilos e monócitos/macrófagos nos tecidos colônicos deste grupo de animais, em relação ao grupo colítico.

Nos grupos controle, que não foram submetidos à indução de colite – recebendo somente álcool etílico 50% via retal – e que receberam tratamento com a fração FrHbIII, a atividade da MPO foi de 4,80 U/mg tecido, sem diferença estatística do grupo controle, que só recebeu administração de álcool etílico 50%

(4,90 U/mg tecido). Os dados mostram que a fração FrHbIII isoladamente, não induz qualquer alteração quanto à mudança de peso, ocorrência de diarreia, prolapso, índice de mortalidade, nem mesmo alteração quanto à atividade da enzima MPO, não apresentando diferença estatística em comparação ao grupo controle (Figuras: 7, 8, 9, 10, 11 e 14, respectivamente).

Deve-se ressaltar que os mesmos dados clínicos, histológicos e bioquímicos foram obtidos em experimentos similarmente realizados, diferenciando apenas na forma de tratamento com a fração FrHbIII, após indução da colite pela administração de TNBS, nos quais a fração FrHbIII (100 µg/animal) foi administrada via intra-peritoneal, diariamente, durante 5 dias, apresentando resultados compatíveis aos experimentos realizados pelo tratamento com a fração via oral (dados não apresentados).

Com base nesses resultados, sugerimos que a melhoria no quadro clínico (peso, diarreia, prolapso e mortalidade), no quadro histológico, e nas análises bioquímicas (atividade da MPO) se devem pelo menos em parte, a atividade antiinflamatória exercida pela fração FrHbIII, possivelmente por seu perfil estimulador de produção de IL-10, mostrado “*in vitro*”.

A IL-10, originalmente conhecida como fator inibitório de síntese de citocina (CISF) foi descoberta como um produto de linfócitos Th2 CD4<sup>+</sup> que suprimem a produção de IFN-γ por células Th1 (WU et al., 1993). A atividade imunorregulatória da IL-10 é baseada em sua habilidade de inibir a síntese de citocinas, tais como IL-1, IL-6, IL-12, IFN-γ, TNF-α e a quimiocina IL-8, como a apresentação de antígenos, através da regulação do MHC de classe II e da expressão de

moléculas coestimulatórias que são requeridas por células apresentadoras de antígenos em suas interações com células T (LINDSAY; HODGSON, 2001). Portanto, ao induzir colite nos animais pela administração de TNBS, desencadeou-se uma reação inflamatória guiada principalmente pelo aumento na produção de IL-12 - que é uma citocina que aumenta a atividade citolítica de células NK e macrófagos, além de induzir células Th1 a produzirem IFN- $\gamma$  (NEURATH et al., 1995) – e de TNF- $\alpha$ , cuja ação nas DIIs tem sido considerada primordial no desenvolvimento da inflamação através da ativação de células da mucosa, indução de quimiocinas, e recrutamento de neutrófilos na mucosa intestinal (VAN DEVENTER, 1997).

Após o tratamento oral com a fração FrHbIII, sugere-se que o aumento na produção da IL-10 na mucosa intestinal destes animais inibiu a ativação dos macrófagos e a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-12 e TNF- $\alpha$ , melhorando significativamente o quadro de inflamação intestinal nos animais tratados com a fração, como mostrado em nossos resultados.

Tem sido amplamente demonstrado que muitos compostos derivados de plantas apresentam significantes efeitos antiinflamatórios (CALIXTO et al., 2004). Por esta razão, eles representam agentes em potencial para o desenvolvimento de novas drogas, especialmente destinadas ao tratamento ou controle de estados inflamatórios crônicos, como as DIIs. A matrina por exemplo, é um alcalóide encontrado em plantas do gênero *Sophora*, e mostrou ter efeitos antiinflamatórios em camundongos induzidos à colite por TNBS, provavelmente pela regulação da produção de TNF- $\alpha$  colônica (CHENG et al., 2005). Outro exemplo é o extrato da

raiz de plantas do gênero Poligalae (*Polygala tenuifolia*), que trata-se de uma planta medicinal que mostrou ter ação preventiva em colite induzida por TNBS provavelmente pela regulação da produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 (HONG et al., 2002).

