

**REDE CENTRO-OESTE DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE**

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM A PROTEÍNA HEV B 13, EXTRAÍDA DO
LÁTEX DE *HEVEA BRASILIENSIS*, NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE RATOS
COM SEPSE**

Lilhian Alves de Araújo

**GOIÂNIA
GOIÁS- BRASIL
2017**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

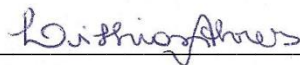
Nome completo do autor: Lilhian Alves de Araújo

Título do trabalho: Efeitos do tratamento com a Hev b 13, extraída do látex natural de *Hevea brasiliensis*, na resposta inflamatória de ratos com sepse.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Data: 23/03/2017

Assinatura do (a) autor (a)

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

LILHIAN ALVES DE ARAÚJO

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM A PROTEÍNA HEV B 13, EXTRAÍDA DO
LÁTEX DE *HEVEA BRASILIENSIS*, NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE RATOS
COM SEPSE**

Tese apresentada à IFES Tituladoras,
como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biodiversidade, para obtenção do título de
Doutor.

**GOIÂNIA
GOIÁS- BRASIL
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Alves de Araújo, Lilhian

Efeitos do tratamento com a proteína Hev b 13, extraída do látex natural de *Hevea brasiliensis*, na resposta inflamatória de ratos com sepse [manuscrito] / Lilhian Alves de Araújo. - 2017.
xv, 86 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Jorge da Silva Júnior; co-orientador Fátima Mrué.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Goiânia, 2017.
Bibliografia. Anexos.

1. Hev b 13. 2. *Hevea brasiliensis*. 3. Resposta inflamatória. 4. Sepsis. I. Jorge da Silva Júnior, Nelson, orient. II. Título.

CDU 60

ATA DE DEFESA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIODIVERSIDADE
Rua 235, S/N - Setor Universitário - Goiânia/GO CEP 74605-050
Fone (62) 3209.6362
email: pgbb.goiias@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE LILHIAN ALVES DE ARAÚJO - Aos seis dias do mês de março do ano de 2017 (06/03/2017), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. NELSON JORGE DA SILVA JÚNIOR, MILTON ADRIANO DE PELLI OLIVEIRA, CLAYSON MOURA GOMES, PAULO ROBERTO DE MELO REIS e CLÁUDIO CARLOS DA SILVA, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada na PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **"EFEITOS DO TRATAMENTO COM A PROTEÍNA HEV B 13, EXTRAÍDA DO LÁTEX DE HEVEA BRASILIENSIS, NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE RATOS COM SEPSE"**, em nível de **DOCTORADO**, área de concentração em **BIOTECNOLOGIA**, de autoria de **LILHIAN ALVES DE ARAÚJO**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo orientador da discente, Prof. Dr. NELSON JORGE DA SILVA JÚNIOR, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida a autora da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1181/2013 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Profa. Dr. Nelson Jorge da Silva Júnior
Prof. Dr. Milton Adriano de Pelli Oliveira
Prof. Dr. Clayson Moura Gomes
Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis
Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva

Aprovada Reprovada

Nelson Jorge da Silva Júnior Aprovada
Milton Adriano de Pelli Oliveira APROVADA
Clayson Moura Gomes Aprovado
Paulo Roberto de Melo Reis APROVADO
Cláudio Carlos da Silva Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata HABILITADA, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOCTOR EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE**, na área de concentração em **BIOTECNOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17 h 00 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, ZHARA H. R. DE CASTILHO, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor. A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Prof. Dr. Nelson Jorge da Silva Júnior (PUC/GO) _____
Prof. Dr. Milton Adriano de Pelli Oliveira (IPTSP/UFG) _____
Prof. Dr. Clayson de Moura Gomes (PUC/GO) _____
Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis (PUC/GO) _____
Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva (PUC/GO) _____
Secretário da Pós-Graduação: Zhara Heleno Ribeiro de Castilho

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Paulo e Meire, que fazem da minha vida
mais alegre, sutil e amável.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

Po meu orientador,

Dr. Nelson Jorge da Silva Júnior, ao qual aprendi a admirar e respeitar, pela paciência que teve nos momentos mais difíceis, pelo incentivo, dedicação, ensinamentos e oportunidade concedida.

À minha família e amigos,

Especialmente, meus pais Paulo e Meire, que me apoiaram e foram o alicerce durante todo o mestrado e doutorado.

Ao professor Dr. Paulo Roberto de Melo Reis, por acreditar no meu potencial e com seu jeito amável tornar as dificuldades irrelevantes. A professora Dra. Fátima Mrué, pela inspiração e exemplo durante todos os anos de convivência.

Ao professor Dr. Milton Adriano de Pelli Oliveira, que cedeu o espaço físico do seu laboratório e não mediu esforços em colaborar conosco durante o estabelecimento da metodologia, imprescindível na realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Hidelberto Matos Silva e Ms. Maxley Martins Alves, pela amizade, parceria e colaboração durante a fase experimental e de análise.

Ao professor Dr. Clayson Moura Gomes, pela paciência e correção das análises estatísticas.

A indústria Pele Nova Biotecnologia, pela gentileza em fornecer a proteína Hev b 13 para os experimentos.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xiii
RESUMO.....	xvi
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1. SEPSE: CONCEITOS GERAIS, HISTÓRICO E DEFINIÇÕES	22
2.2. EPIDEMIOLOGIA, ATUALIDADES E PERSPECTIVAS DA SEPSE	24
2.3. FISIOPATOLOGIA DA SEPSE	27
2.4. CITOCINAS E SEPSE	29
2.5. MODELOS EXPERIMENTAIS DE SEPSE	31
2.6. HEV B 13	31
3. OBJETIVO.....	34
3.1. OBJETIVO GERAL	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. OBTENÇÃO DA PROTEÍNA HEV B 13	35
4.2. ANIMAIS PARA EXPERIMENTAÇÃO	35
4.3. INDUÇÃO DE SEPSE	35
4.4. GRUPOS E TRATAMENTOS.....	36
4.5. COLETA DE AMOSTRAS	37
4.6. LEUCOGRAMA.....	38
4.7. DETECÇÃO DE CITOCINAS	38
4.7.1. Preparo do plasma.....	38
4.7.2. Preparo das amostras de tecido	38
4.7.3. Ensaio imunoenzimático (Elisa)	39
4.8. HISTOLOGIA	39
4.8.1. Confeção das lâminas.....	39
4.8.2. Análise histopatológica	40
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40

5. ARTIGO 1.....	41
6. ARTIGO 2.....	65
7. CONCLUSÕES GERAIS.....	81
8. REFERÊNCIAS.....	82
ANEXOS	I
ANEXO I. PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA PUC - GO.....	II
ANEXO II. COMPROVANTE DE ACEITE DO ARTIGO 1	III
ANEXO III. PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO	IV

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Definições de SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico	23
Figura 2. Método de indução de sepse por ligadura e perfuração cecal (LPC).....	36
Figura 3. Esquema de delineamento experimental dos diferentes grupos e respectivos tratamentos.	37

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ACCP - American College of Chest Physicians

AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida

APACHE II - Acute Physiology and Chronic Health disease Classification System II

BASES - Brazilian Sepsis Epidemiological Study

CARS - Síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória

CDC - Centro de controle e prevenção de doenças

CID - Coagulação intravascular disseminada

dL - Decilitros

EMA - European Agency for the Evaluation of Medicinal Products

FC - Frequência Cardíaca

FDA - Food drug and administration

FiO₂ - Pressão inspirada de oxigênio

FR - Frequência Respiratória

FT- Fator tecidual

H₂SO₄ - Ácido Sulfúrico

HE - Hematoxilina e Eosina

ICAM - Moléculas de adesão intercelular

IFN - Interferon

IL - Interleucina

ILAS - Instituto Latino Americano de Sepsis

KCs- Células de Kupffer

kDa - Quilodalton

Kg - Quilograma

L - Litro

LPC - Ligadura e perfuração cecal

LPS - Lipopolissacarídeo

mg - Miligramas

MIF - Fator de inibição da migração de macrófagos

mL - Mililitros

mm³ - Milímetros cúbicos

mmHg - Milímetros de mercúrio

mmol - Milimol

NF-kB - Fator nuclear kB

nm - nanômetro

PAF - Fator de ativação plaquetária

PAM - Pressão arterial média

PaO₂ - Pressão alveolar de oxigênio

PaS - Pressão arterial sistólica

PBS - Solução salina fosfato

PMAPs - Padrões moleculares associados aos patógenos

PROGRESS - Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis

RNI - Relação normatizada internacional

RRP- Receptores de reconhecimento padrão

SBF - Soro bovino fetal

SCCM - Society of Critical Care Medicine

SDMO - Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos

SIRS - Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SVO₂ - Saturação venosa mista de oxigênio

TFPI- Inibidor da via do fator tecidual

TGF - Fator de transformação de crescimento

Th1 - Linfócitos T Helper tipo 1

Th2 - Linfócitos T helper tipo 2

TLRs - Receptores Toll- like

TNF - Fator de necrose tumoral

TTPA - Tempo de tromboplastina parcial ativada

UTI - Unidade de terapia intensiva

VCAM - Moléculas de adesão celular vascular

RESUMO

ARAÚJO, Lilhian Alves, Me., Universidade Federal de Goiás, março de 2017. **Efeitos do tratamento com a proteína Hev b 13, extraída do látex de *Hevea brasiliensis*, na resposta inflamatória de ratos com sepse.** Orientador: Dr. Nelson Jorge da Silva Júnior. Co-orientadora: Dra. Fátima Mrué

Sepse é uma doença infecciosa caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica grave. A ruptura do complexo equilíbrio entre os mediadores inflamatórios na fase aguda da doença leva a uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, com conseguinte hipotensão, aumento da permeabilidade capilar, lesões de órgãos e morte. Pesquisas recentes utilizando a Hev b 13, proteína derivada do látex natural da *Hevea brasiliensis* (seringueira), tem demonstrado importantes efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da Hev b 13 na resposta inflamatória sistêmica e tecidual de ratos com sepse. Para isso, foi realizado ligadura e perfuração do ceco (LPC) em ratos machos Wistar e, após seis horas, os animais foram randomizados em grupos e tratados com as doses 0,5; 2,0 e 3,0 mg/Kg de Hev b 13 subcutâneo. Posteriormente, subdividiu-se os animais em três tempos diferentes (1, 6 e 24 horas após os tratamentos) para coleta de amostras sanguíneas e eutanásia com remoção dos pulmões e fígado. Foram analisados os leucócitos, concentrações plasmáticas e teciduais de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina (IL) 6, IL-10, IL-4 e lâminas histológicas. Os resultados demonstraram que no tratamento com a proteína Hev b 13 houve redução significativa dos leucócitos totais e diferenciais bem como na produção de TNF- α e IL-6, associado ao aumento de IL-10 e IL-4 no plasma e tecido pulmonar. Além disso, restringiu as alterações morfológicas encontradas nos pulmões, incluindo infiltrado de neutrófilos, edema e espessamento alveolar. No fígado, aumentou a produção de IL-10 e inibiu TNF- α e IL-6, além de reduzir hemorragia, infiltrado inflamatório sinusoidal e degeneração hidrópica na avaliação histológica. Concluímos que a Hev b 13 possui atividade anti-inflamatória e imunomoduladora capaz de atenuar lesões nos pulmões e fígado de ratos durante a sepse aguda, com potencialidades para aplicabilidade clínica.

Palavras-Chave: Hev b 13, *Hevea brasiliensis*, Resposta Inflamatória, Sepse

ABSTRACT

ARAÚJO, Lilhian Alves, MSc., Universidade Federal de Goiás, March, 2017. **Effects of treatment with Hev b 13 protein, extracted from *Hevea brasiliensis* latex, on the inflammatory response of septic rats.** Adviser: PhD. Nelson Jorge da Silva Júnior. Co-Adviser: PhD.Fátima Mrué

Sepsis is an infectious disease characterized by severe systemic inflammatory response. Rupture of the complex equilibrium between inflammatory mediators in the acute phase of the disease leads to exacerbated production of proinflammatory cytokines, with consequent hypotension, increased capillary permeability, organ lesions and death. Recent research using the Hev b 13 protein derived from natural *Hevea brasiliensis* (rubber tree) latex has demonstrated important anti-inflammatory and immunomodulating effects. The aim of this study was to investigate the effects of Hev b 13 on the systemic and tissue inflammatory response of septic rats. To that end, cecal ligation and puncture (CLP) was performed on male Wistar rats and after six hours, the animals were randomized into groups and subcutaneously treated with doses of 0.5; 2.0 and 3.0 mg/Kg of Hev b 13. Next, the animals were subdivided into three different times (1, 6 and 24 hours after treatment) for blood sample collection and euthanasia with removal of the lungs and liver. Leukocytes, tumor necrosis factor- α (TNF- α) plasma and tissue levels, interleukin (IL)-6, IL-10, and IL-4 and histological slides were analyzed. The results demonstrated that treatment with the Hev b 13 protein prompted a significant decline in total and differential leukocytes, as well as the production of TNF- α and IL-6, associated with an increase in IL-10 and IL-4 in plasma and lung tissue. Moreover, it restricted the morphopathological changes found in the lungs, including neutrophil infiltration, swelling and alveolar thickening. In the liver, it increased IL-10 production and inhibited TNF- α and IL-6, in addition to reducing hemorrhage, sinusoidal inflammatory infiltrates and hydropic degeneration in histological assessment. We conclude that Hev b 13 displays anti-inflammatory and immunomodulating activity capable of attenuating lung and liver lesions in rats during acute sepsis, with potential for clinical applications.

Key-words: Hev b 13, *Hevea brasiliensis*, Inflammatory Response, Sepsis

1. INTRODUÇÃO

A sepse é definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal, com múltiplos achados clínicos e bioquímicos, causado por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção (SHANKAR-HARI et al., 2016). Pode evoluir para sepse grave e choque séptico, sendo essa última a complicação terminal onde a homeostasia não pode ser mantida sem suporte avançado de vida (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011).

Após a exposição inicial a um microrganismo e seus padrões moleculares associados aos patógenos (PMAPs), ocorre uma resposta inflamatória clássica restrita ao sítio de infecção com ativação de leucócitos polimorfonucleares, monócitos/macrófagos e células endoteliais pelos receptores de reconhecimento padrão (RRP- especialmente os do tipo Toll), desencadeando uma cascata de via intracelular seguido pela produção e secreção de mediadores químicos, incluindo citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), fator ativador de plaquetas (PAF) e óxido nítrico na tentativa de eliminar o agente agressor (DENK et al., 2012; SCHULTE et al., 2013).

Todo esse processo tende a permanecer localizado, porém, quando a lesão primária persiste, esses mediadores pró-inflamatórios espalham para a circulação sistêmica, sinalizando que o foco inicial de infecção não foi eliminado, sendo necessária mais intervenção no sentido de ampliar a resposta imune. Todavia, uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias pode dar origem a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), associada aos sinais clínicos de sepse tais como vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar, hipotensão, hemoconcentração, hipercoagulação, extravasamento macromolecular e edema (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011). A resposta inflamatória exacerbada faz as células endoteliais adquirirem uma função pró-coagulante e protrombótica, pela liberação de tromboplastina, obstrui

o fluxo vascular para os tecidos e causa síndrome da disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (SDMO) com altos níveis de mortalidade (HOOK, ABRAMS, 2012).

Na fase mais tardia da sepse, mediadores anti-inflamatórios (IL-4, IL-10, receptores solúveis de TNF- α e antagonista do receptor de IL-1), são liberados para compensar e modular os efeitos destrutivos da resposta inflamatória (SCHULTE et al., 2013). O equilíbrio entre mediadores anti e pró inflamatórios são a chave para a evolução dos quadros de sepse pois, uma reação compensatória exacerbada pode ser tão prejudicial quanto a resposta pró-inflamatória, levando a imunossupressão excessiva referida como “síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória” (CARS) (STEARNS et al., 2011).

A sepse grave situa-se entre a 10^a e 13^a causa de morte nos Estados Unidos onde, nas últimas décadas, a incidência de sepse aumentou 9% ao ano, resultando em 215.000 mortes/ano, correspondente ao total de mortes por infarto agudo do miocárdio (MAYR et al., 2014). Estudos epidemiológicos no Brasil, demonstraram que os dados nacionais são igualmente alarmantes, onde a incidência de sepse grave e choque séptico situam-se entre 46,9% e 52,2% respectivamente, com taxa de mortalidade global de 22%. Vale ressaltar que o custo diário do tratamento da sepse alcança a média de US\$ 9,773 mil para cada 10 dias de internação, uma das mais dispendiosas condições de estadia hospitalar, impondo pesada carga financeira no sistema de saúde pública do país (SOGAYAR et al., 2008; CHALUPKA, TALMOR, 2012).

Na perspectiva de reduzir a morbimortalidade induzida pela resposta inflamatória na sepse, diversos protocolos de terapêutica têm sido propostos nos últimos anos, tais como: diagnóstico e introdução precoce do tratamento, reposição volêmica, administração de antibióticos e corticosteroides, terapia anticoagulante e exames periódicos. Tudo isso acompanhado de moderno suporte hemodinâmico nas unidades de terapia intensiva (UTI) (DELLINGER, et al., 2012).

Paralelamente, clínicos e pesquisadores tem conduzido diversas pesquisas visando a descoberta de novos potenciais alvos terapêuticos e/ou substâncias que pudessem equilibrar a resposta inflamatória e coagulativa na sepse. Anticorpos monoclonais anti-TNF- α , receptores antagonistas de IL-1 e fator de ativação plaquetária (PAF), além de agentes antioxidantes foram testados em estudos multicêntrico, randomizado e controlado nos EUA e Europa, mas não reduziram a taxa de mortalidade ou apresentaram resultados inconclusivos (DHAINAUT, 1998; OPAL, 1997; KRISHNAGOPALAN S, DELLINGER, 2001; ABRAHAM, 2007).

A última medicação de impacto foi a drotrecogina alfa ativada, potente anticoagulante, aprovada para a uso clínico em 2001 pela agência fiscalizadora americana a *Food and Drug Administration* (FDA) e europeia, *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA), no entanto, o uso foi vedado temporariamente devido a permanência de altos índices de desfechos hemorrágicos a longo prazo (RANIERI et al., 2012). Sendo assim, até o momento não dispomos de nenhuma medicação com efetividade no tratamento da sepse.

Pesquisas utilizando uma proteína derivada do látex natural de *Hevea brasiliensis* (seringueira), denominada Hev b 13, demonstraram atividade biológica capaz de induzir células mononucleares humanas sob estímulo de fitohemaglutinina, a produzirem interleucina 10 (IL-10) e reduzir fator de necrose tumoral (TNF- α), IL- 1 β e IL- 6 *in vitro*, abrindo caminhos para estudos de reações imunológicas influenciadas por essa proteína. (TEIXEIRA et al., 2012ab). Em seguida, outros experimentos foram realizados utilizando modelos animais de retocolite ulcerativa bem como de artrite reumatoide. Os resultados confirmaram importante regressão das lesões em estudo nos subgrupos tratados com a Hev b 13 de forma dependente da dose, sugerindo que a mesma possa desempenhar uma possível ação anti-inflamatória e/ou imunomoduladora (TEIXEIRA et al., 2012ab). Com isso, o presente estudo foi desenhado para investigar os efeitos

da Hev b 13 na resposta inflamatória, bem como sua repercussão nas disfunções orgânicas associadas a sepse.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sepsis: Conceitos gerais, histórico e definições

A palavra sepsis é de origem grega "*σηψις*", que significa "decomposição" ou "putrefação", e foi mencionada pela primeira vez nos poemas de Homero aproximadamente 2.700 anos atrás (CHANG et al., 2010). Pierre Adolphe Piorry, médico francês (1794-1879), introduziu o termo septicemia (intoxicação pútrida sanguínea) e piemia (pús no sangue) sem determinar as diferenças e os mecanismos patogênicos envolvidos (FERRAZ, 2008). Em seguida, Semmelweis, no século XIX, desenvolveu uma visão mais moderna da sepsis e Schottmuller em 1914, citou pela primeira vez a ligação direta entre a invasão de microrganismos do foco da infecção para a corrente sanguínea e doença sistêmica, com sintomas característicos.

Investigações clínicas e experimentais ao longo do século XX levaram ao melhor entendimento sobre a fisiopatologia da sepsis. Em 1991, uma conferência de consenso foi realizada pela American College of Chest Physicians (ACCP) e Society of Critical Care Medicine (SCCM) com o objetivo de estabelecer uma definição simples e universal para sepsis além de padronizar as terminologias, facilitando o diagnóstico precoce e tratamento da doença (SCHULTE et al., 2013).

Sepsis foi definida então como "síndrome da resposta inflamatória sistêmica" (SIRS - Systemic Inflammatory Response Syndrome), associada a infecção com presença de dois ou mais dos seguintes sinais clínicos: temperatura corporal $>38^{\circ}\text{C}$ ou $<36^{\circ}\text{C}$, batimento cardíaco >90 min, frequência respiratória >20 ipm min ou PaCO_2 $<32\text{mmHg}$ e leucócitos >12.000 células/ mm^3 ou <4.000 células/ mm^3 ou $>10\%$ de formas imaturas (DELLINGER et al., 2012).

De acordo com a International Sepsis Definition Conference, em 2001, a sepsis pode ser classificada em sepsis grave caracterizada por disfunção orgânica,

hipoperfusão ou hipotensão. O choque séptico refere-se a um estado de dificuldade circulatória aguda, identificada por hipotensão arterial persistente, mesmo após reposição adequada de líquidos (SHANKAR-HARI et al., 2016). A situação onde a duração do choque séptico é maior do que uma hora, e não responsiva a administração de líquidos e drogas vasopressoras pode ser denominada de choque séptico refratário (Figura 1) (SOUZA, 2010).

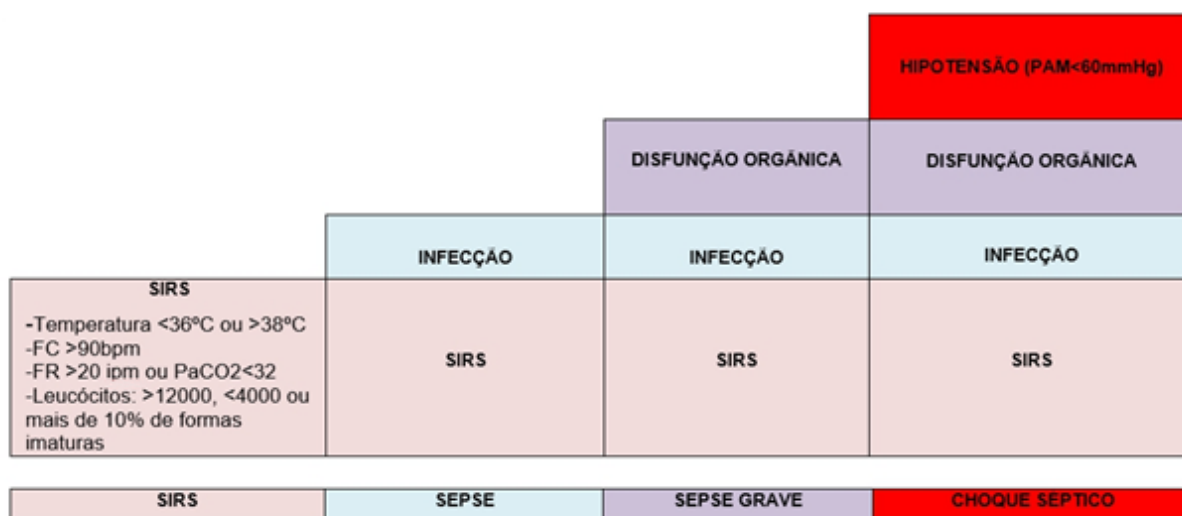


Figura 1. Definições de SIRS, sepsis, sepsis grave e choque séptico (Fonte: HENKIN et al., 2009 com adaptações). SIRS: Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica; FC: frequência cardíaca; FR: frequência respiratória; PAM: pressão arterial média; bpm: batimentos por minuto; ipm: inspirações por minuto, mmHg: milímetros de mercúrio.

O conceito da complicação terminal na sepsis denominada síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO), citada pela primeira vez por Baue em 1975, corresponde a presença de alteração na função orgânica de modo que a homeostasia não possa ser mantida sem suporte avançado de vida (BAUE, 1975). Esta síndrome surgiu apenas depois da criação de Unidades de Terapia Intensiva, com equipamentos de suporte aos órgãos centrais como os ventiladores artificiais e máquinas de hemodiálise. Antes destes, a maioria dos pacientes com sepsis grave e choque séptico morriam dentro de curtos intervalos de tempo, sem qualquer chance para o desenvolvimento da SDMO (LIMA, FRANCO, 2010).

Os critérios detalhados para o diagnóstico da sepse são infecção mais uma das seguintes variáveis:

- **Variáveis Gerais:** febre $>38,3^{\circ}\text{C}$; hipotermia $<36,0^{\circ}\text{C}$; frequência cardíaca $>90\text{bpm}$; taquipnéia ($\text{FR}>20$ ipm ou $\text{PCO}_2 <32\text{mmHg}$; alteração de estado mental, edema significativo ou balanço hídrico positivo ($>20\text{mL/Kg}$ em 24 horas); hiperglicemia (glicemia $>120\text{mg/dL}$ na ausência de diabetes).
- **Variáveis inflamatórias:** leucocitose (>12.000 leucócitos/ mm^3); leucopenia (<4.000 leucócitos/ mm^3); leucócitos normais, porém com mais de 10% de formas imaturas; proteína C reativa plasmática $>$ que 2 desvios padrões acima dos valores normais; procalcitonina plasmática $>$ que 2 desvios padrões acima dos valores normais.
- **Variáveis hemodinâmicas:** hipotensão arterial ($\text{PaS}<90\text{mmHg}$; $\text{PAM}<60\text{mmHg}$ ou queda na $\text{PaS} > 40\text{mmHg}$); $\text{SVO}_2 > 70\%$; índice cardíaco $>3,5$ litros/minuto.
- **Variáveis de disfunção orgânica:** hipoxemia arterial ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 <300$); oligúria (débito urinário $<0,5\text{mL/Kg}$ hora por pelo menos 2 horas); aumento da creatinina $>0,5\text{mg/dL}$; alterações de coagulabilidade ($\text{RNI}>1,5$ ou $\text{TTPA}> 60$ segundos); íleo paralítico; trombocitopenia (<100.000 plaquetas/ mm^3); hiperbilirrubinemia (bilirrubinas totais $>4\text{mg/dL}$).
- **Variáveis de perfusão tissular:** hiperlactemia ($>1\text{mmol/L}$); perfusão tissular periférica lentificada.

2.2. Epidemiologia, atualidades e perspectivas da sepse

A sepse é uma das causas mais comuns de admissão em unidades de terapia intensiva (UTI) nos Estados Unidos, e o número de óbito encontra-se na mesma faixa que o infarto agudo do miocárdio (PEREZ, 2009). Angus et al. (2001) estudaram

192.980 casos de sepse grave, compreendidos em um coorte de mais de 6,5 milhões de pacientes internados em 847 hospitais de sete estados estadunidenses e estimaram sua incidência, custo e prognóstico. A incidência de sepse grave foi de três casos por mil habitantes (751.000 casos/ano para a população dos Estados Unidos da América), superando a da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e a dos principais tipos de câncer, o que resultaria em 215.000 mortes/ano.

Especialmente comum em idosos, a incidência de sepse aumenta mais de cem vezes com a idade, sendo 0,2/1.000 em crianças e 26,2/1000 em pacientes com idade superior a 85 anos (REINHART et al., 2012). De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) em 2008, estima-se que \$ 14, 6 bilhões foram gastos por internações com sepse nos Estados Unidos, e de 1997 a 2008, com a inflação ajustada, os custos totais do tratamento de pacientes internados por essa condição aumentou anualmente 11,9% (HALL et al., 2011).

No Brasil, pesquisas epidemiológicas sobre sepse são escassas, porém alarmantes. No estudo multicêntrico PROGRESS (Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis), envolvendo 12,881 mil pacientes com sepse grave em 37 países e 276 UTIs, o Brasil obteve a maior taxa de mortalidade hospitalar por esta doença (BEALE et al., 2003). No BASES (Brazilian Sepsis Epidemiological Study), realizado em cinco unidades de terapia intensiva públicas e privadas, identificou-se uma incidência de sepse de 57,9 por 1000 pacientes/dia. A taxa de letalidade de pacientes com SIRS (independente se devido à sepse ou outra causa), sepse, sepse grave e choque séptico foi 24,2%, 33,9%, 46,9%, e 52,2%, respectivamente (SILVA et al., 2004).

Em outro estudo, o Sepse Brasil, foram relatados o acompanhamento de uma grande amostra de pacientes críticos (n = 3.128), em 75 UTIs, de todas as regiões do país. Cerca de 17% dos pacientes tiveram diagnóstico de sepse com uma taxa de

letalidade global em 28 dias de 46,6%, enquanto que diferenciado por gravidade do quadro séptico, revelou-se como equivalente a 34,4% na sepse grave e 65,3% no choque séptico (SALES et al., 2006).

No COSTS, estudo multicêntrico, prospectivo e randomizado para avaliação do custo de pacientes sépticos em unidades de terapia intensiva brasileira, conduzido pelo Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS), a taxa de letalidade global foi de 44,3%, enquanto as taxas de letalidade separadas por tipo de UTI, pública ou privada, foram de 49,2% e 37,7%, respectivamente. Vale ressaltar que o custo diário de tratamento da sepse em pacientes não sobreviventes foi maior que em pacientes sobreviventes durante a internação na UTI, alcançando a média de \$ 9,773 mil para cada 10 dias de internação (SOGAYAR et al., 2008). Com base num modelo de risco proporcional, construído a partir de características demográficas e doenças da população controle, Quartin et al. (1997), concluiu em seu estudo que os pacientes sobreviventes da sepse corriam um risco significativo de morrer de causas não sépticas (26% de mortalidade prevista para 1 ano).

Na expectativa de reduzir a taxa de letalidade da sepse em 25% até o final da presente década, a “Declaração de Barcelona” lançou a campanha mundial Surviving Sepsis Campaign, onde apregoam abordagens rápidas, precoces e protocoladas das ações terapêuticas. Resumidamente, o tratamento da sepse, sepse grave, choque séptico, e síndrome da disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (SDMO) incluem: (1) manobras de reposição volêmica, (2) abordagem da infecção com antibioticoterapia até uma hora após o fechamento do diagnóstico, (3) administração de corticosteróides, (4) terapia anticoagulante, (5) controle glicêmico, (6) suporte ventilatório e (7) medidas terapêuticas adicionais (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011).

Não se pode negar os avanços e benefícios em relação ao diagnóstico precoce; rastreamento microbiano mais eficaz que possibilita o rápido início do tratamento, o uso

otimizado das variáveis hemodinâmicas e das técnicas de suporte orgânico. No entanto, essa complexidade das unidades de terapia intensiva possui ambivalências que devem ser consideradas como o aumento das técnicas invasivas, uso indiscriminado de novos antibióticos, internações prolongadas e alto custo econômico e social (SILVA, 2011).

Uma das terapias para sepse, tida como promissoras, foi a utilização da Proteína C Ativada Humana Recombinante (Drotrecogina alfa). Potente anticoagulante e reconhecido papel anti-inflamatório reduziu a letalidade de enfermos com alto risco de morte quando administrada de modo precoce, no entanto, sua eficácia foi contestada depois da ocorrência de graves episódios hemorrágicos (RANIERI et al., 2012). Anticorpos monoclonais anti-TNF- α , receptores antagonista de IL-1 e fator de ativação plaquetária (PAF) foram testados em estudos multicêntricos, randomizados e controlados nos EUA e Europa, mas não reduziram a taxa de mortalidade (DHAINAUT, 1998; OPAL, 1997; ABRAHAM, 2007). Agentes antioxidantes (α -tocoferol, dimetil-sulfoxide, coenzima Q10, N-acetilcisteína, glutation, alopurinol, vitaminas C e E, β -caroteno, catalase e superóxido-dismutase entre outros foram testados para neutralizar a explosão de radicais livres e evitar o dano celular na SIRS com resultados inconclusivos (KRISHNAGOPALAN, DELLINGER, 2001).

2.3. Fisiopatologia da sepse

A resposta imune inata é responsável pelo processo inflamatório inicial na sepse. Quando os agentes patogênicos invadem o hospedeiro, seus padrões moleculares associados aos patógenos (PMAPs) são identificados pelos receptores de reconhecimento padrão (RRP) expressos em barreiras epiteliais bem como em células imunes. São exemplos de RRP a família Toll –like (TLRs) que identificam uma grande classe de PMAPs, no qual o TLR-2 identifica os peptídeoglicanos das bactérias Gram-

positivas e o TLR-4 os lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias Gram- negativas (SILVA, 2012; STEARNS et al., 2011).

O reconhecimento dos microrganismos pelos TLRs dispara uma cascata de via intracelular com consequente ativação do fator nuclear kB (NF-kB), seguido pela produção e secreção de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6) que atuam coordenando uma ampla variedade de reações a nível tecidual, incluindo o aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, infiltração de neutrófilos e produção de óxido nítrico, o que é um passo crucial no combate a infecção localizada prevenindo a disseminação sistêmica (HANSEN et al., 2011; SCHULTE et al., 2013).

Todavia, se a infecção primária persiste, ocorre a liberação excessiva de citocinas inflamatórias gerando a “síndrome da resposta inflamatória sistêmica” (SIRS), com consequente disfunção endotelial caracterizada por vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar, hipotensão, hemoconcentração, extravasamento macromolecular e edema. A ativação da cascata do complemento, usualmente pela via alternativa, libera as proteínas plasmáticas C3_a e C5_a, agindo como quimioatraente para os neutrófilos, intensificando a inflamação e os distúrbios vasculares (BENJAMIM, 2001; BENJAMIM et al, 2002; SCHULTE et al, 2013).

Os PMAPs e as citocinas inflamatórias também são responsáveis por ativar o sistema de coagulação a partir da expressão do FT (fator tecidual), levando a inibição dos fatores anticoagulantes endógenos – antitrombina III, proteína C, proteína S e o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), levando as células endoteliais a adquirirem função pró-coagulante e protombótica. Após, a formação e deposição de fibrina na microvasculatura, consumo de plaquetas e alterações na fibrinólise desencadeia a coagulação intravascular disseminada (CID), podendo evoluir para síndrome da disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (SDMO) (HOOK, ABRAMS, 2012).

Na fase mais tardia da sepse, são liberados mediadores anti-inflamatórios (IL-4, IL-10, receptores solúveis de TNF- α e antagonista do receptor de IL-1) para compensar e modular os efeitos destrutivos da resposta inflamatória aguda (MILLS et al., 1989; BONE, 1991; STEARNS et al., 2011). Os monócitos/macrófagos são importantes ativadores também da resposta imune adaptativa que, ao fagocitarem células necróticas ou bactérias induzem os linfócitos a assumir um fenótipo Th1, levando à liberação de substâncias pró-inflamatórias, como interferon alfa (INF- α), interferon delta (INF- δ) e IL-2; se fagocitam células apoptóticas, ativam o fenótipo Th2, produzindo substâncias anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 (SIQUEIRA- BATISTA, 2011).

O termo “tempestade de citocinas” surgiu na década de 1990, quando associaram sepse a uma liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias (AIKAWA, 1996). Entretanto, hoje sabe-se que a evolução dos quadros de sepse está na regulação do equilíbrio pró/anti-inflamatório. Novos estudos têm proposto que a fase inicial de hiperinflamação é seguida por um consequente estado prolongado de imunossupressão na fase tardia, referido como “imunoparalisia” induzida por sepse ou “síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória” (CARS) (PECK, 2007, GERMAIN, 2012). Este estado é caracterizado por resposta imune inata e adaptativa prejudicada, podendo desempenhar um papel fundamental na patogênese de danos nos tecidos, falência de múltiplos órgãos e morte induzida por sepse. (HOTCHKISS, OPAL, 2010).

2.4. Citocinas e sepse

Citocinas são uma classe funcional de pequenas proteínas mediadoras com baixo peso molecular (<40 kDa), produzidas de forma regulada para afetar a ativação e diferenciação da resposta imune. Uma vez liberadas, as citocinas pró-inflamatórias recrutam células imunes distantes e ativam outros elementos sanguíneos (células endoteliais, plaquetas, fibroblastos) através da ligação de seus receptores de

superfície, contribuindo para a resposta inflamatória tardia (BLACKWELL, CHRISTMAN, 1996).

O TNF- α parece ser o mediador chave na sepse, derivado de células imunitárias ativas e também fibroblastos em resposta a estímulos infecciosos ou inflamatórios. A liberação de TNF- α ocorre cerca de 30 minutos após o estímulo, conduzindo ativação de outras células do sistema imunológico e a liberação de uma série justaposta de outros mediadores. Do mesmo modo, a IL-1 é liberada rapidamente e com efeitos comparáveis ao TNF- α , agindo sinergicamente, ambas induzem um estado semelhante ao choque séptico, caracterizado por permeabilidade vascular, edema e hemorragia pulmonar grave (DINARELLO, 1997). Também foram identificadas como mediadores cruciais para o desenvolvimento da febre e, assim, pertencem ao grupo de citocinas pirogênicas (O'NEILL, 2008).

A função da IL-6 na sepse é mediar resposta de fase aguda, caracterizada por febre, leucocitose e liberação de proteínas hepáticas tais como a proteína C-reativa, fibrinogênio e ferritina. É produzida por uma grande variedade de células, especialmente células dendríticas, macrófagos, linfócitos, células endoteliais e fibroblastos, em resposta a estimulação com lipopolissacarídeo, IL-1 e TNF- α (SCHELLER, ROSE-JOHN, 2006). Níveis plasmáticos elevados de IL-6 estão correlacionados com choque séptico, DMSO e alta mortalidade (DINARELLO, 1997).

Estudos revelaram que a IL-10 tem função amplamente anti-inflamatória na sepse, suprimindo a ação dos mediadores pró-inflamatórios e estimulando a produção dos receptores solúveis IL-1Ra, IL-1R2 e sTNFRs, antagonizando os efeitos de IL-1 e TNF- α . É produzida por monócitos, macrófagos, linfócitos T, B e células Natural Killers (NK) (LATIFI et al., 2002, CIANCIARULLO et al., 2008; FRACASSO, 2008).

A IL-4 promove a diferenciação de linfócitos T em células do tipo Th2 e inibe Th1, caracterizando um perfil anti-inflamatório na sepse. Causa a liberação de mais IL-4 e

outras citocinas anti-inflamatórias, suprimindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Vários estudos indicam que a IL-4 desempenha um papel na fase tardia da sepse, no entanto, sua função precisa no curso da doença ainda permanece desconhecida (OPAL, DePALO, 2000).

2.5. Modelos experimentais de sepse

Diversos modelos animais tem sido utilizados para estudar a fisiopatologia da sepse com o desafio de representar a complexidade clínica da sepse humana. Os dois modelos mais frequentemente utilizados nos experimentos para indução de sepse são ligadura com perfuração cecal (LPC) e administração de lipopolissacarídeo (LPS) (ZANOTTI-CAVAZZONI, GOLDFARB, 2009).

O modelo LPC, foi descrito pela primeira vez por Wichterman et al. (1980), sendo ainda hoje o mais empregado nas pesquisas científicas pois mimetiza diversos aspectos da sepse humana como a que ocorre durante traumas com perfuração de alças intestinais, colite ou peritonite pós-operatória. Este modelo possui a vantagem de ser possível controlar o grau de severidade da sepse através da extensão do ceco ligado ou quantidade e tamanho de perfurações realizados no ceco (BURAS et al., 2005).

Os modelos de indução de sepse por LPS e LPC apresentam o mesmo nível de mortalidade, mas são significativamente diferentes quanto a cinética e produção de citocinas. O modelo LPC apresenta um padrão na produção de mediadores inflamatórios muito semelhante ao que ocorre na sepse humana, favorecendo o conhecimento dos componentes imunológicos e identificação de novos potenciais alvos terapêuticos (DEJAGER et al., 2011).

2.6. Hev b 13

É uma proteína homóloga alergênica, com 391 aminoácidos na sua sequência de DNA e peso molecular de 42,98 kDa. Obtida a partir do látex natural da *Hevea brasiliensis*, popularmente conhecida como “seringueira”, possui atividades de lipase e esterase, que podem estar associados a defesa de plantas (ARIF et al, 2004).

No látex da *Hevea brasiliensis* predominam três tipos de partículas suspensas em soro: partículas de borracha que constituem 30 a 45% (em massa) do látex (F1), os lutóides que constituem 10 a 20% (F2) e os chamados complexos de Frey-Wyssling (F3). Na fração F2 e F3 contêm diversos componentes químicos como proteínas (solúveis e insolúveis), fosfolipídios, sais minerais, carotenóides e lipídios cujas propriedades biológicas vem sido estudadas e determinadas em modelos animais (AGOSTINI, 2009).

A membrana de borracha natural, juntamente com a fração F2, mostrou atividade angiogênica e neoformação em dorso de coelhos (MENDONÇA, 2004), membrana córioalantóidea de ovos embrionados de galinha (MENDONÇA, 2008), esôfago e parede abdominal de cães (MRUÉ, 2000) e dorso de ratos (ANDRADE, 2012).

A Hev b 13 (derivada da fração F3) utilizada para estimular macrófagos e monócitos humanos *in vitro*, aumentou a produção de IL- 10 e TGF- β . Além disso, reduziu TNF- α , IL- 1 β e IL- 6, abrindo caminhos para pesquisa de reações imunológicas mediadas por essa fração (TEIXEIRA et al., 2012a). No mesmo estudo, em modelo experimental de artrite em joelhos de camundongos, o tratamento com a Hev b 13 demonstrou melhoria notável nas alterações histopatológicas de hiperplasia sinovial, erosão óssea e infiltrado inflamatório, indicando que a Hev b 13 tem potencial anti-inflamatório (TEIXEIRA et al., 2012a).

Outro estudo publicado, dessa vez empregando modelo de colite experimental em camundongos, os animais tratados com a Hev b 13 demonstraram evidências clínicas de melhora como redução de episódios de diarreia, prolapso retal e perda de peso,

além de redução no infiltrado inflamatório e áreas hemorrágicas nas análises morfológicas, destacando mais uma das suas possíveis aplicações no tratamento de doenças imunoinflamatórias (TEIXEIRA et al., 2012b). Tendo em vista esse potencial, o presente estudo foi desenhado para investigar os efeitos da proteína Hev b 13 na resposta inflamatória, bem como sua repercussão nas disfunções orgânicas associadas a sepse.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do tratamento com a proteína da Hev b 13 na resposta inflamatória de ratos com sepse experimental.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Contabilizar leucócitos totais e diferenciais no sangue dos animais 1, 6 e 24 horas após submetidos ao tratamento com diferentes doses da proteína Hev b 13.

3.2.2. Quantificar a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-4, IL-10) no soro dos animais com sepse, após 1, 6 e 24 horas de tratamento com diferentes doses da proteína Hev b 13.