No entanto, embora a fração cromatográfica FrHbIII do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* tenha mostrado atividade antiinflamatória e estimulatória de liberação da citocina IL-10, a sua purificação completa, bem como alguns estudos quanto à natureza química desta fração ainda se mostram necessários. Posteriores processos de análise e purificação serão introduzidos a fim de se conhecer a natureza química, além de obter o material com maior grau de pureza e atividade.

# ***Conclusões***

---

## **6 – CONCLUSÕES**

Os resultados das análises do material extraído a partir do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* (fração FrHbIII) permitiram concluir:

- A etapa de purificação por cromatografia em DEAE-celulose foi satisfatória, reproduzível e adequada para o processo de separação da fração FrHbIII;
- Na presença da fração FrHbIII, ocorreu um aumento da liberação da citocina IL-10 *in vitro* por células mononucleares em cultura;
- A indução de colite experimental em camundongos por TNBS é reproduzível, provocando perda de peso, diarreia e prolapso retal, apresentando as mesmas características das DIs em humanos;
- De acordo com as observações na variação de peso, diarreia, prolapso retal, bem como na análise histológica, o grupo tratado com a fração FrHbIII mostrou sinais clínicos significativos de melhorias em relação aos danos da colite induzida por TNBS, indicando atividade anti-inflamatória da fração FrHbIII;



## **Conclusões**

---

- A redução de cerca de 50% de atividade da enzima MPO no tecido colônico dos animais tratados com a fração FrHbIII, em relação à atividade dos animais induzidos à colite por TNBS ocorreu, possivelmente, pela atividade estimuladora da liberação de IL-10 pela fração registrada *in vitro*, pois a principal função desta citocina é a modulação da resposta inflamatória, inibindo principalmente a atividade de macrófagos que, junto aos neutrófilos, correspondem às principais células onde a MPO é encontrada, consubstanciando, portanto, a atividade anti-inflamatória demonstrada "*in vivo*".

# ***Referências Bibliográficas***

---

## **7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H; POBER, J.S. *Imunologia celular e molecular*. 4ª edição. Rio de Janeiro. Revinter. Isbn: 85-7309-642-X, 2003.

ALLEZ, M.; BRIMNES, J.; DOTAN, I.; MAYER, L. Expansion of CD8<sup>+</sup> T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 123: 1516-1526, 2002.

BERKMAN, N.; JOHN, M.; ROESEMENS, G.; JOSE, P.J.; BARNES, P.J.; CHUNG, K.F. Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *J. Immunol.*, 155: 4412-4418, 1995.

BOUMA, G.; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.*, 3: 521-533, 2003.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.*, 78: 206-209, 1982.

## ***Referências Bibliográficas***

---

CALIXTO, J.B., CAMPOS, M.M, OTUKI, M.F., SANTOS, A.R.S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Med.**, 70: 93-103, 2004.

CHENG, H.; XIA, B.; ZHANG, L.; ZHOU, F.; ZHANG, Y.X.; YE, M.; HU, Z. G.; LI, J.; WANG, Z.L.; LI, C.; GUO, Q.S. Matrine improves 2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. **Pharm. Res.**, 53(3): 202-208, 2005.

DING, L.; SHEVACH, E.M. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage co stimulatory function. **J. Immunol.**, 148: 3133-3139, 1992.

ECKMANN, L.; JUNG, H.C.; SCHAURER-MALY, C.; PANJA, A.; MORZYCKA WROBLEWSKA, E.; KAGNOFF, M.F. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin-8. **Gastroenterology**, 195: 1689-1693, 1993a.

ECKMANN, L.; KAGNOFF, M.F.; FIERER, J. Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system. **Trends Microbiol.**, 3: 118-120, 1995.

ELSON, C.O.; SARTOR, R.B.; TENNYSON, G.; RIDDEL R. Experimental models of IBD. **Gastroenterology**, 109: 1344-1351, 1995.