3.2.3. Quantificar a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-4, IL-10) no tecido pulmonar e hepático dos animais com sepse, após 1, 6 e 24 horas de tratamento com diferentes doses da proteína Hev b 13.

3.2.4. Analisar a histologia do tecido pulmonar e hepático dos animais com sepse, após 1, 6 e 24 horas de tratamento com diferentes doses da proteína Hev b 13.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção da proteína Hev b 13

A proteína Hev b 13, derivada do soro do látex de *Hevea brasiliensis*, foi fornecida pelo Laboratório Pele Nova Biotecnologia (Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil - lote 1502-243).

4.2. Animais para experimentação

Foram utilizados 60 *Rattus norvegicus albinus* linhagem *Wistar*, machos adultos, apresentando peso corpóreo entre 200 e 300 gramas, procedentes do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC - GO. Os animais foram alojados em gaiolas individuais de polipropileno, com piso sólido e forradas com maravalha, conforme padrões internacionais e Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório - SBCAL. O ambiente foi mantido em temperatura média de 21°C, sistema de ventilação, ciclo de claro-escuro, dieta específica para espécie (Purina) e água *ad libitum*. O experimento teve início após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da PUC - GO (protocolo nº0008/1).

4.3. Indução de sepse

A sepse foi induzida utilizando o modelo de ligadura e perfuração cecal (LPC), conforme descrito por Wichtermann et al. (1980), com adaptações. Os animais foram anestesiados por via intramuscular na face anterior da coxa direita, com uma mistura de cloridrato de xilazina 2% (Syntec - São Paulo - Brasil) na dose de 2,5mg/kg e cloridrato de cetamina 10% (Syntec- São Paulo - Brasil) na dose de 50mg/kg, e então submetidos a tricotomia e antissepsia da pele, seguida de laparotomia mediana com cerca de 1 cm de comprimento para permitir a exposição do ceco e áreas adjacentes. Posteriormente, foi realizada uma ligadura do ceco, com fio de seda 3.0 em sua base,

abaixo da válvula ileocecal, e perfurado duas vezes com agulha calibre 14. Este, então, foi delicadamente pressionado para provocar a saída de fezes pelo local perfurado e devolvido a cavidade peritoneal. A parede abdominal foi suturada em dois planos com “mononylon” 4-0, com chuleio simples. No 1º plano a aponeurose e o peritônio em conjunto; e no 2º plano, a pele (Figura 2). No final do procedimento cirúrgico, todos os animais foram colocados na estufa a 37º C durante 20 minutos para evitar hipotermia, em seguida, hidratados com 5 mL de soro ringer lactato (Sanobiol - São Paulo - Brasil), dose única via subcutânea. Após, foram devolvidos nas gaiolas, alimentados com ração própria para espécie e água *ad libitum*. A analgesia foi realizada com cloridrato de nalbufina (Cristália - São Paulo - Brasil) na dose de 0,1 mg/kg subcutâneo de 8 em 8 horas.

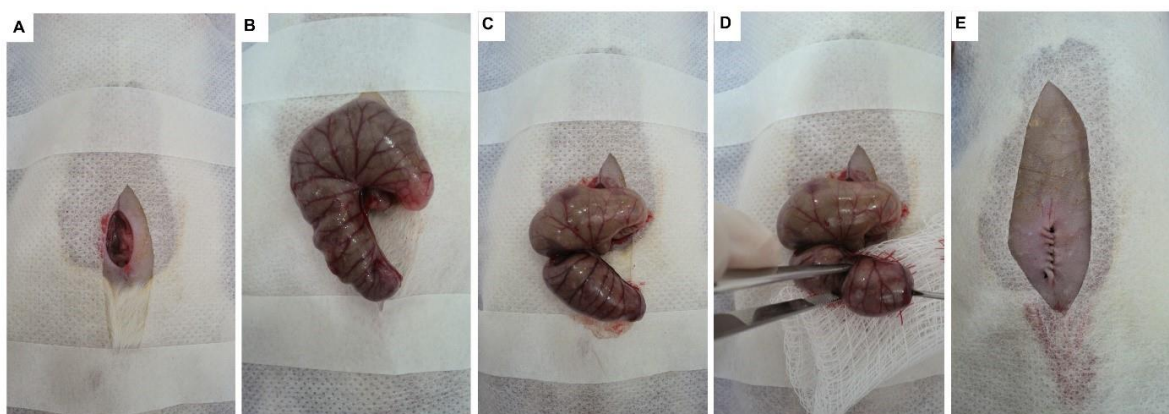


Figura 2. Método de indução de sepse por ligadura e perfuração cecal (LPC). Laparotomia mediana (A). Exposição do ceco (B). Ligadura do ceco (C). Perfuração do ceco com agulha calibre 14 (D). Sutura da parede abdominal (E).

4.4. Grupos e tratamentos

Após seis horas de LPC, os animais foram randomizados em 4 grupos com n=24 e assim tratados: 1 - controle LPC, tratamento com solução fisiológica subcutânea (SC) 0,9%; 2 - tratamento com dose única 0,5 mg/kg subcutânea de Hev b 13; 3 - tratamento com dose única 2,0 mg/kg subcutânea de Hev b 13; 4 - tratamento com dose única 3,0 mg/kg subcutânea de Hev b 13. Posteriormente, os animais foram subdivididos em três

pontos diferentes de tempo (1, 6 e 24 horas após os tratamentos n=8), para eutanásia com dose letal de tiopental (Figura 3).

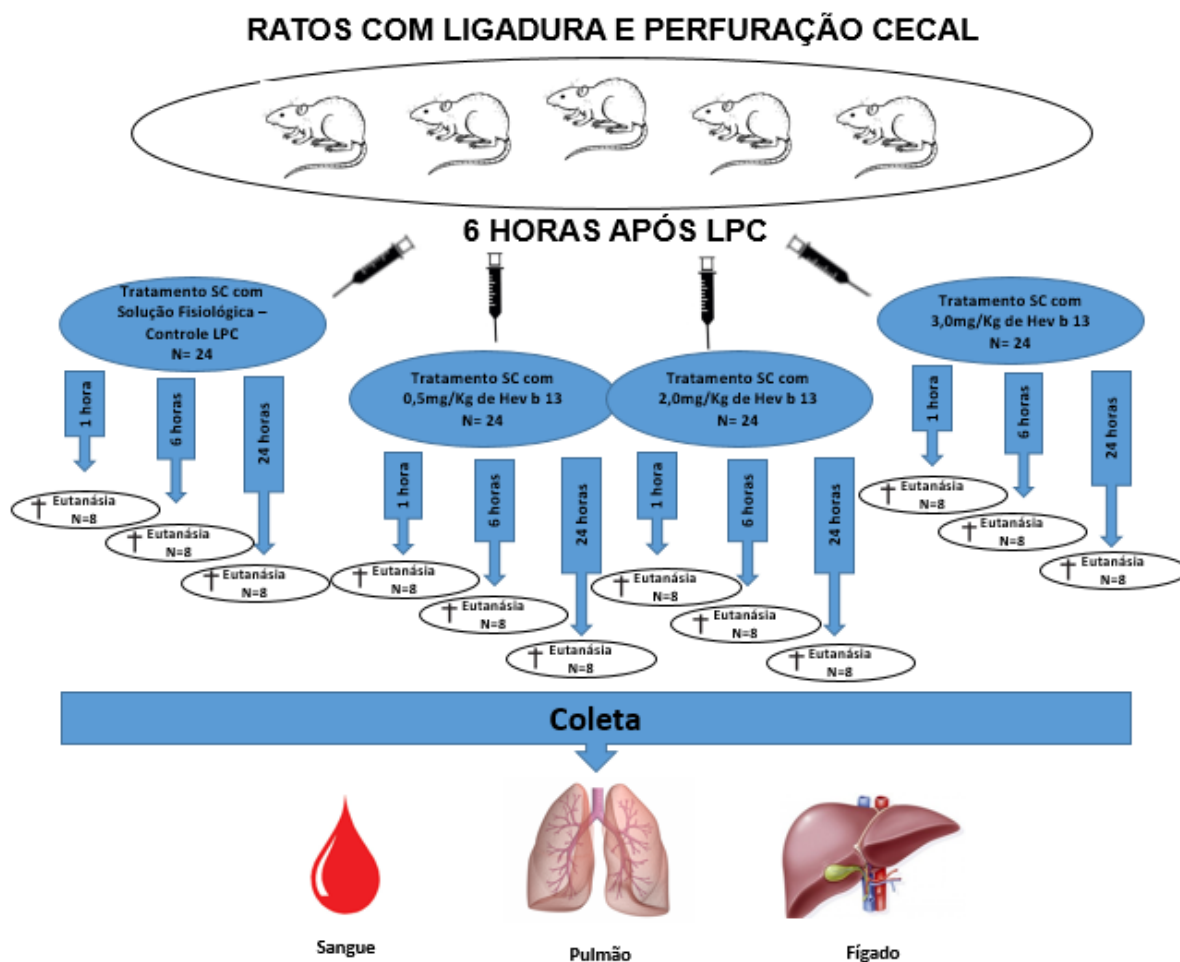


Figura 3. Esquema de delineamento experimental dos diferentes grupos e respectivos tratamentos.

4.5. Coleta de amostras

Após a administração do anestésico para eutanásia, foi coletado 8 mL de sangue por meio de punção intracardíaca e depositado em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Confirmado o óbito, fragmentos de pulmões e fígado também foram retirados e pesados em balança de precisão, acondicionados em tubos com 200 μ L de solução salina fosfato (PBS) 1X e 1% de inibidor de protease (Sigma - Missouri - USA), em seguida, congelados no freezer -80°C até o preparo para dosagens. O remanescente dos órgãos foi colocado em solução de formaldeído a 10%. As mesmas

amostras de material biológico foram retiradas também de animais hígidos para obtenção de imagem e valores de referência.

4.6. Leucograma

Parte das amostras de sangue foram diluídas em líquido de Turk 1:20 (Audaz Reagentes Tecnológicos - São Paulo - Brasil), lisando células anucleadas e pipetadas na câmara de Neubauer para visualização e contagem total dos leucócitos em microscópio óptico (Nikon, Modelo - Eclipse E – aumento de 400X). Para contagem diferencial, foram confeccionados esfregaços de novas amostras de sangue e corados com Panótico (Laborclin - Paraná - Brasil), para identificação dos leucócitos através das suas especificidades morfológicas.

4.7. Detecção de citocinas

4.7.1. Preparo do plasma

O sangue foi centrifugado à 1000 rpm, durante 30 minutos em temperatura de 4°C para separação do plasma. Em seguida, o plasma foi pipetado cuidadosamente e transferido para tubos com alíquotas de no máximo 500 µL, sendo estes acondicionados no freezer -80°C até as dosagens.

4.7.2. Preparo das amostras de tecido

Os fragmentos de pulmão, baço e fígado foram descongelados e acrescidos de 15 mL/mg de PBS 1X e 10% de solução de lise (Tampão de Tris - 100mM Tris - HCL, 1.5 M NaCl, 10% TRITON X-100, 50 mM EDTA), macerados manualmente, homogeneizados pelo aparelho Ultra Stirrer (Scientific SDN BHD - Ehsan - Malasya) e posteriormente, centrifugados à 10000 rpm (ANDRADE, 2007). Utilizou-se o sobrenadante do macerado das amostras para as dosagens, seguindo protocolo realizado pelo Laboratório de Citocinas do Instituto de Patologia Tropical de Saúde

Pública da Universidade Federal de Goiás - UFG e conforme instruções recomendadas pelo fabricante dos kits de ensaio (BD - Biosciences - São Paulo - Brasil).

4.7.3. Ensaio imunoenzimático (Elisa)

Placas de 96 poços (Jetbiofil - Guangzhou - China) foram cobertas com 80µL/poço de anticorpo de captura (2,5 µL/mL), específico para cada citocina. Estes anticorpos foram diluídos em tampão de carbonato pH 9,0 (TNF-α/IL-6) ou PBS 1X (IL-10/ IL-4) e incubados por 24 horas à 4°C. As placas foram lavadas 5X com PBS-Tween-20. As ligações não específicas foram bloqueadas com 160 µL de PBS1X/ Soro bovino fetal 3% por 1 hora em temperatura ambiente e, posteriormente, lavados 5X com PBS-Tween. As amostras (soro ou sobrenadante) e o padrão foram adicionados em duplicata na placa (80 µL/poço), sendo o padrão diluído em 80 µL de PBS1X/SBF 3% (diluição seriada) e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram lavadas 5X com PBS/Tween, adicionados anticorpos biotilizados específicos de cada citocina e incubados por mais 1 hora. Ao término do tempo, as placas foram lavadas, acrescidas de 80 µL/poço do conjugado estreptoavidina peroxidase e incubadas por mais 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas novamente 10X com PBS/Tween, adicionado 50 µL/poço de tetrametilbenzida e incubadas por 10 a 15 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 20 µL de H₂SO₄ (Ácido Sulfúrico) e a placa foi colocada em leitora de Elisa 455/620nm (Multiskan).

4.8. Histologia

4.8.1. Confeção das lâminas

Os órgãos seccionados (pulmão e fígado) foram preparados em cassetes, fixados em solução de formol tamponado por 24 horas, mergulhados em álcool absoluto e xilol para posterior inclusão na parafina e catalogação. Cada bloco de parafina foi

seccionado em micrótomo Spencer a 5µm de espessura, onde as fitas de tecido obtidas foram imersas em água quente para serem distendidas na lâmina. Os cortes obtidos foram transferidos para uma estufa onde ficaram por 10 minutos em suporte inclinado para secagem a 60°C. Para finalizar, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e acrescidas de resina sintética para conservação.

4.8.2. Análise histopatológica

As lâminas (n=8) foram examinadas por um patologista experiente de forma cega aos tratamentos, em microscópio de luz utilizando aumento de 200X (100 campos por seção). As alterações nos tecidos foram classificadas em: (0) ausente (0% área); (1) leve (25% área); (2) moderada (50% da área); (3) acentuada (75% da área), (4) severa (100% área) nas seguintes categorias para tecido pulmonar: infiltração de neutrófilos, edema intersticial, hiperemia, hemorragia, espessamento e necrose. No tecido hepático as categorias foram infiltrado inflamatório parenquimatoso, infiltrado inflamatório sinusoidal, hemorragia e necrose. A soma das pontuações obtidas em cada categoria foi utilizada para análise semiquantitativa (ZHOU, et al 2015).

4.9. Análise estatística

A estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism versão 6.05 (Inc. San Diego, CA, USA), e os resultados apresentados contendo média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) e Tuckey foram utilizados para testar as diferenças significativas do leucograma e níveis de citocinas. O teste Kruskal-Wallis foi empregado para comparar as categorias histológicas. Para todas as análises foi adotado nível de significância no valor de $p < 0,05$.

5. ARTIGO 1

Protein from *Hevea brasiliensis* “Hev b 13” latex attenuates systemic inflammatory response and lung lesions in rats with sepsis

L. A. Araújo^{a*}, P. R. Melo-Reis^{b,f}, F. Mrue^c, C. M. Gomes^c, M. A. P. Oliveira^d, H. M. Silva^e, M. M. Alves^f and N. J. Silva-Júnior^{c,f}

^aDoutorado em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, ICB IV, Avenida Esperança, Setor Itatiaia, Goiânia, GO, 74001-970, Brasil

^bDepartamento de Biomedicina e Farmácia, Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos - LEB, Área V, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Campus I Setor Universitário, Goiânia, GO, CEP 74605-140, Brasil

^cDepartamento de Medicina, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Área IV, Campus I, Setor Universitário, Goiânia, GO, CEP 74605-010, Brasil

^dInstituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Setor Universitário, Goiânia, GO, CEP 74605-050, Brasil

^eFaculdade de Medicina, Centro Universitário UNIRG, Campus II, Centro, Gurupi -TO, CEP 77403-090, Brasil

^fPrograma de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Área V, Setor Universitário, Goiânia, GO, CEP 74.605-140, Brasil

Aceito na revista: Brazilian Journal of Biology – Fator de impacto atual: 0.883

Protein from *Hevea brasiliensis* “Hev b 13” latex attenuates systemic inflammatory response and lung lesions in rats with sepsis

L. A. Araújo^{a*}, P. R. Melo-Reis^{b,f}, F. Mrue^c, C. M. Gomes^c, M. A. P. Oliveira^d, H. M. Silva^e, M. M. Alves^f and N. J. Silva-Júnior^{c,f}

^aDoutorado em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, ICB IV, Avenida Esperança, Setor Itatiaia, Goiânia, GO, 74001-970, Brasil

^bDepartamento de Biomedicina e Farmácia, Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos - LEB, Área V, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Campus I Setor Universitário, Goiânia, GO, CEP 74605-140, Brasil

^cDepartamento de Medicina, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Área IV, Campus I, Setor Universitário, Goiânia, GO, CEP 74605-010, Brasil

^dInstituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Setor Universitário, Goiânia, GO, CEP 74605-050, Brasil

^eFaculdade de Medicina, Centro Universitário UNIRG, Campus II, Centro, Gurupi -TO, CEP 77403-090, Brasil

^fPrograma de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Área V, Setor Universitário, Goiânia, GO, CEP 74.605-140, Brasil

Corresponding author: lilhianalves@gmail.com

(With 3 figures, 3 tables)

Palavras -chave: Hev b 13, *Hevea brasiliensis*, resposta inflamatória, sepsis

Keywords: Hev b 13, *Hevea brasiliensis*, inflammatory response, sepsis

(Running title - Hev b 13 attenuates acute septic response)

Abstract: Sepsis induces a severe systemic inflammatory response that may result in multiple organ dysfunction and death. Studies using a protein derived from natural *Hevea brasiliensis* (rubber tree) latex, denominated Hev b 13, have demonstrated important anti-inflammatory effects, but no data have been published regarding its effects on sepsis. The aim of this study was to investigate the effects of Hev b 13 on the inflammatory response and lung lesions of septal rats. Male Wistar rats were submitted to cecal ligation and puncture (CLP), randomized into groups and treated with subcutaneously administered doses of 0.5/2.0/3.0 mg/Kg of Hev b 13. Next, animals were subdivided into three different points in time (1, 6 and 24 hours after treatments) for collection of blood samples and euthanasia accompanied by organ removal. Total and differential leukocyte counts, cytokine dosage and histological assessment were analyzed. Treatment with Hev b 13 resulted in a significant decline in total and differential leukocytes as well as suppression of TNF- α and IL-6 production, associated with the increase in IL-10 and IL-4 in plasma and lung tissue. Moreover, it reduced morphological and pathological changes found in the lungs, including neutrophil infiltration, edema and alveolar thickening. The present study concluded that Hev b 13 exerts anti-inflammatory effects and attenuates lung lesions in septal rats, showing potential for clinical application.

Proteína do latex de *Hevea brasiliensis* “Hev b 13” atenua resposta inflamatória sistêmica e lesão pulmonar de ratos com sepse

Resumo: Sepse induz uma resposta inflamatória sistêmica grave podendo resultar em disfunção de múltiplos órgãos e morte. Pesquisas utilizando uma proteína derivada do látex natural de *Hevea brasiliensis* (seringueira), denominada Hev b 13 tem demonstrado importantes efeitos anti-inflamatórios, mas nenhum dado foi publicado dos seus efeitos na sepse. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da Hev b 13 na resposta inflamatória e na lesão pulmonar de ratos com sepse. Ratos machos da linhagem Wistar foram submetidos a ligação e perfuração do ceco (LPC), randomizados em grupos e tratados com as doses 0,5/2,0/3,0 mg/Kg de Hev b 13 subcutâneo. Após subdividiu-se os animais em três pontos diferentes de tempo (1, 6 e 24 horas após os tratamentos) para coleta de amostras sanguíneas e eutanásia com remoção dos órgãos. Contagem total e diferencial de leucócitos, dosagem de citocinas e avaliação histológica foram analisadas. O tratamento com a Hev b 13 resultou em diminuição significativa de leucócitos totais e diferenciais bem como suprimiu a produção de TNF- α e IL-6, associado ao aumento de IL-10 e IL-4 no plasma e tecido pulmonar. Além disso, reduziu as alterações morfológicas e patológicas encontradas nos pulmões, incluindo infiltrado de neutrófilos, edema e espessamento alveolar. Este estudo concluiu que a Hev b 13 tem efeitos anti-inflamatórios e atenua lesões pulmonares em ratos com sepse, apresentando potencialidades para aplicabilidade clínica.

1. Introduction

Sepsis is defined as life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection (Shankar-Hari et al., 2016). Despite recent advances in surgical techniques and intensive medicine, global mortality of patients with sepsis remains high, ranging between 30% and 50%. Sepsis, responsible for 200,000 deaths per year in the United States, has become the primary cause of death in hospitals in the 21st century (Iwashyna et al., 2012; Kaukonen et al., 2014).

During the development of sepsis, bacterial components activate transmembrane recognition proteins, also called toll like receptors (TLRs), which recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). These initiate an immunological cascade resulting in the release of pro-inflammatory interleukins, including the tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin (IL) 1, IL-2, IL-6, IL-8, and IL-12, among others (Bin et al., 2016). Overproduction of these inflammatory mediators (cytokine storm) induces vasodilation, increased capillary permeability, hypotension, hemoconcentration, macromolecular leakage and edema, and may lead to multiple organ dysfunction syndrome (MODS), where the lungs are the most frequently affected (Matsuda et al., 2006; Stearns et al., 2011; Ates et al., 2015).

The response of the host to pathogenic agents must be strictly regulated since the consequences of exacerbated inflammation may be more lethal than the original pathogenic aggression itself. In addition to the intense pro-inflammatory activity, anti-inflammatory interleukins IL-4, IL-5, IL-10, IL-11 and IL-13 are also produced. These are directly implicated in the weakening of responses to etiological agents, generating the compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) (Ward Pa, 2011). This is more intense in situations where the patient survives the disturbances related to systemic inflammation (Gomes et al., 2016).

To date, there are no effective drugs on the market to counterbalance the acute inflammatory response. One of the promising therapies for sepsis is recombinant human activated protein C (drotrecogin alfa). Despite being a potent anticoagulant and its recognized anti-inflammatory role in reducing lethality when administered early in patients with high risk of death, its effectiveness was questioned after the occurrence of serious hemorrhagic episodes (Ranieri et al., 2012). Thus, new therapeutic approaches that might decrease mortality associated with this serious condition are highly valuable.

Hev b 13, a protein derived and purified from *Hevea brasiliensis* latex, was capable of potentiating human mononuclear cells in the presence of phytohemagglutinin, to produce IL- 10 and TGF- β . Furthermore, it inhibited TNF- α , IL- 1 β and IL- 6 production (Teixeira et al., 2012a). In other experiments using animal models of ulcerative colitis and rheumatoid arthritis, treatment with the Hev b 13 fraction demonstrated an important regression of the lesions under study (Teixeira et al., 2012ab). The ability of Hev b 13 to inhibit pro-inflammatory and stimulate anti-inflammatory cytokine production suggests that this protein may modulate systemic inflammatory response syndrome - SIRS. Thus, the aim of this study was to investigate the effects of Hev b 13 on inflammatory response, as well as its repercussion on pulmonary dysfunction in rats with experimentally-induced acute sepsis.

2. Material and Methods

2.1 Obtaining protein Hev b

The protein fraction Hev b 13, derived from the serum of *Hevea brasiliensis* latex, was kindly donated by the Pele Nova Biotechnology Laboratory in Ribeirão Preto, São Paulo state, Brazil (batch no. 1502-243).

2.2 Experimental animals

Adult male Wistar *Rattus norvegicus albinus* rats, weighing between 200 and 300 grams, obtained from the Central Vivarium of the Pontifical Catholic University of Goiás (PUC- GO), were used. The experiment, which followed international guidelines and those of the Brazilian Society of Laboratory Animal Sciences (SBCAL), was approved by the Animal Ethics Committee of PUC-GO under protocol no. 0008/1.

2.3 Sepsis induction by cecal ligation and puncture (CLP)

The animals were intramuscularly anesthetized in the anterior surface of the right thigh with a mixture of 2% xylazine hydrochloride (2.5mg/kg) and 10% ketamine hydrochloride (50mg/kg - Syntec - São Paulo - Brazil), and then submitted to midline laparotomy with a 1-cm-long incision to expose the cecum and adjacent areas. Next, cecal ligation was performed with a 3.0 silk thread at the base, below the ileocecal valve, and punctured twice with a 14- gauge needle. The cecum was then pressed to induce fecal evacuation through the punctured area and returned to the peritoneal cavity. The abdominal wall was sutured in two layers with 4.0 mononylon and simple running sutures (Abd El-Latif AA et al., 2016). Finally, hydration was performed with a single subcutaneous 5 mL dose of Ringer's lactate and the animals were returned to their cages, fed the appropriate ration for the species and given water *ad libitum*.

2.4 Groups and treatments

Randomization was carried out 6 hours after sepsis-induced surgery in 4 groups: rats submitted to cecal ligation and puncture and treated only with 0.9% saline solution (CLP control group); rats submitted to CLP and treated with a single dose of 0.5mg/2.0mg/ and 3.0mg/Kg of protein Hev b 13 (groups Hev b 13 dose 0.5/2.0 and 3.0mg/Kg). The animals were then subdivided into three different points in time (1, 6 and 24 hours after the treatments), for anesthesia and blood collection via cardiac puncture, followed by euthanasia and removal of the

lungs. The same biological material was also collected from healthy animals to obtain reference values.

2.5 Leukogram

Blood samples were diluted in Turk's solution (Audaz Reagentes Tecnológicos - São Paulo - Brazil) and pipetted in a Neubauer chamber for visualization and total leukocyte count under optical microscope (Nikon, Eclipse E – 400X magnification). For differential counting, swabs of new blood samples were taken and stained with Panótico (Laborclin - Paraná - Brazil) to identify leukocytes by their morphological specificities.

2.6 Cytokine detection

2.6.1 Plasma preparation

The blood collected was deposited in tubes with ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and centrifuged at 1000 rpm, for 30 minutes at a temperature of 4°C to separate the plasma, then aliquoted and stored in a freezer at -80°C until dosing.

2.6.2 Preparation of tissue samples

Fragments of lung were removed and weighed on a precision scale, stored in tubes with 200 µL of 1X phosphate buffered saline (PBS) and 1% protease inhibitor (Sigma - Missouri - USA), and kept in the freezer at -80°C until dosing. The tubes were thawed and added with 15 mL/mg of 1X PBS and 10% lysis buffer (Tris buffer - 100mM Tris - HCL, 1.5 M NaCl, 10% TRITON X-100, 50 mM EDTA), manually macerated, homogenized using an Ultra Stirrer (Scientific SDN BHD, Ehsan, Malaysia) and then centrifuged at 10,000 rpm (Gokcinar et al.,2013). The supernatant from the macerate was used for doses.

2.6.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa)

The concentrations of TNF- α , IL-6, IL-10 and IL4 were determined using immunoenzymatic assay kits (BD- Biosciences), according to manufacturer's recommendations. All the plasma and supernatant samples were measured in duplicate.

2.7 Histological analysis

Lungs were immersed in 10% buffered formalin and routinely included in paraffin. Strips of tissue were cut at a thickness of 5 μ m, mounted on slides and stained with hematoxylin-eosine. The slides (n=8) were examined by an experienced pathologist blind to the treatments, under a light microscope using 200X magnification (100 fields per section). Lung tissue lesions were classified as (0) normal (0% of the area); (1) mild (25%); (2) moderate (50%); (3) significant (75%), (4) severe (100%) in the following categories: neutrophil infiltration, interstitial edema, hyperemia, hemorrhage, thickening and necrosis. The sum of the scores obtained in each category was used in semiquantitative analysis (Zhou, et al 2015).

2.8 Statistical Analysis

Statistics were analyzed using the GraphPad Prism 6.05 program (San Diego, CA, USA), and the results presented as mean \pm standard deviation. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test were used to check for significant leukogram and cytokine level differences. The Kruskal-Wallis test was used to compare histological categories. A significance level of $p < 0.05$ was adopted for all analyses.

3. Results

3.1 Effects of treatment with Hev b 13 on the leukogram

The animals submitted to CLP (CLP control) exhibited progressive leukocytosis in accordance with sepsis evolution. However, the increase in total, mature and basophil leukocytes in the groups treated with Hev b 13 at all doses (0.5/2.0/3.0mg/kg) was significantly lower than

in the CLP control group after 1 hour of treatment ($p < 0.05$; Table 1). The same occurred in nearly all leukocyte types at 6 and 24 hours, except for eosinophils (Tables 2 and 3). There was no significant difference in leukocyte values among the treatments.

3.2 Effects of Hev b 13 on plasma cytokines

3.2.1 TNF- α and IL-6

Analysis of CLP controls, whose animals were not treated, showed that plasma levels of TNF- α reached their production peak in 1 hour, declining according to sepsis evolution (Figures 1 A, B and C). In animals treated with doses of 2.0 and 3.0mg/kg of Hev b 13, there was a significant reduction in TNF- α levels in relation to CLP controls after 1 and 6 hours of treatment ($p < 0.05$; Figure 1 A, B). No significant difference was observed between doses in terms of reducing TNF- α levels. IL-6 exhibited its production peak at 6 hours (Figure 1 D, E and F), and was significantly lower after treatment with all doses of Hev b 13 ($p < 0.05$). At the other times, there was no significant reduction in IL-6 (Figure 1 D and F).

3.2.2 IL-10 and IL-4

The production peak of IL-10 was detected at 6 hours (CLP control in Figure 1 G, H and I). After treatment with 2.0mg/kg of Hev b 13, the plasma levels of IL-10 rose significantly in relation to CLP control at 1 and 24 hours ($p < 0.05$; Figure G and I). At all times, the 2.0mg/Kg dose was more active in increasing IL-10 production than the other treatments (Figure G, H and I). Finally, the dose of IL-4 in plasma reached its production peak in 1 hour, and treatment with a dose of 2.0mg/Kg was responsible for significantly increasing its concentrations in relation to CLP controls at all times ($p < 0.05$; Figure 1 J, L and M). The dose of 3.0mg/Kg also significantly increased IL-4 concentrations compared to CLP controls, but only at a time of 1 hour (Figure J). Among the treatments, the 2.0mg/kg dose was the most active in increasing IL-4 concentration, mainly when compared to the dose of 0.5mg/Kg.

3.3 Effects of Hev b 13 on lung tissue cytokines

3.3.1 TNF- α and IL-6

In lung tissue, the results demonstrated that the production peak of TNF- α and IL-6 occurred at 1 hour in the CLP groups (Figure 2 A and D). After treatment with a dose of 2.0mg/Kg, there was a significant decline in TNF- α levels at 1 and 24 hours ($p < 0.05$; Figure 2 A and C), and IL-6 at 24 hours (Figure 2 F). The 3.0 mg/kg dose also significantly reduced TNF- α and IL-6 levels in relation to CLP controls, at all treatment times ($p < 0.05$; Figure 2 A, B, C, D, E and F). The 3.0mg/Kg dose was more active in decreasing TNF- α and IL-6 production compared to 0.5mg/Kg at practically all the times.

3.3.2 IL-10 and IL-4

In CLP controls, there was no minimum or maximum production peak for IL-10 in lung tissue, with similar production at all the times analyzed. However, IL-10 was significantly higher at a dose of 2.0mg/Kg at all the times, when compared to CLP controls ($p < 0.05$; Figure 2 G, H and I). The production peak of IL-4 in lung tissue occurred at 6 and 24 hours, with a significant increase after treatment at a dose of 2.0mg/Kg at all times ($p < 0.05$; Figure 2 J, L and M). The 3.0mg/Kg dose also raised IL-4 tissue levels at 1 hour (Figure 2 J).

3.3 Effects of Hev b 13 on pulmonary histology

In CLP controls a number of morphological changes were observed at the first time analyzed, including inflammatory cell infiltration, interstitial edema and lung congestion. These alterations increased gradually with the evolution of sepsis. However, treatments with Hev b 13 at doses of 2.0 and 3.0mg/Kg significantly attenuated these histopathological lesions at 6 and 24 hours ($p < 0.05$; Figure 3 A and B).

4. Discussion

A number of animal models have been used to study the pathophysiology of sepsis. The greatest challenge is to mimic the clinical complexity of human sepsis and test possible therapeutic targets. The CLP method, the most widely used in scientific research, is considered the gold standard (Ercan and Ozdemir, 2015; Bin et al., 2016). In this study, the CLP model was used in rats to investigate the anti-inflammatory effects of Hev b 13 during sepsis.

Subcutaneous administration of Hev b 13 initially resulted in a significant decline in total and differential leukocytes (Tables 1, 2 and 3). During interpretation of these first results, the hypothesis was raised that leukopenia could have been caused by their redistribution from the vascular compartment to the injury site. Leukocytes combat localized infection, preventing systemic dissemination. By contrast, their adherence to the endothelium causes microvessel narrowing, directly influencing blood flow and modulating oxygen supply (Cohen, 2002). These cell infiltrates also release pro-inflammatory cytokines, where TNF- α is especially influential in recruiting more neutrophils, and may directly affect tissue via the accumulation of lysosomal enzymes and free radicals (Hansen et al, 2011; Stearns et al., 2011).

Next, analysis of the other results, with a decrease in TNF- α and IL-6 production associated with a rise in plasma IL-10 and IL-4 (Figure 1) and lung tissue (Figure 2), shows that Hev b 13 exerted dose-dependent anti-inflammatory effects, likely suppressing the release of leukocytes from the bone marrow or lymphoid organs into the blood. In line with the other findings, the administration of Hev b 13 attenuated the morphopathological lesions found in lungs during sepsis, including neutrophil infiltration, edema and alveolar thickening (Figure 3).

The inflammatory response in sepsis is characterized by excess production of pro-inflammatory cytokines, primarily TNF- α , IL-1 β and IL-6, such that production of anti-inflammatory mediators is not adequately counterbalanced, mainly in the initial phase (Sagy et al., 2013). This imbalance in cytokine production causes endothelial lesions, pulmonary edema

and hemorrhage, and may evolve to terminal complications associated with sepsis (MODS) (Zhou et al., 2015). The association between higher concentrations of pro-inflammatory cytokines in the acute phase of sepsis and the unfavorable evolution of organic dysfunctions have been studied and confirmed (Chien et al., 2011; Machado et al., 2011; Saad et al., 2016). Interfering in the excessive production of these mediators during the acute phase of sepsis, as occurred in our study, may result in better prognosis of the disease. Treatments with pro-inflammatory cytokine inhibitors (antibodies, soluble receptors and anti-inflammatory cytokines) have provided advantages in the experimental models of severe sepsis (Opal et al., 1997; Lomas-Neira, 2012).

Studies with Hev b 13 have demonstrated the biological ability of reducing pro-inflammatory cytokine production and increasing anti-inflammatory production of cytokines such as IL-10. The same protein also significantly improved the clinical and histopathological condition of arthritis and colitis in experimental models, suggesting anti-inflammatory potential (Teixeira et al., 2012ab). Thus, the immunomodulating effects of the Hev b 13 fraction in rats with sepsis, induced by injection of *Acinetobacter baumannii* into the peritoneal cavity after lesion in the pancreas and stomach, were investigated during earlier experiments in our laboratory, with a notable increase in IL-10 production and reduction of IL-6 in lung tissue (data not published). Our results corroborate evidence showing that the Hev b 13 protein acts as an anti-inflammatory, and to date no studies have been published regarding its effects on sepsis.

IL-10 is the most important anti-inflammatory cytokine found in human immune response (Opal, DePalo, 2000). In addition to negatively modulating Th1, it deactivates the synthesis of pro-inflammatory cytokines from monocytes/macrophages and inhibits cell migration (Hong et al., 2014). The protective effects of IL-10 in experimental sepsis may be associated with the sepsis induction model (CLP or LPS- lipopolysaccharide) and intervention time (Kalechman et al., 2002), but in general, treating septic rats with IL-10 delays lethality, increases survival, and extends the therapeutic window (Remick et al., 2000). By contrast, IL-10

administered after septic shock, irrespective of induction methodology, may have limited therapeutic benefits, given the prolonged state of immunosuppression in the late phase of the disease (Lafiti et al., 2002). Interleukin-4, the dominant mediator of Th2 profile, is known to play an important role in the pathogenesis of sepsis, but its precise function during the course of the disease remains unknown (Wibke et al., 2013). Preliminary clinical investigations demonstrated the potent anti-inflammatory action of IL-4, with a significant increase in the survival of septic mice exposed to lethal doses of LPS (Baumhofe et al., 1998).

Progressive interstitial edema in the pulmonary vascular endothelium is inherent to the inflammatory process during sepsis, where pro-inflammatory cytokines contribute significantly to this process (Matthay et al., 2012). In this study, a single dose of Hev b 13, administered 6 hours after CLP surgery, was able to attenuate pulmonary lesions caused by sepsis at different points in time. This could be explained by the reduced amount of TNF and IL-6 in the lung tissue of animals. This finding is relevant, given that most patients with severe sepsis develop acute pulmonary lesions (APL), with high morbidity and mortality indices (Gokcinar et al., 2013; Ates et al., 2015).

5. Conclusions

Our results show that Hev b 13 displays anti-inflammatory properties in sepsis associated with a reduction in TNF- α and IL-6, as well as a simultaneous increase in IL4 and IL-10 at both the systemic and tissue level. It also exhibits protective effects against sepsis-related pulmonary organic dysfunctions. Thus, we suggest that dose-dependent treatment with Hev b 13 has therapeutic potential for sepsis during the acute phase. Manipulating immunoregulators will benefit patients with sepsis, and will likely be increasingly used in clinical practice as studies progress. New experiments should be conducted using multiple doses of Hev b 13 involving different organs to elucidate their immunocellular effects on sepsis.

References

1. ABD EL-LATIF, A. A., SAYED, A. A., SOLIMAN, A. M. and FAHMY, S. R., 2016. Exploration of the therapeutic potential effect of *Sepia officinalis* in animal model of sepsis induced by cecal ligation and puncture. *Injury*, vol. 16, pp. 30631-30633. <http://dx.doi.org/10.1016/j.injury.2016.10.003>
2. ATEŞ, I., DOĞAN, N., AKSO, Y. M., HALICI, Z., GÜNDOĞDU, C. and KELES, M. S., 2015. The protective effects of IgM-enriched immunoglobulin and erythropoietin on the lung and small intestine tissues of rats with induced sepsis: Biochemical and histopathological evaluation. *Pharmaceutical Biology*, vol. 53, no. 1, pp. 78-84. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2014.910535>
3. BAUMHOFER, J. M., BEINHAEUER, B. G. and WANG, J. E., 1998. Gene transfer with IL-4 and IL-13 improves survival in lethal endotoxemia in the mouse and ameliorates peritoneal macrophages immune competence. *European Journal of Immunology*, vol. 28, no. 2, pp. 610-615. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199802\)28:02<610::AID-IMMU610>3.0.CO;2-5](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199802)28:02<610::AID-IMMU610>3.0.CO;2-5)
4. BIN, C., YU-LONG, L., SHI-JUN, W., WEI-YUAN, W., XUE-HUI, Z., WEI, H., TONG, L., MENG, Z., NAN, W., GOPAUL, R. and SEM, Z., 2016. Does Citrulline Have Protective Effects on Liver Injury in Septic Rats? *BioMed Research International*, vol. 2016, Article ID 1469590. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/146959>
5. CHIEN, W. S., CHEN, Y. H., CHIANG, P. C., HSIAO, H. W., CHUANG, S. M., LUE, S. I. and HSU, C., 2011. Suppression of autophagy in rat liver at late stage of polymicrobial sepsis. *Shock*, vol. 35, no. 5, pp. 506-511. <http://dx.doi.org/10.1097/SHK.0b013e31820b2f05>

6. COHEN, J., 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 885-891. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01326>
7. ERCAN, M and OZDEMIR, S., 2015. The contribution to studies of the effect of β -glucan on plasma viscosity in a rat sepsis model. *Medical Science and Discovery*, vol. 2, no. 1, pp.148-153. <http://dx.doi.org/10.17546/msd.35215>
8. GOMES, A. P., MIGUEL, P. S. B., ALVES, D. L. S., INOUE, V. H., OLIVEIRA, A. P., CERQUEIRA, F. R., LOPES, T. C. C., SANTANA, L. A., GELLER, M. and SIQUEIRA-BATISTA, R., 2016. Pro-Inflammatory Cytokines in Sepsis: Biological Studies and Prospects From *In Silico* Research. *Biological Systems*, vol. 5, no. 158. <http://dx.doi.org/10.4172/2329-6577.1000158>
9. GOKCINAR, D., ERGIN, V., CUMAUGLU, A., MENEVSE, A. and ARICIOGLU, A., 2013. Effects of ketamine, propofol, and ketofol on proinflammatory cytokines and markers of oxidative stress in a rat model of endotoxemia-induced acute lung injury. *Acta Biochimica Polonica*, vol. 60, no. 3, pp. 451-456.
10. HANSEN, J. D., VOJTECH, L. N. and LAING K. J., 2011. Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins. *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 35, no. 9, pp. 886-897. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.01.008>
11. HONG, T. H., CHANG, C. H., KO, W. J., LIN, C. F., LIU, H. H., CHOW, L. P., HUANG, C. T., YU, S. L. and CHEN, Y. S., 2014. Biomarkers of early sepsis may be correlated with outcome. *Journal of Translational Medicine*, vol. 12, no. 146. <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-12-146>
12. IWASHYNA, T. J., NETZER, G., LANGA, K. M and CIGOLLE, C., 2012. Spurious inferences about long-term outcomes: the case of severe sepsis and geriatric conditions.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol. 185, no. 8, pp. 835-841. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201109-1660OC>

13. KALECHMAN, Y., GAFTER, U., GAL, R., RUSHKIN, G., YAN, D. and ALBECK, M., 2002. Anti-IL-10 Therapeutic Strategy Using the Immunomodulator AS101 in Protecting Mice from Sepsis-Induced Death: Dependence on Timing of Immunomodulating Intervention. *The Journal of Immunology*, vol. 169, no. 1, pp. 384-392.
14. KAUKONEN, K., BAILEY, M., SUZUKI, S., PILCHER, D. and BELLOMO, R., 2014. Mortality Related to Severe Sepsis and Septic Shock Among Critically Ill Patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA*, vol. 311, no. 13, pp.1308-1316. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2014.2637>
15. LAFITI, S. Q., O'RIORDAN, M. A. and LEVINE, A. D., 2002. Interleukin-10 Controls the Onset of Irreversible Septic Shock. *Infection and Immunity*, vol. 70, no. 8, pp. 4441-4446.
16. LOMAS-NEIRA, J., PERL, M., VENET, F., CHUNG, C. S. and AYALA, A., 2012. The role and source of tumor necrosis factor-alpha in hemorrhage-induced priming for septic lung injury. *Shock*, vol. 37, no. 6, pp. 611-620. <http://dx.doi.org/10.1097/SHK.0b013e318254fa6a>
17. MACHADO, F. R., SANCHES, L. C., AZEVEDO, L. C. P., BRUNIALTI, M., LOURENÇO, D., NOGUTI, M. A. and SALOMÃO, R., 2011. Associação entre a evolução da disfunção orgânica e as concentrações de citocinas na fase inicial do choque séptico. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, vol. 23, no.4, pp. 426-433. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-507X2011000400006>

18. MATTHAY, M. A., WARE, L. B., and ZIMMERMAN G. A., 2012. The acute respiratory distress syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 122, no. 8, pp. 2731-2740. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200005043421806>
19. MATSUDA, N. and HATTORI, Y., 2006. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *Journal of Pharmacological Sciences*, vol.101, no. 3, pp. 189-198. <http://dx.doi.org/10.1254/jphs.CRJ06010X>
20. OPAL, S. M. and DePALO, V. A., 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, vol. 117, no. 4, pp. 1162-1172.
21. OPAL, S. M., FISHER, C. J. J., DHAINAUT, J. F., VINCENT, J. L., BRASE, R., LOWRY, S. F., SADOFF, J. C., SLOTMAN, G. J., LEVY, H., BALK, R. A., SHELLY, M. P., PRIBBLE, J. P., LABRECQUE, J. F., LOOKABAUGH, J., DONOVAN, H., DUBIN, H., BAUGHMAN, R., NORMAN, J., DEMARIA, E., MATZEL, K., ABRAHAM, E. and SENEFF, M. 1997. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial. *Critical Care Medicine*, vol. 25, no. 7, pp.1115-1124.
22. RANIERI, V. M., THOMPSON, B. T., BARIE, P. S., DHAINAUT, J. F., DOUGLAS, I. S., FINFER, S., GARDLUND, B., MARSHALL, J. C., RHODES, A., ARTIGAS, A., PAYEN, D., TENHUNEN, J., AL-KHALIDI, H. R., THOMPSON, V., JANES, J., MACIAS, W. L., VANGEROW, B. and WILLIAMS, M. D., 2012. Drotrecogin Alfa (Activated) in Adults with Septic Shock. *The New England Journal of Medicine*, vol. 366, no. 22, pp. 2055- 2064. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1202290>
23. REMICK, D. G., NEWCOMB, D. E., BOLGOS, G. L. and CALL, D. R., 2000. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide versus cecal ligation and puncture. *Shock*, vol. 13, no. 2, pp.110-116.