## ***Referências Bibliográficas***

---

FIOCCHI C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology**, 115: 182-205, 1998.

FIORUCCI, F.; ANTONELLI, E.; DISTRUTTI, E.; DEL SOLDATO, P.; FLOWER, R.J.; CLARK, M.J.P.; MORELLI, A.; PERRETTI, M.; IGNARRO L.J. NCX-1015, a nitric-oxide derivative of prednisolone, enhances regulatory T cells in the lamina propria and protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, 99: 15770-15775, 2002.

GIORGOS,B.; COMINELLI, F. Novel strategies to attenuate immune activation in Crohn's disease. **Curr. Op. Pharmacol.**, 6: 401-407, 2006.

GONZALEZ-REY, E.; VARELA, N.; SHEIBANIE, A.F.; CHORNY, A.; GANEA, D.; DELGADO, M. Cortistatin, an antiinflammatory peptide with therapeutic action in inflammatory bowel disease. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 14;103(11): 4228-4233, 2006.

GUO, X.; WANG, W.P.; KO, J.K.; CHO, C.H. Involvement of neutrophils and free radicals in the potentiating effects of passive cigarette smoking on inflammatory bowel disease in rats. **Gastroenterology**, 117: 884-892, 1999.

HALE, L.P.; GREER, P.K.; TRINH, C.T.; GOTTFRIED, M.R. Treatment with oral bromelain decreases colonic inflammation in the IL-10-deficient murine model of inflammatory bowel disease. **Clin. Immunol.**, 116: 135-142, 2005.

## ***Referências Bibliográficas***

---

HONG, T.; JIN, G.; TOSHINO, G.; MIURA, M.; MAEDA, Y.; CHO, S.; CYONG, J. Protective effect of Polygalae root in experimental TNBS-induced colitis in mice. **J. Ethnopharm.**, 79: 341-346, 2002.

JAGTAP, A.G.; SHIRKE, S.S.; PHADKE, A.S. Effect of polyherbal formulation on experimental models of inflammatory bowel diseases. **J. Ethnopharm.** 90: 195-204, 2003.

KESHAVARZIAN, A.; FUSUNYAN, R.D.; JACYNO, M.; WINSHIP, D.; MACDERMOTT, R.P.; SANDERSON, I.R. Increased interleukin-8 (IL-8) in rectal dialysate from patients with ulcerative colitis: evidence for a biological role for IL-8 in inflammation of the colon. **Am J Gastroenterol.**, 94: 704-712, 1999.

KORZENIK, J.R. Past and current theories of etiology of IBD: toothpaste, worms, and refrigerators. **J Clin Gastroenterol.**, 39: S59-65, 2005.

KRAWISZ, J.E.; SHARON, P.; STENSON, W.F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. **Gastroenterology.**, 87: 1344-1350, 1984.

## Referências Bibliográficas

KRIEGLSTEIN, C.F.; CERWINKA, W.H.; LAROUX, F.S.; SALTER, J.W.; RUSSEL, J.M.; SCHUERMANN, G.; GRISHAM, M.B.; ROSS, C.R.; GRANGER, D.N. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergents roles of superoxide and nitric oxide. **J Exp Med.**, 194: 1207-1218, 2001.

KUHN, R.; LOHLER, J.; RENNICK, D.; RAJEWSKY, K.; MULLER, W. Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell** 75: 263–274, 1993.

LAMOUNIER F. M. C. Avaliação da produção de citocinas inflamatórias, “*in vitro*”, induzidas pela biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. 115f. Tese de mestrado – FMRP-USP - Ribeirão Preto, 2004.

LEAVY, O. Immunotherapy: Cortistatin to the rescue. **Nat Review Immunol.**, 6: 337, 2006.

LINDSAY, J.O.; HODGSON H.J.F. Review article: the immunoregulatory cytokine interleukin-10 – a therapy for Crohn’s disease? **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 15: 1709-1716, 2001.

LITTLE, J.R.; EISEN, H.N. Preparation and characterization of antibodies specific for the 2,4,6-trinitrophenyl group. **Biochemistry.**, 5: 3385-3391, 1966.

## ***Referências Bibliográficas***

---

LIU, Z.; LEFRANÇOIS, L. Intestinal epithelial antigens induces mucosal CD8 T cell tolerance, activation, and inflammatory response. **J Immunol.**, 3: 534-543, 2003.

MacDERMOTT, R.P.; SANDERSON, I.R.; REINECKER, H.C. The central role of chemokines (chemotatic cytokines) in the immunopatogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis.**, 4: 54-67, 1998.

MALEFYT, W.R.; YSSEL, H.; VRIES, J.E. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4<sup>+</sup> T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. **J Immunol.**, 150(11): 4754-4765, 1993.

MAUL, J.; LODDENKEMPER, C.; MUNDT, P.; BERG, E.; GIESE, T.; STALLMACH, A.; ZEITZ, M.; DUCHMANN, R. Peripheral and intestinal regulatory CD4<sup>+</sup>CD25 (high) T cells in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 128: 1868-1878, 2005.

MAZZON, E.; MUIÀ, C.; DI PAOLA, R.; GENOVESE, T.; DE SARRO, A.; CUZZOCREA, A. Thalidomide treatment reduces colon injury induced by experimental colitis. **Shock.**, 23(6): 556-564, 2005.

MIYAMOTO, K.; KINGSLEY, C.Y.; ZHANG, X.; JABS, C.; IZIKSON, L.; SOBEL, R.A.; WEINER, H.L.; KUCHROO, V.Y.K.; SHARPE, A.H. The ICOS molecule plays a crucial role in the development of mucosal tolerance. **J Immunol.**, 175: 7341-7347, 2005.



## ***Referências Bibliográficas***

---

MOORE, K.W.; MALEFYT, R.W.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, 19: 683-765, 2001.

MOWAT, A. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nat Rev Immunol.**, 3: 331-341, 2003.

MRUÉ, F. Substituição do esôfago cervical por prótese bio sintética de látex – Estudo experimental em cães. 1996. 114f. **Dissertação (Mestrado em medicina)** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.

MURAKAMI, H.; AKBAR, S.M.F.; MATSUI, H.; HORIIKE, N.; ONJI, M. Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis. **Clin Exp Immunol.**, 128: 504-510, 2002.

NEURATH, M.F.; FUSS, I.; KELSALL, B.L.; STÜBER, E.; STROBER, W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. **J Exp Med.**, 182: 1281-1290, 1995.

NEURATH, M.F.; FUSS, I.; STROBER, W. TNBS-colitis. **Int Rev Immunol.**, 19: 51-62, 2000.

## ***Referências Bibliográficas***

---

NEURATH, M.F.; FINOTTO, S.; GLIMCHER L.H. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. **Nat Med.**, 8(6): 567-573, 2002.

OHKAWARA, T.; NISHIHIRA, J.; TAKEDA, H.; KATSURADA, T.; KATO, K.; YOSHIKI, T.; SUGIYAMA, T.; ASAKA, M. Protective effect of geranylgeranylacetone on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. **Int. J. Mol. Méd.**, 17: 226-34, 2005.

PAPADAKIS, K.A.; TARGAN, S.R. Role of cytokines in the patogenesis of inflammatory bowel disease. **Ann Rev Med.**, 51: 289-298, 2000.

PARK, J.P.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **Am J Surg.**, 187: 11S-16S, 2004.

PODOLSKY, D.K. Mucosal immunity and inflammation v. innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. **Am. J Phys.**, 227: G495-499, 1999.

PODOLSKY, D.K. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med.**, 347: 417-429, 2002;

POPOV, S.V.; OVODOVA, R.G.; MARKOV, P.A.; NIKITINA, I.R.; OVODOV Y.S. Protective effect of comaruman, a pectin of cinquefoil *Comarum palustre* L., on acetic acid-induced colitis in mice. **Dig. Dis. Sci.**, 51(9): 1532-1537, 2006.