24. SAAD, D. Y., BAIOMY, A. A and MANSOUR, A. A., 2016. Antiseptic effect of sea cucumber (*Holothuria atra*) against multi-organ failure induced by sepsis: Molecular and histopathological study. *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 12, no. 1, pp.222-230. <http://dx.doi.org/10.3892/etm.2016.3321>
25. SAGY, M., AL-QAQAA, Y. AND KIM, P., 2013. Definitions and pathophysiology of sepsis. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, vol. 43, no. 10, pp. 260-263. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cppeds.2013.10.001>.
26. SHANKAR-HARI, M., PHILLIPS, G. S., LEVY, M. L., SEYMOUR, C. W., LIU, V. X., DEUTSCHMAN, C. S., ANGUS, D. C., RUBENFELD, G. D. and SINGER, M. for the Sepsis Definitions Task Force, 2016. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, vol. 315, no. 8, pp. 775-787. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2016.0289>
27. STEARNS, K. D. J., OSUCHOWSKI, M. F., VALENTINE, C., KUROSAWA, S. and REMICK, D. G., 2011. The pathogenesis of sepsis. *Annual Review of Pathology*, vol. 6, pp. 19-48. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130327>
28. TEIXEIRA, L. B., EPIFÂNIO, V. L. A. A., LACHAT, J. J., FOSS, N. T. and COUTINHO-NETTO, J., 2012a. Oral treatment with Hev b 13 prevents experimental arthritis in mice. *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 168, no. 3, pp. 285-290. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04582.x>
29. TEIXEIRA, L. B., EPIFÂNIO, V. L. A. A., LACHAT, J. J., FOSS, N. T. and COUTINHO-NETTO, J., 2012b. Oral treatment with Hev b 13 ameliorates experimental colitis in mice. *Clinical and Experimental Immunology*, vol.169, no. 1, pp. 27-32. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04589.x>.

30. WARD, P. A., 2011. Immunosuppression in sepsis. *JAMA*, vol. 306, no. 23, pp. 2618-2619. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2011.1831>
31. WIBKE, S., JÜRGEN, B. and RICHARD, B., 2013. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets- An Updated View. *Mediators of Inflammation*, vol. 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/165974>
32. ZHOU, L., GAO, M., XIAO, Z., ZHANG, J., LI, X. and WANG, A., 2015. Protective effect of astaxanthin against multiple organ injury in a rat model of sepsis. *The Journal of Surgical Research*, vol. 195, no. 2, pp. 559-567. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2015.02.026>

Figures and Tables

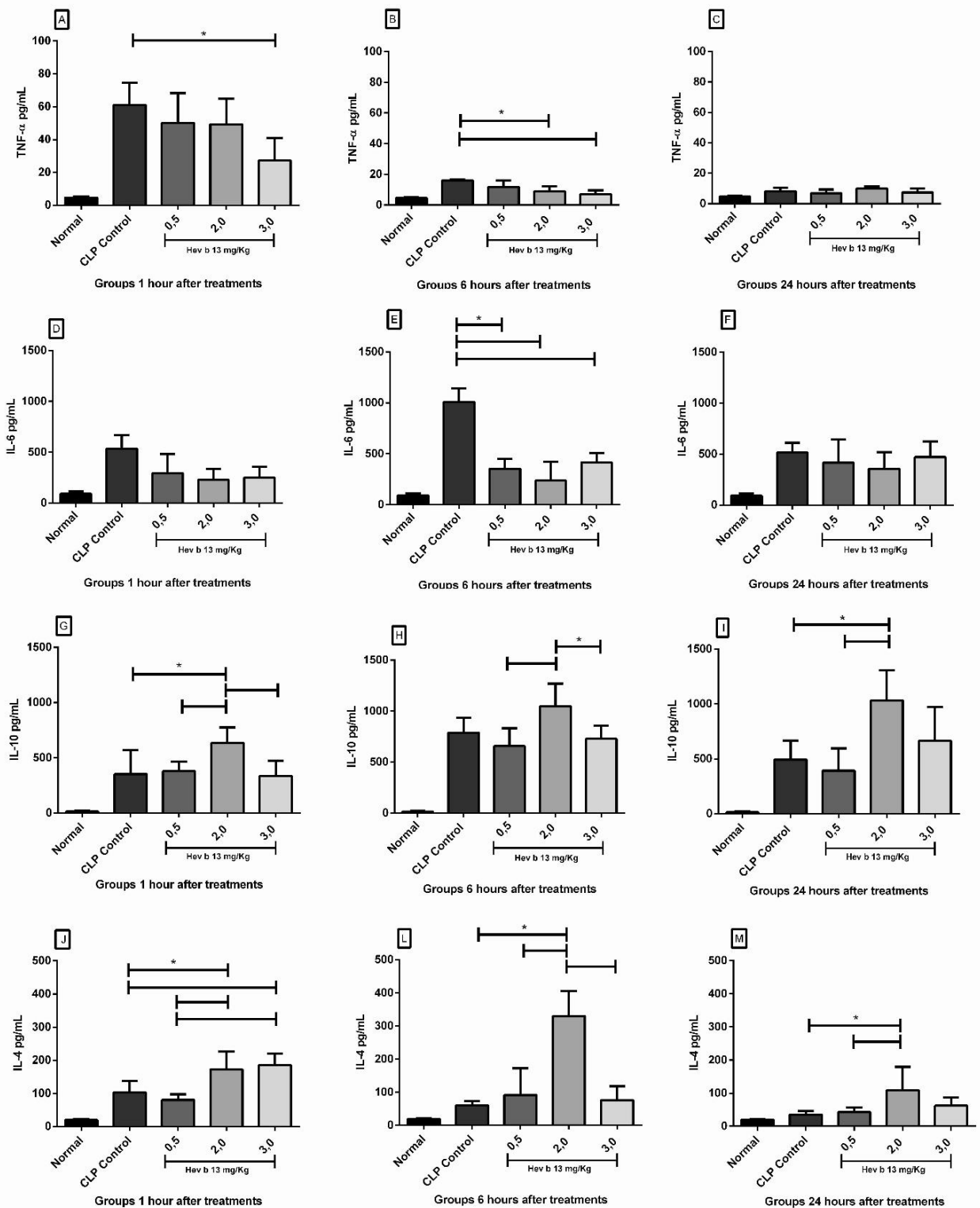


Figure 1. Effects of Hev b 13 on plasma cytokines of rats with sepsis. Six hours after cecal ligation and puncture (CLP), the animals were treated with Hev b 13 (doses: 0.5/2.0/3.0mg/Kg) and euthanized at 1, 6 and 24 hours to collect blood samples and doses of TNF- α , IL-6, IL-10 and IL-4. Data are presented as means \pm SD and expressed as pictograms of cytokines/milliliter of plasma (n=8). *(p<0.05) indicates significant groups as analyzed by ANOVA followed by Tukey's test. The normal group is presented only as reference.

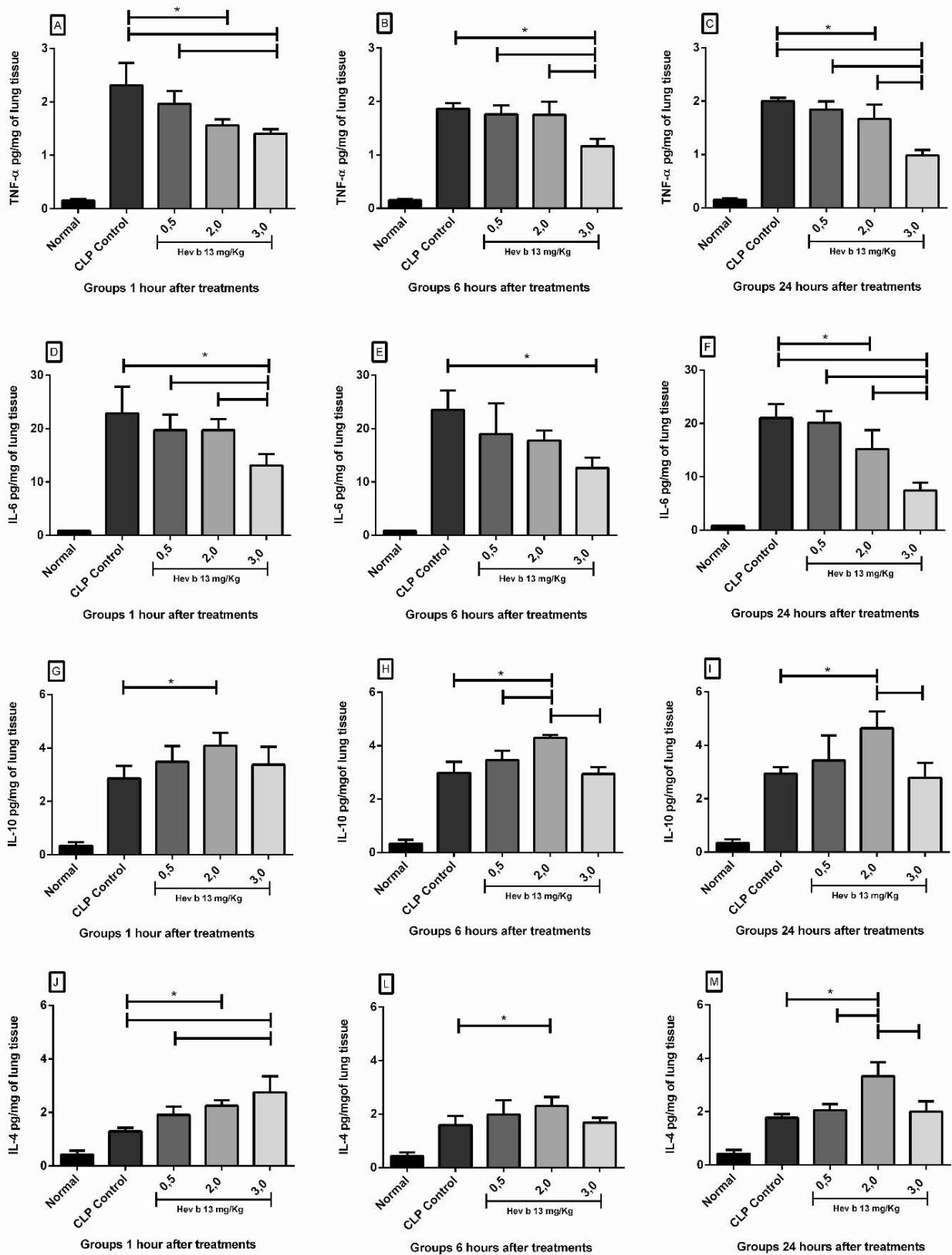


Figure 2. Effects of Hev b 13 on lung tissue cytokines in rats with sepsis. Six hours after cecal ligation and puncture (CLP), the animals were treated with Hev b 13 (doses: 0.5/2.0/3.0mg/Kg) and euthanized at 1, 6 and 24 hours to collect blood samples and doses of TNF- α , IL-6, IL-10 and IL-4. Data are presented as means \pm SD and expressed as pictograms of cytokines/milliliter of plasma (n=8). *(p<0.05) indicates significant groups as analyzed by ANOVA followed by Tukey's test.

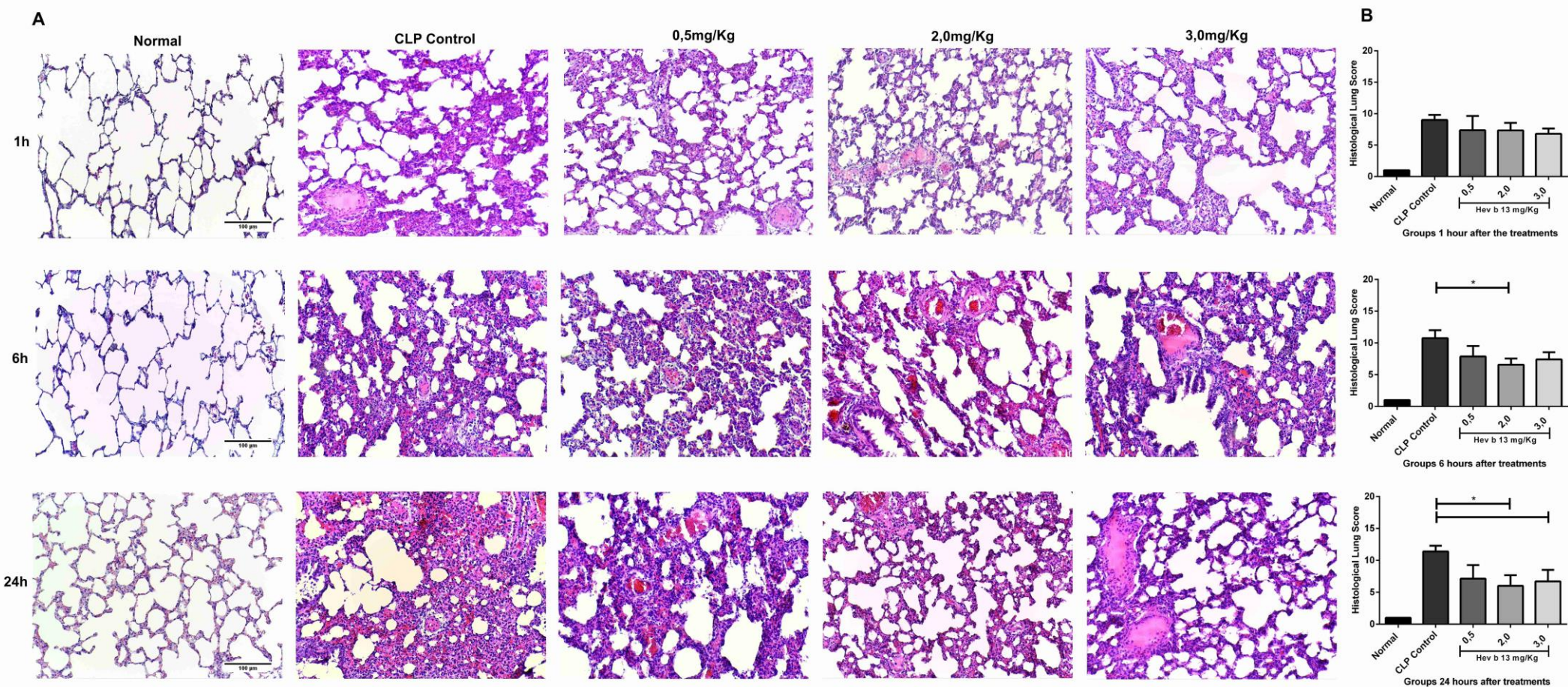


Figure 3. Effects of Hev b 13 on the pulmonary histology of rats with sepsis. (A) Lung tissue sections were stained with Hematoxylin-Eosin. The images were selected from the different experimental groups of time and doses, with normal images used only as reference (200x magnification; scale bar 100 μ m). (B) Semiquantitative analysis of pulmonary lesions. Slides were assessed as: normal (0), mild (1), moderate (2), significant (3) and severe (4), in the following categories: neutrophil infiltration, interstitial edema, hyperemia, hemorrhage, thickening and necrosis. The sum of the categories was analyzed by the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$; $n = 8$). The normal group was presented only as reference.

Table 1: Leukogram of the different groups 1 hour after treatments.

Parameters (10 ³ µL)	Normal	CLP control	Hev b 13		
			0.5mg	2.0mg	3.0mg
Total Leukocytes					
Mean (±SD)	3,290(±388)	7,800(±1,586)	4,781(±1,800)*	3,000(±875)*	3,660(±1,177)*
Variation	2,900-3,800	5,450-8,850	2,300-7,400	1,600-4,350	2,550-5,150
Mature Neutrophils					
Mean (±SD)	1,357(±215)	5,418(±1,220)	2,381 (±970) *	1,182(±321) *	2,201(±845) *
Variation	1,064-1,580	4,033-6,660	989-3,623	768-1,677	1,275-3,193
Immature Neutrophils					
Mean ((±SD)	482(±278)	839(±476)	1,135(±643)	879(±322)	431(±201)
Variation	217-874	383-1,485	391-2,294	320-1,197	282-773
Lymphocytes					
Mean (±SD)	1,341(±304)	1,135(±541)	1,054(±364)	770(±448)	865(±313)
Variation	986-1,710	692-1,816	648-1,742	367-1,566	390-1,269
Eosinophils					
Mean (±SD)	0(±0)	78(±72)	44(±42)	36(±31)	35(±21)
Variation	0-0	0-173	0-129	0-87	0-51
Monocytes					
Mean (±SD)	42(±22)	200(±126)	115(±102)	72(±33)	67(±30)
Variation	29-76	82-346	23-345	32-131	29-103
Basophils					
Mean (±SD)	50(±22)	126(±48)	50(±15)*	60(±17)*	58(±28)*
Variation	29-76	82-173	27-74	32-87	25-103

SD= Standard Deviation, CLP= Cecal Ligation and Puncture, * Significant difference (p<0.05) in relation to the CLP control group compared by the ANOVA and Tukey's tests.

Normal= Values exhibited only as reference and not included in the statistical analysis.

Table 2: Leukogram of different groups 6 hours after treatments.

Parameters (10 ³ µL)	Normal	CLP control	Hev b 13		
			0.5mg	2.0mg	3.0mg
Total leukocytes					
Mean (±SD)	3,290(±388)	9,087(±487)	3,650(±917)*	3,171(±844)*	3,470(±568)*
Variation	2,900-3,800	8,600-9,750	2,150-4,750	2,040-4,500	2,600-4,050
Mature Neutrophils					
Mean (±SD)	1,357(±215)	5,625(±905)	1,802(±497) *	1,526(±515) *	1,873(±434) *
Variation	1,064-1,580	4,628-6,825	1,076-2,517	837-2,385	1,222-2,277
Immature Neutrophils					
Mean ((±SD)	482(±278)	1,549(±517)	724(±285)*	816(±235)*	823(±190)*
Variation	217-874	877-2,136	419-1,118	472-1,170	547-113
Lymphocytes					
Mean (±SD)	1,341(±304)	1,456(±364)	955(±411)	687(±254)*	651(±239)*
Variation	986-1,710	946-1,780	495-1,860	328-943	379-1,013
Eosinophils					
Mean (±SD)	0(±0)	66(±44)	34(±33)	31(±30)	46(±33)
Variation	0-0	0-91	0-93	0-89	0-81
Monocytes					
Mean (±SD)	42(±22)	252(±99)	70(±35)*	61(±18)*	29(±16)*
Variation	29-76	178-390	21-139	41-89	0-40
Basophils					
Mean (±SD)	50(±22)	136(±54)	62(±30)*	48(±14)*	46(±13)*
Variation	29-76	89-195	21-95	20-61	34-67

SD= Standard Deviation, CLP= Cecal Ligation and Puncture, * Significant difference (p<0.05) in relation to the CLP control group compared by the ANOVA and Tukey's tests.

Normal= Values exhibited only as reference and not included in the statistical analysis.

Table 3: Leukogram of the different groups 24 hours after treatments.