## ***Referências Bibliográficas***

---

RIJINIERSE, A.; KOSTER, A.S.; NIJKAMP, F.P.; KRANEVELD, A.D. Critical role for mast cells in the pathogenesis of 2,4-dinitrobenzene-induced murine colonic hypersensitivity reaction. **J Immunol.**, 176: 4375-4384, 2006.

ROGLER, G.; ANDUS T. Cytokines in inflammatory bowel disease. **World J Surg.**, 22: 382-389, 1998.

SAMPAIO, s.v.; LAURE, c.j.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon.**, 21(2): 265-277, 1983.

SARTOR, R.B.; Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. **Gastroenterology**, 106: 533-539, 1994.

SASAKI M.; MATHIS, J.M.; JENNINGS, M.; JORDAN, P.; WANG, Y.; ANDO, T.; JOH, T.; ALEXANDER, J.S. Reversal of experimental colitis disease activity in mice following administration of an adenoviral IL-10 vector. **J Inflamm.**, 2: 1476-1492, 2005.

SCHINKE, S.; FELLERMANN, K.; HERLYN, K.; REICHEL, P.H.; FUNDKE, R.; STANGE, E.F.; GROSS, W.L.; SCHULTZ, H. Autoantibodies against the bactericidal/permeability-increasing protein from inflammatory bowel disease patients can impair the antibiotic activity of bactericidal/permeability-increasing protein. **Inflamm Bowel Dis.**, 10: 763-770, 2004.

## **Referências Bibliográficas**

---

SCHREIBER, S. Inflammatory bowel disease: immunological concepts. **Hepato-Gastroenterol.**, 47: 15-28, 2000.

SHANAHAN, F. Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. **Gastroenterology**, 120: 622-635, 2001.

SHEVACH, E.M. Organ specific autoimmunity. In: PAUL, W.E. **Fundamental Immunology**. 4 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1098-1125, 1999.

SINGH, B.; READ, S.; ASSEMAN, C.; MALMSTROM, V.; MOTTET, C.; STEPHENS, L.A.; STEPANKOVA, R.; TLASKALOVA, H.; POWRIE, F. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. **Immunol Rev.**, 182: 190-200, 2001.

SUGIMOTO, K.; HANAI, H.; TOZAWA, K.; AOSHI, T.; UCHIJIMA, M. NAGATA, T.; KOIDE, Y. Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. **Gastroenterology**, 123: 1912-1922, 2002.

VAN DEVENTER, S.J.; Tumour necrosis factor and Crohn's disease. **Gut.**, 40: 443-448, 1997.

WITTE, M.B.; BARBUL A. General principles of wound healing. **Surg. Clin. North Am.**, 77: 509-528, 1997.

## ***Referências Bibliográficas***

---

WU, J.; CUNHA F.Q.; LIEW, F.Y.; WEISER, W.Y. IL-10 inhibits the synthesis of migration inhibitory factor and migration inhibitory factor-mediated macrophage activation. **J Immunol.**, 151: 4325-4332, 1993.

YANG, S.K.; CHOI, M.S.; KIM, O.H.; MYUNG, S.J.; JUNG, H.Y.; HONG, W.S.; KIM, J.H.; MIN, Y.I. The increased expression of an array of C-X-C and C-C chemokines in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis: regulation by corticosteroids. **Am J Gastroenterol.**, 97: 126-132, 2002.

# ***Anexos***

---

## 8 – ANEXOS

8.1 – Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

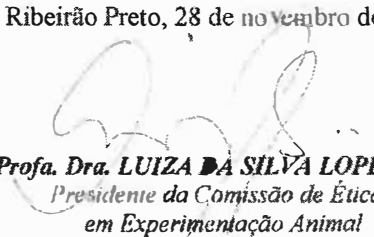
— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 135/2006, sobre o projeto intitulado "*Avaliação da atividade anti-inflamatória de uma fração do látex natural da seringueira Hevea brasiliensis em modelo experimental de colite em camundongos*", sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de *27 de novembro de 2006*.