Parameters (10 ⁶ µL)	Normal	CLP control	Hev b 13		
			0.5mg	2.0mg	3.0mg
Total Leukocytes					
Mean (±SD)	3,290(±388)	12,716(±1,501)	4,212(±764)*	3,966(±541)*	4,114(±855)*
Variation	2,900-3,800	10,600-14,550	2,700-5,300	3,050-4,650	3,000-5,050
Mature Neutrophils					
Mean (±SD)	1,357(±215)	7,615(±1,050)	2,302(±487) *	1,969(±376) *	2,149(±628) *
Variation	1,064-1,580	6,572-9,022	1,431-2,968	1,495-2,604	1,260-2,980
Immature Neutrophils					
Mean (±SD)	482(±278)	1,919(±255)	531(±214)*	473(±132)*	592(±193)*
Variation	217-874	1,599-2,226	332-979	279-622	372-966
Lymphocytes					
Mean (±SD)	1,341(±304)	2,715(±717)	1,213(±276)*	1,326(±312)*	1,178(±229)*
Variation	986-1,710	1,590-3,512	837-1,615	762-1,581	806-1,392
Eosinophils					
Mean (±SD)	0(±0)	85(±66)	45(±42)	45(±38)	62(±33)
Variation	0-0	0-140	0-106	0-85	0-101
Monocytes					
Mean (±SD)	42(±22)	212(±70)	61(±20)*	79(±38)*	54(±45)*
Variation	29-76	106-281	40-89	37-125	0-101
Basophils					
Mean (±SD)	50(±22)	169(±68)	59(±28)*	71(±25)*	76(±22)*
Variation	29-76	106-264	27-106	37-94	43-101

SD= Standard Deviation, CLP= Cecal Ligation and Puncture, * Significant difference ($p<0.05$) in relation to the CLP control group compared by the ANOVA and Tukey's tests.

Normal= Values exhibited only as reference and not included in the statistical analysis.

6. ARTIGO 2

Efeitos do tratamento com a Hev b 13 no fígado de ratos sépticos

Lilhian Alves de Araújo^{1*}, Paulo Roberto de Melo-Reis^{2,6}, Clayson de Moura Gomes³, Hidelberto Matos Silva⁵, Maxley Martins Alves⁶, Milton Adriano de Pelli Oliveira⁴, Fátima Mrué^{3,6} & Nelson Jorge da Silva-Júnior^{3,6}

¹Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, ICB IV, Avenida Esperança, Setor Itatiaia, Goiânia, GO, 74001-970, Brasil

²Departamento de Biomedicina e Farmácia, Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos - LEB, Área V, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Campus I Setor Universitário, Goiânia, GO, CEP 74605-140, Brasil

³Departamento de Medicina, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Área IV, Campus I, Setor Universitário, Goiânia, GO, CEP 74605-010, Brasil

⁴Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Setor Universitário, Goiânia, GO, CEP 74605-050, Brasil

⁵Faculdade de Medicina, Centro Universitário UNIRG, Campus II, Centro, Gurupi -TO, CEP 77403-090, Brasil

⁶Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Área V, Setor Universitário, Goiânia, GO, CEP 74.605-140, Brasil

Formatado para revista: Journal of Investigative Surgery – Fator de impacto atual: 1.158

Efeitos do tratamento com a Hev b 13 no fígado de ratos sépticos

Lilhian Alves de Araújo^{1*}, Paulo Roberto de Melo-Reis^{2,6}, Clayson de Moura Gomes³, Hidelberto Matos Silva⁵, Maxley Martins Alves⁶, Milton Adriano de Pelli Oliveira⁴, Fátima Mrué^{3,6} & Nelson Jorge da Silva-Júnior^{3,6}

¹Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, ICB IV, Avenida Esperança, Setor Itatiaia, Goiânia, GO, 74001-970, Brasil

²Departamento de Biomedicina e Farmácia, Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos - LEB, Área V, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Campus I Setor Universitário, Goiânia, GO, CEP 74605-140, Brasil

³Departamento de Medicina, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Área IV, Campus I, Setor Universitário, Goiânia, GO, CEP 74605-010, Brasil

⁴Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Setor Universitário, Goiânia, GO, CEP 74605-050, Brasil

⁵Faculdade de Medicina, Centro Universitário UNIRG, Campus II, Centro, Gurupi -TO, CEP 77403-090, Brasil

⁶Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Área V, Setor Universitário, Goiânia, GO, CEP 74.605-140, Brasil

*Autor correspondente: lilhianalves@gmail.com

Resumo: Objetivo: Hev b 13 é uma proteína obtida a partir do látex natural de *Hevea brasiliensis*, da família das Euforbiáceas conhecida popularmente como “seringueira”. Tem apresentado atividade imunomoduladora na artrite e colite mas seu papel na sepse não foi explorado. Foram investigados os efeitos da Hev b 13 na produção de citocinas e alterações histológicas no fígado durante a sepse aguda. **Métodos:** Ratos machos da linhagem Wistar foram submetidos a ligação e perfuração do ceco (LPC), randomizados em grupos e tratados com as doses 0,5; 2,0 e 3,0 mg/Kg de Hev b 13 subcutâneo. Após, subdividiu-se os animais em três tempos diferentes (1, 6 e 24 horas após os tratamentos) para eutanásia e remoção do fígado, dosagem de citocinas e análise histológica. **Resultados:** O tratamento com a Hev b 13 inibiu a produção de TNF- α e IL-6, associado ao aumento de IL-10 de forma significativa ($p < 0.05$) no fígado em comparação com o grupo controle. Além disso, reduziu significativamente ($p < 0.05$) hemorragia, infiltrado inflamatório sinusoidal e degeneração hidrópica na histologia hepática. **Conclusão:** Hev b 13 desempenhou atividade anti-inflamatória e imunomoduladora protegendo o fígado de lesões durante a sepse aguda.

Palavras-chave: Hev b 13, *Hevea brasiliensis*, resposta inflamatória, sepse, fígado

Introdução

Sepse é uma inflamação sistêmica, potencialmente fatal, induzida por uma infecção causada por bactérias, fungos, vírus ou parasitas (Jones, Puskarich, 2014). Estimativas indicam que a sepsé é a principal causa de morte e doença crítica em todo o mundo, representando mais de US\$ 20 bilhões (5,2%) dos custos hospitalares totais dos EUA em 2011 (Fleischmann et al., 2015). Além disso, há uma crescente conscientização de que os pacientes sobreviventes da sepsé frequentemente apresentam incapacidades físicas, psicológicas e cognitivas de longo prazo com significativas implicações sociais (Iwashyna TJ et al., 2010; Shankar-Hari et al., 2016).

A patogênese da sepsé está associada a regulação ascendente das vias pró e anti-inflamatórias. No entanto, quando o sistema imunológico se torna superativado em resposta a uma infecção existente, caracterizando a síndrome da resposta inflamatória aguda (SRIS), pode ocorrer disfunção orgânica, choque e morte (Stearns et al., 2011). A lesão hepática é uma das complicações mais comuns associadas a sepsé (Li et al., 2016). Estudos incluindo 206 UTIs mostraram que nas primeiras 24 horas a incidência de lesões hepáticas e insuficiência hepática foi de 46,6% e 6,3%, respectivamente (Brun-Buisson et al., 2004). O fígado desempenha um papel importante no metabolismo energético e defesa do organismo contra patógenos, modulando os processos inflamatórios e liberando quantidades elevadas de várias citocinas. Durante a sepsé, as citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF) - α e interleucina (IL)-6, têm efeito crucial na trajetória da doença e estão particularmente ligadas na progressão do choque séptico (Schulte et al., 2013; Saad et al., 2016). Estas citocinas podem ativar uma reação em cascata e levar a “tempestade de citocinas”, agravando a resposta inflamatória (Bin et al., 2016). Em contrapartida, as citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-4, também são encontradas extensivamente em pacientes sépticos e têm a função de abrandar as respostas imunes, comumente associadas a maior sobrevida (Gomes et al., 2016).

Diversos protocolos terapêuticos para sepse têm sido propostos nos últimos anos como a administração de antibióticos, corticosteroides e anticoagulantes, tudo isso acompanhado de moderno suporte hemodinâmico nas unidades de cuidados intensivos (UCI). Entretanto, mesmo com esses avanços, não existem melhorias significativas nas taxas de morbimortalidade, fazendo-se necessária a descoberta de novos potenciais alvos terapêuticos e/ou substâncias que pudesse equilibrar a resposta imunoinflamatória na sepse. As citocinas são alvos altamente promissores, principalmente com a elucidação do papel desses mediadores na fisiopatologia da doença (Schulte et al., 2013).

A Hev b 13, uma proteína homóloga obtida a partir do látex natural de *Hevea brasiliensis*, conhecida popularmente como “seringueira”, tem apresentado atividade imunomoduladora nos ensaios pré-clínicos, aumentando a produção de IL-10 e reduzindo TNF- α , IL-1 β e IL-6 *in vitro* (Teixeira et al, 2012a). Os mesmos autores demonstraram ainda evidências significativas de melhora nos quadros de artrite e colite em camundongos, após terem sido tratados com Hev b 13 por via oral (Teixeira et al., 2012ab). Dados do nosso estudo anterior em ratos, confirmou que a Hev b 13 tem propriedades anti-inflamatórias na sepse associada a redução TNF- α e IL-6, concomitantemente ao aumento de IL4 e IL-10 tanto a nível sistêmico como tecidual. Além disso, possui efeitos protetores contra as disfunções orgânicas pulmonares causadas pela sepse (Araújo et al., 2018). No presente estudo, investigamos se o tratamento com a Hev b 13 possui algum efeito na produção de citocinas e nas alterações histológicas do fígado durante a sepse aguda.

Material e Métodos

Obtenção da proteína Hev b 13

A fração proteica Hev b 13, derivada do soro do látex da *Hevea brasiliensis*, foi fornecida pelo Laboratório Pele Nova Biotecnologia - Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil (lote 1502-243).

Animais para experimentação

Foram utilizados *Rattus norvegicus albinus* linhagem *Wistar*, machos adultos, apresentando peso corpóreo entre 200 a 300 gramas, procedentes do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica de Goiás- PUC- GO. O experimento seguiu normas internacionais e da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório – SBCAL, com início somente após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da PUC-GO protocolo n°0008/1.

Indução de sepse por ligadura e perfuração cecal (LPC)

Cloridrato de xilazina 2% (2,5mg/kg) e cloridrato de cetamina 10% (50mg/kg - Syntec - São Paulo - Brasil) foram utilizados para anestésiar todos os animais. Uma incisão com cerca de 1 cm foi feita na parede abdominal, seguida de ligadura do ceco com fio de seda 3.0 em sua base e perfurado duas vezes com agulha calibre 14 G. O ceco foi então pressionado para provocar a saída de fezes pelo local perfurado e devolvido a cavidade peritoneal. A parede abdominal foi suturada em dois planos com “mononylon” 4-0 e chuleio simples (Figura 1). Ao final, a hidratação foi feita com 5 mL de soro ringer lactato dose única via subcutânea e os animais devolvidos nas gaiolas, alimentados com ração própria para espécie e água *ad libitum*.

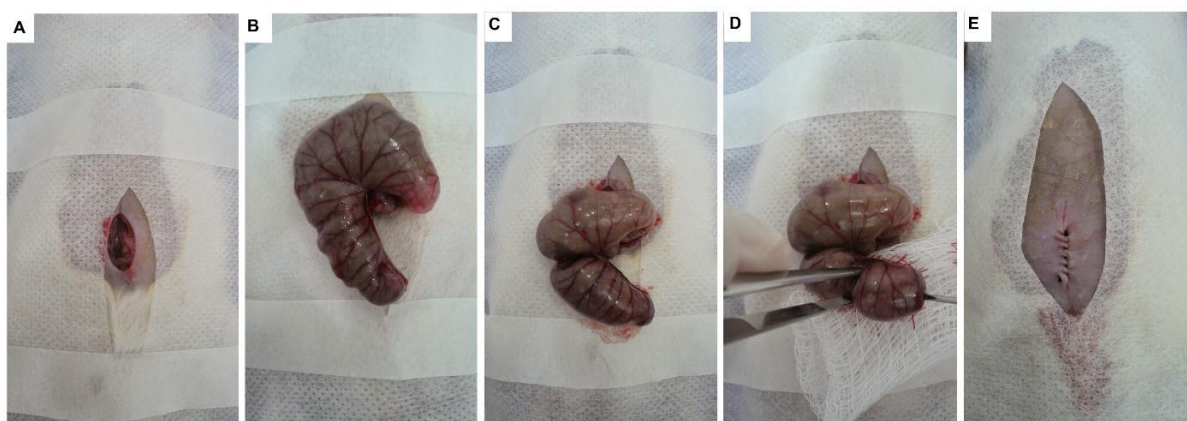


Figura 1. Método de indução de sepse por ligadura e perfuração cecal (LPC). Laparotomia mediana (A). Exposição do ceco (B). Ligadura do ceco (C). Perfuração do ceco com agulha calibre 14 (D). Sutura da parede abdominal (E).

Grupos e tratamentos

A randomização foi realizada 6 horas após o procedimento cirúrgico de indução de sepse em 4 grupos: ratos submetidos a ligação e perfuração cecal e tratados apenas com solução fisiológica 0,9% (grupo controle LPC); ratos submetidos a LPC e tratados com dose única de 0,5mg; 2,0mg e 3,0mg/Kg da proteína Hev b 13. Posteriormente, os animais foram subdivididos em três pontos diferentes de tempo (1, 6 e 24 horas após os tratamentos), para eutanásia e remoção do fígado. O mesmo material biológico foi coletado também de animais considerados hígidos (Grupo Normal) para obtenção de valores de referência.

Detecção de citocinas

Fragmentos do fígado foram retirados e pesados, acrescidos de 1% de inibidor de protease (Sigma - Missouri - USA), 15 mL/mg de PBS 1X e 10% de tampão de lise (Tampão de Tris - 100mM Tris - HCL, 1.5 M NaCl, 10% TRITON X-100, 50 mM EDTA), macerados manualmente, homogeneizados pelo aparelho Ultra Stirrer (Scientific SDN BHD - Ehsan - Malasya) e posteriormente, centrifugados à 10000 rpm. Utilizou-se o sobrenadante do macerado das amostras para as dosagens de TNF- α , IL-6, IL-10 e IL4 através do *Enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa)* (BD- Biosciences) (Gokcinar et al., 2013) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. Todas as amostras de sobrenadantes foram mensuradas em duplicatas.

Análise histológica

Os fígados foram imersos em formol tamponado a 10% e rotineiramente incluídos em parafina. Fitas de tecido foram cortadas com 5 μ m de espessura, montadas em lâminas e coradas com hematoxilina-eosina. As lâminas (n=8) foram examinadas por um patologista experiente de forma cega aos tratamentos, em microscópio de luz utilizando aumento de 200/400X (100 campos por seção). As lesões nos tecidos hepáticos foram classificadas em: (0) normal (0%

área); (1) leve (25% área); (2) moderada (50% da área); (3) acentuada (75% da área), (4) severa (100% área) nas categorias infiltrado inflamatório parenquimatoso, infiltrado inflamatório sinusoidal, hemorragia, degeneração hidrópica e necrose. A soma das pontuações obtidas em cada categoria foram utilizadas para análise semiquantitativa (Zhou, et al 2015).

2.8 Análise estatística

A estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism versão 6.05 (Inc. San Diego, CA, USA) e os resultados apresentados contendo média \pm desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) e Tuckey foram utilizados para testar as diferenças significativas dos níveis de citocinas. O teste Kruskal-Wallis foi empregado para comparar as categorias histológicas. Para todas as análises foi adotado nível de significância no valor de $p < 0.05$.

Resultados

Nos animais submetidos a ligadura e punção do ceco - controle CLP- os níveis teciduais das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6 estavam muito elevadas quando comparadas aos animais hígidos. Entretanto, após 1 hora de tratamento com todas as doses de Hev b 13, o TNF- α foi significativamente menor que no grupo controle CLP ($p < 0.05$) (Figura 2 A). O mesmo repetiu-se após 6 horas com as doses de 2,0 e 3,0mg, bem como no tempo de 24 horas com a dose de 3,0mg ($p < 0.05$) (Figura 2 B e C). Houve diferença significativa entre os tratamentos, contudo, a dosagem de 3,0mg foi mais eficaz em diminuir as concentrações de TNF- α no fígado em todos os tempos analisados. (Figura 2 A, B e C). Com relação a IL-6, não houve diferença significativa entre o grupo controle CLP e os tratados no tempo de 1 hora (Figura 2 D) ($p > 0,05$). Nos tempos de 6 e 24 horas nas respectivas doses de 2,0 e 3,0mg, observou-se que os níveis de IL6 foram significativamente menores quando comparados ao controle CLP ($p < 0.05$). Houve também diferenças significativas entre os tratamentos mas a dose de 3,0mg continuou sendo mais eficaz em diminuir as concentrações de IL-6 (Figura 2 E e F). A IL-10 aumentou de forma significativa com a dose de 3,0mg ($p < 0.05$) após 1 e 24 horas de tratamento quando comparado

ao controle CLP (Figura 2 G e I). A produção de IL-4 no tecido hepático não apresentou diferenças significativas entre os grupos.

Ademais, nos exames histológicos do tecido hepático, o grupo controle CLP apresentou várias alterações patológicas dentre elas hemorragia, infiltrado inflamatório sinusoidal e degeneração hidrópica, ocasionando alargamento e congestionamento de sinusóides com formação de edema (Figura 3 B e C). Após os tratamentos com Hev b 13, foi possível visualizar melhoria nas alterações encontradas (Figura 3 D, E e F), sendo a dose de 3,0mg de Hev b 13, nos tempos de 1 e 24h, responsável por reduzir de forma significativa ($p < 0.05$) as alterações histopatológicas dentro das categorias analisadas (Figura 3 a,c).

Discussão

Hevea brasiliensis é uma das espécies mais pesquisadas da família das Euforbiáceas (Leela, Muhamed, 2006). No látex natural contêm diversos componentes químicos como proteínas, fosfolipídios, sais minerais, carotenóides e lipídios cujas propriedades biológicas vêm sendo exploradas e determinadas em modelos animais (Mrué et al, 2004, Teixeira et al., 2012ab). Neste estudo, testamos se proteína Hev b 13 (derivada da fração F3 do látex), interfere na produção de citocinas bem como sua repercussão nas alterações histológicas hepáticas durante a sepse aguda.

O fígado é um dos órgãos mais importantes e vulneráveis na sepse (Bin et al., 2016). Influência no metabolismo e defesa do hospedeiro modulando processos inflamatórios por filtração, inativação e limpeza de bactérias/endotoxinas, substâncias vasoativas, inflamatórias e proteínas de fase aguda (Spapen, 2008). As células de Kupffer (KCs) representam cerca de 80% da população total de macrófagos fixos e quando ativados produzem radicais reativos do oxigênio e citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α (Nakashima et al., 2013).

Todo esse processo, quando exacerbado, decorre em peroxidação, edema celular e mitocondrial, conseqüentemente, induzem ou agravam lesões hepáticas (Chen et al., 2013). No

presente estudo a sepse foi induzida pelo modelo de CLP em ratos. O fígado é o órgão mais próximo do ceco e, após a perfuração, entra em contato direto com os lipopolissacarídeos, ademais, a veia porta hepática drena sangue de todo o sistema digestivo e glândulas acessórias. Em humanos, as infecções intra-abdominais são causas bem comuns de sepse (Al-Saidya, Ismail, 2013). Por essa razão, as citocinas inflamatórias secretadas pelas KCs, tendem a aumentar no fígado e plasma muito rapidamente. As correlações entre a produção de citocinas em sobrenadantes de KCs e no plasma já foram comprovadas (Yee et al., 2003).

No nosso estudo, a administração de Hev b 13 reduziu a produção de TNF- α e IL-6 no lisado de fígado dos ratos com sepse aguda de forma dose dependente. TNF- α e IL-6 estimulam a resposta imune inata ou adaptativa e favorece a produção de outros tipos de citocinas intensificando a resposta inflamatória. Podem ainda, aumentar a expressão de moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e celular vascular-1 (VCAM-1), comprometendo a microcirculação hepática (Coquerel et al, 2014). Além disso, o receptor -1 de TNF- α é capaz de induzir a apoptose dos hepatócitos por múltiplos caminhos (Ding, Yin, 2004). Estudos recentes revelaram que a IL-6 é um marcador de alta sensibilidade para infecções bacterianas graves (Ventetuolo et al., 2008). Aparece rapidamente na corrente sanguínea alcançando níveis máximos dentro de 2 horas após a infecção e seu estímulo persiste muito mais tempo do que a IL-1 e TNF- α (Song, Kellum, 2005). Níveis séricos de IL-6 e TNF- α diminuem quando a infecção é controlada e correlacionam com melhor prognóstico em escores Apache II (Chaudhry et al., 2013).

Nossos experimentos revelaram também, um aumento na produção de IL-10 no fígado dos animais tratados com a maior dose testada (3,0mg) nos tempos de 1 e 24h (Figura 2 G e I). Coincidentemente, a mesma dose e tempo atenuou de forma significativa as lesões hepáticas analisadas nos ratos com sepse, sobretudo, a degeneração hidrópica, que foi a alteração mais frequente nos animais sem tratamento. Acreditamos que a IL-10 participou na supressão das demais citocinas inflamatórias e pode ter restringido a agressão na membrana dos hepatócitos

durante o processo inflamatório intenso. Estes achados corroboram com outros autores que também apresentaram níveis de citocinas inflamatórias reduzidas e maior produção de IL-10 após a administração de Hev b 13, tanto a nível sistêmico quanto tecidual, ao mesmo tempo, reduziu lesões nas articulações de joelho em artrite, cólon em colite e pulmões na sepse (Teixeira et al., 2012ab; Alves et al., 2016; Araújo et al., 2016).

Na sepse induzida por CLP, as citocinas TNF e IL-6 podem estar até 15 vezes aumentadas contribuindo para o desenvolvimento da síndrome disfuncional de múltiplos órgãos e sistemas (SDMO) e mortalidade elevada (Lafiti et al., 2002). Todavia, a administração de IL-10 recombinante (rhIL-10) 5h após CLP (Lafiti et al., 2002), regulação ascendente da IL-10 através de transferência genética (Kabay et al., 2007) ou terapia hiperbárica (Buras et al., 2006) evitou lesões de órgãos e melhorou a sobrevida. Em voluntários humanos que receberam rhIL-10 após endotoxemia, verificou-se menos hipertermia, adesão de neutrófilos nos pulmões e produção de citocinas inflamatórias (Pajkrt et al., 1997). Esses resultados em paralelo com nosso estudo comprovam que, terapias visando atenuar a resposta inflamatória sistêmica podem restringir os danos celulares e conseqüentemente, as disfunções orgânicas na SRIS durante a sepse.

Conclusão

Concluimos que a administração de Hev b 13 foi capaz de aumentar a produção de IL-10 e inibir TNF- α e IL-6, além de atenuar as lesões hepáticas induzida por sepse aguda, evidenciando um papel protetor através da atividade anti-inflamatória e imunomoduladora da proteína. Entretanto, faz-se necessário novos ensaios pré-clínicos com doses contínuas, inclusive antes da CLP, para elucidar todos os efeitos da Hev b 13 na resposta inflamatória durante a sepse.

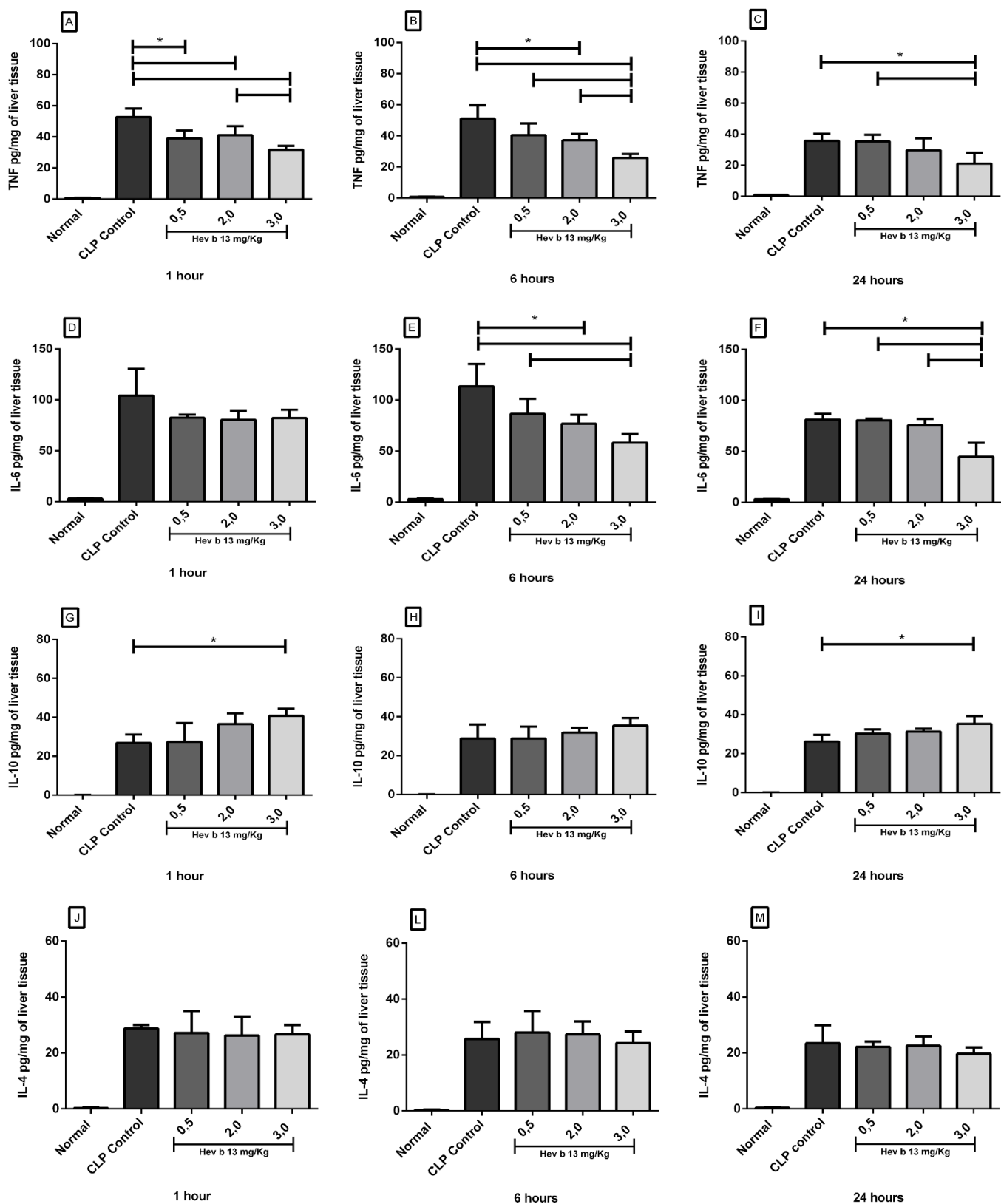


Figura 2. Efeitos da Hev b 13 na produção de citocinas no tecido hepático de ratos com sepse. Após 6 horas de ligação e perfuração do ceco (LPC), os animais foram tratados com Hev b 13 (doses: 0,5/2,0/3,0mg/Kg) e eutanasiados nos tempos de 1 ,6 e 24 horas para coleta do fígado e dosagem de TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-4. Os dados são apresentados como médias \pm DP e expressos em picogramas de citocinas/miligramas de tecido (n=8). *($p < 0,05$) indica os grupos significativos entre si analisados pelo teste Anova seguido de Tukey.

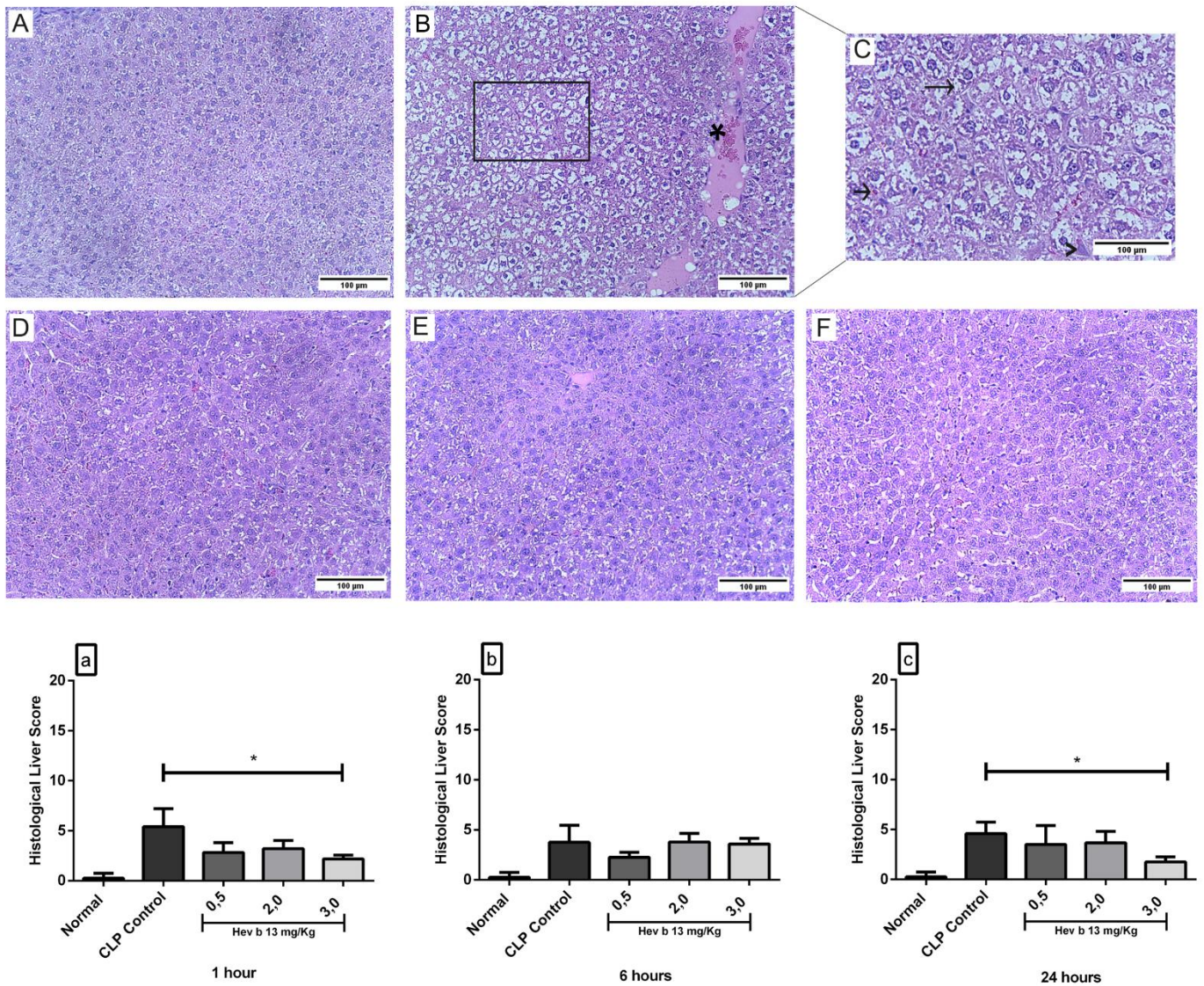


Figura 3. Efeitos da Hev b 13 na histologia hepática de ratos com sepse (H&E, 200/400x; barra de escala 100 μ m). Tecido hepático normal (A). Tecido hepático do controle CLP com edema (asterisco) (B). Visualização detalhada do quadrado em maior aumento, demonstrando degeneração hidrópica (seta longa), hemorragia (seta curta) e infiltrado inflamatório (cabeça de seta) (C). Tecido hepático com alterações morfológicas atenuadas nos grupos tratados com a dose de 3,0mg de Hev b 13 nos tempos de 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F). Análise semiquantitativa das lesões hepáticas pelo teste Kruskal-Wallis (* $p < 0,05$; $n = 8$) (a,b,c). Grupo normal apresentado apenas para imagem e valores de referência não participando da estatística.

Referências

1. Al-Saidya AM, Ismail HK. Histopathological study of sepsis experimentally induced by cecal ligation and puncture in rats. *Bas J Vet Res.* 2013; 12(2):104-15.
2. Alves MM, Araújo LA, Mrué F, et al. Immunomodulating effects of the purified Hev b 13 fraction on septic rats. *Arq. Bras. Cir. Dig.* 2017; *In press.*
3. Araújo LA, Melo-Reis PR, Mrué F, et al. Protein from *Hevea brasiliensis* “Hev b 13” latex attenuates systemic inflammatory response and lung lesions in rats with sepsis. *Braz. J. Biol.* 2017; *In press.*
4. Bin C, Yu-Long L, Shi-Jun W, et al. Does Citrulline Have Protective Effects on Liver Injury in Septic Rats? *BioMed Res Int.* 2016; 1469590.
5. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, et al. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med.* 2004; 30(4): 580-588.
6. Buras JA, Holt D, Orlow D, et al. Hyperbaric oxygen protects from sepsis mortality via an interleukin-10-dependent mechanism. *Crit Care Med.* 2006; 34(10):2624-2629.
7. Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, et al. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo.* 2013; 27(6):669-684.
8. Chen Y, Tong H, Zhang X, et al. Xuebijing injection alleviates liver injury by inhibiting secretory function of Kupffer cells in heat stroke rats. *J Tradit Chin Med.* 2013; 33(2): 243-249.
9. Coquerel D, Neviere R, Delile E. Gene deletion of protein tyrosine phosphatase 1B protects against sepsis induced cardiovascular dysfunction and mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(5): 1032-1044.
10. Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF- α -induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med.* 2004; 8(4): 445-454.
11. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis: current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016; 193(3): 259-272.
12. Gokcinar D, Ergin V, Cumaoglu A, et al. Effects of ketamine, propofol, and ketofol on proinflammatory cytokines and markers of oxidative stress in a rat model of endotoxemia-induced acute lung injury. *Acta Biochim Pol.* 2013; 60(3):451-456.
13. Gomes AP, Miguel PSB, Alves DLS, et al. Pro-Inflammatory Cytokines in Sepsis: Biological Studies and Prospects From *In Silico* Research. *Biol Syst.* 2016; 5(1): 1-7.

14. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, et al. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*. 2010; 304(16): 1787-1794.
15. Jones AE, Puskarich MA. The surviving sepsis campaign guidelines 2012: Update for emergency physicians. *Ann Emerg Med*. 2014; 63(1): 35-47.
16. Kabay B, Kocafe C, Baykal A, et al. Interleukin-10 gene transfer: prevention of multiple organ injury in a murine cecal ligation and puncture model of sepsis. *World J Surg*. 2007; 31(1):105-115.
17. Lafiti SQ, O'Riordan MA, Levine AD. Interleukin-10 Controls the Onset of Irreversible Septic Shock. *Infect Immun*. 2002; 70(8): 4441-4446.
18. Leela EP, Muhamed A. Assessment of biodeterioration of rubber wood exposed to field conditions. *Int Biodeter Biodegr*. 2006; 57(1): 31-36.
19. Li A, Li J, Bao Y, et al. Xuebijing injection alleviates cytokine-induced inflammatory liver injury in CLP-induced septic rats through induction of suppressor of cytokine signaling 1. *Exp Ther Med*. 2016; 12(3): 1531-1536.
20. Lv S, Han M, Yi R, Kwon S, et al. Anti-TNF- α therapy for patients with sepsis: A systematic meta-analysis. *Int J Clin Pract*. 2014; 68(4): 520-528.
21. Mrue F, Netto JC, Ceneviva R, et al. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. *Mat Res*. 2004; 7(2): 277-283.
22. Nakashima H, Ogawa Y, Shono S, et al. Activation of CD11b+Kupffer cells/macrophages as a common cause for exacerbation of TNF/Fas-ligand-dependent hepatitis in hypercholesterolemic mice. *PLoS One*. 2013; 8(1). doi: 10.1371/journal.pone.0049339.
23. Pajkrt D, Camoglio L, Tiel-van BMC, et al. Attenuation of proinflammatory response by recombinant human IL-10 in human endotoxemia: effect of timing of recombinant human IL-10 administration. *J Immunol*. 1997; 158(8): 3971-3977.
24. Saad DY, Baiomy AA, Mansour AA. Antiseptic effect of sea cucumber (*Holothuria atra*) against multi-organ failure induced by sepsis: Molecular and histopathological study. *Exp Ther Med*. 2016; 12(1): 222-230.
25. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: Potent immunoregulators and potential therapeutic targets-an updated view. *Mediators Inflamm*. 2013; 165974.
26. Shankar-HarI M, Phillips GS, Levy ML, et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315(8): 775-787.
27. Song M, Kellum JA. Interleukin-6. *Crit Care Med*. 2005; 33(12 Suppl):S463-S465.

28. Spapen H. Liver perfusion in sepsis, septic shock, and multiorgan failure. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008; 291(6):714-20.
29. Stearns KDJ, Osuchowski MF, Valentine C, et al. The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol*. 2011; 6: 19-48.
30. Teixeira LB, Epifânio VLAA, Lachat JJ, et al. Oral treatment with Hev b 13 prevents experimental arthritis in mice. *Clin Exp Immunol*. 2012a; 168(3): 285-290.
31. Teixeira LB, Epifânio VLAA, Lachat JJ, et al. Oral treatment with Hev b 13 ameliorates experimental colitis in mice. *Clin Exp Immunol*. 2012b; 169(1): 27-32.
32. Ventetuolo CE, Levy MM. Biomarkers: Diagnosis and risk assessment in sepsis. *Clin Chest Med*. 2008; 29(4):591-603.
33. Yee SB, Ganey PE, Roth RA. The role of Kupffer cells and TNF- α in monocrotaline and bacterial lipopolysaccharide-induced liver injury. *Toxicol Sci*. 2003; 71(1):124-132.
34. Zhou L, Ga M, Xiao Z, et al. Protective effect of astaxanthin against multiple organ injury in a rat model of sepsis. *J Surg Res*. 2015; 195(2): 559-567.

7. CONCLUSÕES GERAIS

- O tratamento com a Hev b 13 resultou em diminuição significativa de leucócitos totais e diferenciais nos animais com sepse.
- O tratamento com a Hev b 13 diminuiu a produção de TNF- α e IL-6, associado ao aumento de IL-10 e IL-4 no plasma dos animais com sepse.
- No tecido pulmonar, o tratamento com a Hev b 13 diminuiu a produção de TNF- α e IL-6, associado ao aumento de IL-10 e IL-4, atenuando as alterações patológicas encontradas nos pulmões dos animais com sepse.
- No tecido hepático, o tratamento com a Hev b 13 diminuiu a produção de TNF- α e IL-6, associado ao aumento de IL-10, atenuando as alterações patológicas encontradas no fígado dos animais com sepse.
- A Hev b 13 apresentou atividade anti-inflamatória e protetora na sepse aguda com potencialidades para aplicabilidade clínica.

8. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E.; SINGER, M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. **Critical Care Medicine**, v.35, n.10, p.2408-16, 2007.

AGOSTINI, D. L. S. Caracterização dos constituintes do látex e da borracha natural que estimulam a angiogênese. 2009, 87 p. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2009.

AIKAWA, N. Cytokine storm in the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome associated with surgical insults. **Nippon Geka Gakkai Zasshi**, v. 97, n. 9, p. 771-777, 1996.

ANDRADE, T. A. M. Atividade da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* na neoformação tecidual em camundongos. 2007. 138f. Dissertação de mestrado- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

ANDRADE, T. A. M. Modificações teciduais e mecanismos de ação da fração F1 do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos diabéticos. 2012. 185p. Tese de doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

ANGUS, D. C.; LINDE-ZWIRBLE, W. T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKY, M. R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, v. 29, n.7, p. 1303-1310, 2001.

ARIF, S. A.; HAMILTON, R. G.; YUSOF, F.; CHEW, N. P.; LOKE, Y. H.; NIMKAR, S.; BEINTEMA, J. J.; YEANG, H. Y. Isolation and characterization of the early nodule-specific protein homologue (Hev b 13), an allergenic lipolytic esterase from *Hevea brasiliensis* latex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 23, p. 23933-23941, 2004.

BAUE, AE. Multiple, progressive, or sequential systems failure, a syndrome of the 1970s. **Archives of Surgery**, v. 110, n.7, p. 779-781, 1975.

BEALE, R.; REINHART, K.; DOBB, G.; SILVA, E.; LECLERC, J.; BASSON, B.; ANGUS, D; PROGRESS Advisory Committee. PROGRESS (Promoting Global

Research Excellence in Severe Sepsis): a preliminary report of an internet-based sepsis registry. **Chest Journal**, v. 124, n. 4, 224S, 2003.

BENJAMIM, C. F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 34, p. 18-26, 2001.

BENJAMIM, C. F.; SILVA, J. S.; FORTES, Z. B.; OLIVEIRA, M. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3602-3610, 2002.

BLACKWELL, T. S.; CHRISTMAN, J. W. Sepsis and cytokines: current status. **British Journal of Anaesthesia**, v. 77, n. 1, p. 110-117, 1996.

BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. **Annals of International Medicine**, v.115, n. 6, p. 457-469, 1991.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOCISKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 4, n.10, p. 854- 65, 2005.

CHALUPKA, N. A.; TALMOR, D. The economics of sepsis. **Critical Care Clinics**, v. 28, n. 1, p. 57–76, 2012.

CHANG, H. J.; LYNN, C.; GLASS, R. M. Sepsis. **JAMA**, v. 304, n. 16, p. 1856, 2010.

CIANCIARULLO, M. A.; CECCON, M. E. J.; YAMAMOTO, L.; NEGRO, G. M. B. D.; OKAY, T. S. Mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios na sepse neonatal: associação entre homeostase e evolução clínica. **Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano**, v. 18, n. 2, p. 135-147, 2008.

DEJAGER, L; PINHEIRO, I; DEJONCKHEERE, E; LIBERT C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis?. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, pp. 198-208, 2011.

DELLINGER, R. P.; LEVY, M. M.; RHODES, A.; ANNANE, D.; GERLACH, H.; OPAL, S. M.; SEVRANSKY, J. E.; SPRUNG, C. L.; DOUGLAS, S.; JAESCHKE, R.; OSBORN, T. M. et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 2, p.580-687, 2012.

DENK, S.; PERL, M.; HUBER-LANG, M. Damage- and pathogen-associated molecular patterns and alarmins: keys to sepsis? **European Surgical Research**, v. 48, n. 4, p. 171–179, 2012.

DHAINAUT, J. F.; TENAILLON, A.; HEMMER, M.; DAMAS, P. L. E.; TULZO, Y.; RADERMACHER, P.; SCHALLER, M. D.; SOLLET, J. P.; WOLFF, M.; HOLZAPFEL, L.; ZENI, F.; VEDRINNE, J. M.; VATHAIRE, F.; GOURLAY, M. L.; GUINOT, P.; MIRA, J. P. Confirmatory platelet-activating factor receptor antagonist trial in patients with severe gram-negative bacterial sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. **Critical Care Medicine**, v. 26, n. 12, p.1963-71, 1988.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest**, v. 112, supplement 6, p. 321S-329S, 1997.

FERRAZ, A.R. Ricardo de Almeida Jorge. Médico e Humanista Portuense, Higienista Intemporal. **Arquivos de Medicina**, v. 22, n. 2/3, p. 91-100, 2008.

FRACASSO, J. F. Contribuição ao entendimento da patogenia da sepse. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 119-127, 2008.

GERMAIN, R. N. Maintaining systemhomeostasis: the third law of Newtonian immunology. **Nature Immunology**, v. 13, n. 10, p. 902-906, 2012.