(We certify that the protocol nº 135/2006, about "*Study of anti-inflammatory activity of a fraction isolated from latex of Hevea brasiliensis on experimental colitis model in mice*", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in *11/27/2006* meeting).

Ribeirão Preto, 28 de novembro de 2006.

  
**Prof. Dra. LUIZA DA SILVA LOPES**  
Presidente da Comissão de Ética  
em Experimentação Animal

**8.2 – Autorização dos voluntários doadores de sangue:**

**CADASTRO DOADORES DE SANGUE PROTOCOLO**

Nº: \_\_\_\_\_

Código identificação: \_\_\_\_\_

**Identificação pessoal**

**Nome:** \_\_\_\_\_

Cor: ( ) Branco, ( ) Pardo, ( ) Negro

Idade: \_\_\_\_\_ Obs: Excluir maiores de 60 e menores de 18 anos.

Sexo: ( ) Feminino, ( ) Masculino

Profissão: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

**HPP:**

**Não excludente:** \_\_\_\_\_

**Excludentes:** \_\_\_\_\_

Doenças degenerativas: ( ) DM, ( ) Hipotireoidismo, ( ) HAS,

( ) Outras: \_\_\_\_\_

Imunodepressão: ( ) Transplante, ( ) HIV, ( ) Outros: \_\_\_\_\_

Anticoagulação ( )

Fatores autoimunológicos: ( ) LE, ( ) Artrite Reumatóide,

( ) Outros: \_\_\_\_\_

Doença infecciosa crônica: ( ) HIV, ( ) Hepatite B, ( ) Hepatite C

( ) Outras: \_\_\_\_\_

**HFAM:** \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Declaro ser verdadeiras as informações contidas nesta ficha

\_\_\_\_\_  
Assinatura do doador



**8.3 – Tabela: Níveis de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de células na presença da fração cromatográfica do látex FrHbIII:**

<b>Componentes (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Doador 1</b>	<b>Doador 2</b>	<b>Média</b>
<b>Basal</b>	416,87	334,61	375,74
<b>ConA</b>	1381,12	1983,21	1682,16
<b>1,5</b>	820,35	1017,37	918,86
<b>15</b>	1073,21	866,84	970,03
<b>105</b>	649,80	487,14	568,47

#### **8.4 – Coloração utilizada: hematoxilina – eosina:**

Desparafinizar as lâminas, hidratar e lavar em água corrente por 5 minutos. Corar em hematoxilina filtrada por 3 minutos, lavar em água corrente por 5 minutos. Diferenciar em álcool ácido (1 – 3 passadas). Lavar em água corrente por 5 minutos. Passar as lâminas em solução Scott por 3 minutos e lavar novamente em água corrente por 5 minutos. Mergulhar as lâminas em álcool 80%, corar em eosina por 30 minutos. Passar as lâminas nos álcoois 95%, álcool absoluto, álcool/xilol e xilol puro. Montar as lâminas com Bálsamo do Canadá.

#### **Hematoxilina de Harris (solução estoque)**

Hematoxilina cristais	5g
Álcool absoluto	50 mL
Alúmen de potássio de amônia	100g
Água destilada	1000mL
Óxido vermelho de mercúrio	2,5g

Dissolver a hematoxilina em álcool absoluto e o alúmen na água destilada quente. Misturar ambas soluções e ferver rapidamente (menos de 1 minuto). Acrescentar óxido vermelho de mercúrio. Aquecer novamente até a solução se tornar “púrpura escura”. Retirar imediatamente do fogo e esfriar rapidamente a solução. Ao esfriar, filtrar a solução.

**Hematoxilina para uso**

Hematoxilina estoque      250 mL

Ácido acético glacial      15 mL

**Solução alcoólica de eosina – floxina (solução corante)**

Eosina 1%    62,5 mL

Floxina 1%    6,25 mL

Álcool 95°    487,5 mL

Ácido acético glacial      2,5 mL

**Álcool-ácido 1%**

Álcool 70%    198 mL

Álcool clorídrico    2mL

**Solução Scott**

Sulfato de magnésio      10g

Bicarbonato de sódio      1,8g

Água destilada      380mL