HALL, M. J.; WILLIAMS, S. N.; FRANCES, C. J.; GOLOSINSKIY, A. **Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals**. NCHS data brief, v. 62, National Center for Health Statistics, Hyattsville, MD, 2011.

HANSEN, J. D.; VOJTECH, L. N.; LAING K. J. Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 9, p. 886-897, 2011.

HOOK, K. M.; ABRAMS, C. S. The loss of homeostasis in hemostasis: new approaches in treating and understanding acute disseminated intravascular coagulation in critically ill patients. **Clinical and Translational Science**, v. 5, n. 1, p. 85-92, 2012.

HOTCHKISS, R. S.; OPAL, S. "Immunotherapy for sepsis - a new approach against an ancient foe. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 1, p. 87-89, 2010.

KRISHNAGOPALAN, S.; DELLINGER, R. P. Innovative therapies for sepsis. **BioDrugs**, v.15, n. 10, p. 645-54, 2001.

LATIFI, S. Q.; O'RIORDAN, M. A.; LEVINE, A. D. Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4441-4446, 2002.

LIMA, A. F. K. T.; FRANCO, R. P. SÍNDROME DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA (SRIS), UM DESAFIO DIAGNÓSTICO. **Acta veterinária brasileira**, v. 4, n. 3, p. 123-131, 2010.

MAYR, F. B.; YENDE, S.; ANGUS, D. C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, vol. 5, n. 1, p. 4-11, 2014.

MENDONÇA, R. J. Caracterização biológica de uma fração angiogênica do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. 2004. 85p. Dissertação de Mestrado em Ciências- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

MENDONÇA, R. J. Purificação e caracterização de uma proteína angiogênica, indutora de fibroplasia e cicatrizante presente no látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. 2008. 137 p. Tese de doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

MILLS, C. D.; CALDWELL, M. D.; GANN, D. S. Evidence of a plasma-mediated "window" of immunodeficiency in rats following trauma. **Journal of Clinical Immunology**, v. 9, n. 2, p. 139-150, 1989.

MRUÉ, F. Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina. Aplicabilidade em neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães. 2000. 112 p. Tese de doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

O'NEILL, L. A. J. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. **Immunological Reviews**, v. 226, n. 1, p. 10-18, 2008.

OPAL, S. M.; DePALO, V. A. Anti-inflammatory cytokines, **Chest**, v. 117, n. 4, p. 1162-1172, 2000.

OPAL, S. M.; FISHER, C. J. J. R.; DHAINAUT, J. F.; VINCENT, J. L.; BRASE, R.; LOWRY, S. F.; SADOFF, J. C.; SLOTMAN, G. J.; LEVY, H.; BALK, R. A.; SHELLY, M. P.; PRIBBLE, J. P.; LABRECQUE, J. F.; LOOKABAUGH, J.; DONOVAN, H.; DUBIN, H.; BAUGHMAN, R.; NORMAN, J.; DEMARIA, E.; MATZEL, K.; ABRAHAM, E.; SENEFF, M. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double blind, placebo-controlled, multicenter trial. **Critical Care Medicine**, v. 25, n. 7, p.1115-24, 1997.

PECK, G. M. F. Ativação de macrófagos e sua correlação com desfecho de sepse. 2007. 62p. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, 2007.

PEREZ, M.C.A. Epidemiologia, diagnóstico, marcadores de imunocompetência e prognóstico da sepse. 2009. 106p. Tese de doutorado – Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Faculdade de Ciências Médicas do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

QUARTIN, A. A.; SCHEIN, R. M.; KETT, D. H.; PEDUZZI, P. N. Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group. **JAMA**, v. 277, n. 13, p.1058 -1063, 1997.

RANIERI, V. M.; THOMPSON, B. T.; BARIE, P. S.; DHAINAUT, J. F.; DOUGLAS, I. S.; FINFER, S.; GÅRDLUND, B.; MARSHALL, J. C.; RHODES, A.; ARTIGAS, A.; PAYEN, D.; TENHUNEN, J.; AL-KHALIDI, H. R.; THOMPSON, V.; JANES, J.; MACIAS, W. L.; VANGEROW, B.; WILLIAMS, M. D. Drotrecogin Alfa (Activated) in Adults with Septic Shock. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 22, p.2055-2064, 2012.

REINHART, K.; BAUER, M.; RIEDEMANN, N. C.; HARTOG, C. S. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 609-634, 2012.

SALES-JÚNIOR, J. A. L.; DAVID, C. M.; HATUM, R.; SOUZA, P. C. S. P; JAPIASSÚ, A.; PINHEIRO, C.T. S.; FRIEDMAM, G.; SILVA, O. B.; DIAS, M. D.; KOTERBA, E.; DIAS, F. S.; PIRAS, C. Sepse Brasil: estudo epidemiológico da sepse em unidades de terapia intensiva brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.18, n. 1, p. 9-17, 2006.

SHELLER, J.; ROSE-JOHN, S. “Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 195, n. 4, p. 173-183, 2006.

SCHOTTMUELLER, H. Wesen und Behandlung der Sepsis. Verhandl Dtsch Kongress. **Innere Medizin**, v. 31, p.57-280, 1914.

SCHULTE, W.; BERNHAGEN, J.; RICHARD, B. Cytokines in sepsis: Potent immunoregulators and Potential Therapeutic Targets - An Updated View. **Mediators of Inflammation**, v. 18, Article ID 165974, 2013.

SHANKAR-HARI, M.; PHILLIPS, G. S.; LEVY, M. L.; SEYMOUR, C. W.; LIU, V. X.; DEUTSCHMAN, C. S.; ANGUS, D. C.; RUBENFELD, G. D.; SINGER, M. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, v. 315, n. 8, p. 775-787, 2016.

STEARNS-KUROSAWA, D. J.; OSUCHOWSKI, M. F.; VALENTINE, C.; KUROSAWA, S.; REMICK, D. G. **The pathogenesis of sepsis**. *Annual Review of Pathology*, v. 6, p.19-48, 2011.

SILVA, E. Sepse: um problema de todos. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 115-116, 2011.

SILVA, E.; PEDRO, M. D. E. A.; SOGAYAR, A. C.; MOHOVIC, T.; SILVA, C.L; JANISZEWSKI, M.; CAL, R. G.; SOUSA, E. F.; ABE, T. P.; ANDRADE, J.; MATOS, J. D.; REZENDE. E.; ASSUNÇÃO, M.; AVEZUM, A; ROCHA, P. C.; MATOS, G. F.; BENTO, A. M; CORRÊA, A. D.; VIEIRA, P. C.; KNOBEL, E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**, v. 8, n. 4, p. 251-60, 2004.

SILVA, J. B. N. F. Avaliação da atividade imunomoduladora de *Propionibacterium acnes* em animais submetidos à sepse letal por ligadura e perfuração do ceco (CLP). 2012. 101p. Dissertação de mestrado - Programa de Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; LIMA, L. C.; VITORINO, R. R.; PEREZ, M. C. A.; MENDONÇA, E. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUELLER, M. Sepse: atualidades e perspectivas. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 207-216, 2011.

SOGAYAR, A. M.; MACHADO, F. R.; REA-NETO, A.; DORNAS, A.; GRION, C. M.; LOBO, S. M.; TURA, B. R; SILVA, C. L; CAL, R. G; BEER, I.; MICHELS, V.; SAFI, J.; KAYATH, M.; SILVA, E. COSTS - A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. **Pharmacoeconomics**, v. 26, n. 5, p. 425-434, 2008.

SOUZA, A. C. C. P. Ação protetora da eritropoietina na injúria renal aguda em modelo experimental de sepse. 2010. 123p. Tese de doutorado - Programa de Nefrologia da Faculdade de Medicina de São Paulo, São Paulo, 2010.

STEARNS, K. D. J.; OSUCHOWSKI, M. F.; VALENTINE, C.; KUROSAWA, S.; REMICK, D. G. The pathogenesis of sepsis. **Annual Review of Pathology**, v. 6, p. 19-48, 2011.

TEIXEIRA, L. B.; EPIFÂNIO, V. L. A. A.; LACHAT, J. J.; FOSS, N. T.; COUTINHO-NETTO, J. Oral treatment with Hev b 13 prevents experimental arthritis in mice. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 168. n. 3, p. 285-290, 2012a.

TEIXEIRA, L. B.; EPIFÂNIO, V. L. A. A.; LACHAT, J. J.; FOSS, N. T.; COUTINHO-NETTO, J. Oral treatment with Hev b 13 ameliorates experimental colitis in mice. **Clinical and Experimental Immunology**, v.169. n. 1, p. 27-32, 2012b.

WICHTERMANN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal. **The Journal of Surgical Research**, v. 29, n. 2, p. 189-201, 1980.

ZANOTTI-CAVAZZONI, S. L; GOLDFARB, R. D. Animal models of sepsis. **Critical Care Clinics**, v. 25, p. 703–719, 2009.

ZHOU, L.; GAO, M.; XIAO, Z.; ZHANG, J.; LI, X.; WANG, A. Protective effect of astaxanthin against multiple organ injury in a rat model of sepsis. **The Journal of Surgical Research**, v. 195, n. 2, p. 559-567, 2015.

ANEXOS

Anexo I. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da PUC - GO



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AVALIAÇÃO DA COMISSÃO

28. Comentários do relator frente às orientações da Lei 11.794 de 08/10/08; Decreto 6.899 de 15/07/09; Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA, regulamentada pela Portaria nº 465 de 23/05/2013 – MCT; Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia de Animais, regulamentado pela Portaria nº 596 de 25/06/2013 – MCT.

O projeto está adequadamente delineado e observa os cuidados necessários para evitar o sofrimento dos animais durante os procedimentos previstos.
Recomenda-se a sua aprovação.

PARECER DA COMISSÃO

APROVADO () PENDÊNCIA () NÃO APROVADO ()

Goiânia, 01 de setembro de 2014.

Marta Regina Magalhães
Coordenadora/CEUA PUC Goiás

Ms. Rita de Cássia
Coordenadora da Comissão de Ética no uso
de Animais da PUC Goiás
CEUA SGC/PUC Goiás

* GRAU DE INVASIVIDADE (GI) - definições segundo o CONCEA

GI1 = Experimentos que causam pouco ou nenhum desconforto ou estresse (ex.: observação e exame físico; administração oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, ou intramuscular de substâncias que não causem reações adversas perceptíveis; eutanásia por métodos aprovados após anestesia ou sedação; privação alimentar ou hídrica por períodos equivalentes à privação na natureza).

GI2 = Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de leve intensidade (ex.: procedimentos cirúrgicos menores, como biópsias, sob anestesia; períodos breves de contenção e imobilidade em animais conscientes; exposição a níveis não letais de compostos químicos que não causem reações adversas graves).

GI3 = Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de intensidade intermediária (ex.: procedimentos cirúrgicos invasivos conduzidos em animais anestesiados; imobilidade física por várias horas; indução de estresse por separação materna ou exposição a agressor; exposição a estímulos aversivos inescapáveis; exposição a choques localizados de intensidade leve; exposição a níveis de radiação e compostos químicos que provoquem

Anexo II. Comprovante de aceite do artigo 1

12/02/2017

Gmail - Aceitação BJB-063/16



Lilhian Alves de Araujo Alves <lilhianalves@gmail.com>

Aceitação BJB-063/16

1 mensagem

Brazilian Journal of Biology <bjb@bjb.com.br>

30 de novembro de 2016 11:54

Para: Lilhian Alves de Araujo Alves <lilhianalves@gmail.com>

Prezado(a) Autor(a) Lilhian Alves

Pela presente, vimos informar-lhe que seu manuscrito intitulado "Protein from *Hevea brasiliensis* "Hev b 13" latex attenuates systemic inflammatory response and lung lesions in rats with sepsis" foi aceito no Brazilian Journal of Biology.

Data prevista para publicação: Maio de 2018, ou seja, volume 78.2, porém o artigo será disponibilizado muito bem antes no "ahead of print" da SciELO com o respectivo número do DOI, mediante ao pagamento da referida taxa de publicação, que informaremos assim que o mesmo for diagramado (previsto para o 1º semestre/2017).

Atentar para as observações abaixo, sem elas o artigo ficará em pendência , caso haja necessidade de adequação enviar uma nova versão (completa com todos os arquivos que compõem o artigo) por e-mail.

Atenciosamente

Profa. Dra. Takako Matsumura Tundisi
Editora Chefe
Brazilian Journal of Biology

Rua Bento Carlos, 750
13560-660 São Carlos SP

Avaliação da Atividade Cicatricial do *Aloe vera* em Feridas em Dorso de Ratos*

Cicatricial Activity Evaluation of Aloe vera on Wounds in Rats

Cicatricial Actividad Evaluación de Aloe vera en Heridas en Ratas

Patrícia Lima Mercês¹, Lilhian Alves de Araújo¹, Ana Carolina Vicente Araújo¹,
Maísa Helena de Abreu Silva Santos¹, Susy Ricardo Lemes¹, Paulo Roberto de Melo-Reis¹

RESUMO

A *Aloe vera*, popularmente conhecida como babosa, é uma das plantas mais utilizadas no tratamento de feridas, visto que inúmeras pesquisas relatam suas propriedades cicatrizantes e anti-inflamatórias. O objetivo do estudo foi avaliar a influência da *Aloe vera* na atividade cicatricial de feridas induzidas em dorso de ratos. Foram utilizados 15 ratos saudáveis da espécie *Rattus norvegicus albinus*. Por intermédio da criação de uma lesão no dorso de cada rato utilizando um molde do tamanho retangular 2,0 x 3,0 cm, foi aplicado o gel de *Aloe vera*, solução teste, além dos controles positivo e negativo. Os resultados na avaliação macroscópica demonstraram que 100% dos ratos tratados com o gel de *Aloe vera* apresentaram um fechamento completo das lesões no 21º dia do experimento. O grupo controle positivo obteve 40% das amostras com fechamento completo. A análise estatística demonstrou, no entanto, que não houve diferença significativa entre o grupo teste e o grupo controle positivo ($p > 0,05$), porém houve diferenças ($p < 0,05$) entre o grupo teste e o controle negativo. Por meio dos resultados obtidos, concluiu-se que o gel de *Aloe vera* apresenta potencial aplicabilidade farmacêutica para o tratamento de feridas, podendo apresentar componentes isolados pró-angiogênicos.

DESCRIPTORIOS: Babosa. Cicatrização. Fitoterapia. Estomaterapia.

ABSTRACT

The *Aloe vera*, popularly known as aloe, is one of the plants most commonly used in the treatment of wounds, since numerous studies reporting their anti-inflammatory and cicatrizing properties. The aim of the study was to evaluate the influence of *Aloe vera* in the healing activity of wounds induced in rats. Fifteen healthy rats *Rattus norvegicus albinus* were used. By creating a lesion on the back of each rat using a rectangular size of 2.0 x 3.0 cm mold, *Aloe vera* gel has been applied, the test solution, in addition to positive and negative controls. The results in macroscopic evaluation showed that 100% of the mice treated with *Aloe vera* gel showed a complete closing of the injury on day 21 of the experiment. The positive control group had 40% of the samples with complete closure. Statistical analysis showed, however, that there was no significant difference between the test group and the control group ($p > 0.05$), however there were differences ($p < 0.05$) between the test group and the negative control. From the results obtained, it was concluded that the *Aloe vera* gel has potential pharmaceutical applicability for the treatment of wounds, and may have a single component pro-angiogenic.

DESCRIPTORS: Aloe. Wound healing. Phytotherapy. Stomatherapy.

Endereço para correspondência: Rua 232, 128, 3º Andar, Sala 5 – CEP: 74605-010 – Goiânia (GO), Brasil – E-mail: patricialimamercês@gmail.com

*Artigo retirado de Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde com título "Avaliação das Atividades Angiogênica e Cicatricial do Extrato de *Aloe vera* (*Aloe barbadensis*)", defendida por Patrícia Lima Mercês em maio de 2015 na Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO).

¹Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO) – Goiânia (GO), Brasil.

Artigo recebido em: 07/03/2016 – Aceito para publicação em: 21/06/2016

Avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa da *Tabebuia impetiginosa* (Ipê-roxo)

*Evaluation of the angiogenic activity of the aqueous solution of *tabebuia impetiginosa* (purple Ipe)*

Paulo Sávio Paim de Moraes¹, Carolyna de Sousa Carvalho², Dwight Assis Chaves³, Maria Alice Montes de Sousa³, Susy Ricardo Lemes⁴, Lilhian Alves de Araújo⁴, Fátima Mrué², Paulo Roberto de Melo-Reis⁵,

- 1 Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Mestrado em Genética. Praça Universitária com 1ª avenida (esq. com Rua 235) – Setor Universitário. CEP 74605-010 – Goiânia – GO.
- 2 Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas. Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde. 1ª Avenida, 1069 – Setor Universitário. CEP 74605-020 – Goiânia - GO.
- 3 Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde. Rua 232, 128, 3º andar – Setor Universitário. CEP 74605-140 – Goiânia – GO.
- 4 Universidade Federal de Goiás. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade. Rua 235, s/n – Setor Universitário. CEP 74605-050 – Goiânia – GO.
- 5 Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos. Rua 232, 128, 3º andar – Setor Universitário. CEP 74605-140 – Goiânia – GO.

Resumo: A *Tabebuia impetiginosa* é uma planta conhecida popularmente como ipê-roxo, encontrada na América do Sul e Central e amplamente distribuída no cerrado brasileiro. A casca da planta apresenta componentes químicos que possuem ação anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana e antifúngica, podendo ser utilizada no tratamento de diversas enfermidades. Com base no potencial terapêutico que os componentes químicos extraídos da casca da planta podem oferecer, o presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade angiogênica da *Tabebuia impetiginosa* (Ipê-roxo). A possível atividade angiogênica da planta foi avaliada pelo ensaio da membrana corio-alantoide (MCA) de ovos embrionados de galinha. O experimento evidenciou um aumento da rede vascular ($p < 0,05$) da MCAs em relação aos controles neutro (H₂O) e inibidor (Dexametazona) pelo uso da solução aquosa do ipê-roxo na concentração de 10 mg/ml, inferindo deste modo, que esta substância possui atividade angiogênica.

Palavras-chave: *Tabebuia impetiginosa*. Ipê-roxo. Atividade angiogênica. Membrana corio-alantoide.

Abstract: The *Tabebuia impetiginosa* is a plant popularly known as Purple Ipe, found in South and Central Americas and variably distributed in the Brazilian Cerrado. The plant's bark presents chemical components with anti-inflammatory, antitumor, antibacterial and antifungal actions, being able to be utilized in several infirmities. Based on therapeutic potential that the tree's bark can offer, the present study had its objective set on avail of the angiogenesis capacity of the *Tabebuia impetiginosa* by the chorioallantoic membrane (CAM) assay in embryonated hen eggs. The experiment showed an increase in vascular nets ($p < 0,05$) from CAMs related to the negative controls (H₂O) and inhibitor (Dexamethasone) by the use of aqueous solution at 10 mg/dL of the purple Ipe, inferring that this substance possesses an angiogenic action.

Keywords: *Tabebuia impetiginosa*. Purple Ipe. Angiogenic activity. Chorioallantoic membrane.

Avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*)

CHAVES, D.A.¹; LEMES, S.R.²; ARAUJO, L.A.³; SOUSA, M.A.M.¹; FREITAS, G.B.¹; LINO-JUNIOR, R.S.³; MRUE, F.¹; MELO-REIS, P.R.¹.

¹Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos, Rua 232, nº 128, 3º andar, Goiânia-GO, Brasil, CEP 74605-140. ²Universidade Federal de Goiás- UFG, Av. Esperança, s/n- Setor Itatiaia, Campus Samambaia, Goiânia-GO, Brasil, CEP 74690-900. ³Universidade Federal de Goiás. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Laboratório de Patologia Experimental., Rua 235 S/N, Setor Universitário, Goiânia - Goiás. *Autor para correspondência: susy_nzr@gmail.com

RESUMO: O Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) planta medicinal encontrada no bioma Cerrado apresenta propriedades físico-químicas que lhe garante importantes atividades farmacológicas tais como: anti-inflamatória, analgésica e uma atividade protetora da mucosa gástrica. A casca do tronco é a principal matéria-prima usada para o desenvolvimento de produtos medicinais. Neste estudo, o objetivo foi investigar a influência da solução aquosa da casca do barbatimão no processo de formação de vasos sanguíneos na membrana corioalantoide de ovo embrionado de galinha. Foram utilizadas 30g da casca triturada em um litro de água. Este processo permitiu a obtenção da Solução Aquosa de Barbatimão - SAB em uma concentração de 30mg/mL. A atividade angiogênica da solução aquosa do barbatimão foi avaliada mediante realização de testes laboratoriais "in vivo", utilizando como modelo experimental a membrana do ovo embrionado de galinha (MCA). Utilizou-se como controle indutor o Regederm®, o qual apresenta atividade angiogênica conhecida. Os resultados demonstraram que a SAB apresentou um percentual de vascularização na MCA de (50,4%) não tendo diferença ($p > 0,05$) aos valores detectados no controle indutor (52,9%). Com os resultados obtidos, percebe-se que o barbatimão apresenta atividade angiogênica no modelo experimental utilizado.

Palavras chave: Angiogênese, barbatimão, membrana, ovo.

ABSTRACT: Angiogenic activity of the aqueous solution of Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). The Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) medicinal plant found in the Cerrado biome has physicochemical properties which guarantee important pharmacological activities such as anti-inflammatory, analgesic and protective activities of gastric mucosa. The bark of the trunk is the main raw material used for the development of medicinal products. In this study, the objective was to investigate the influence of the aqueous solution of barbatimão bark in the formation of blood vessels in the membrane of embryonated chicken egg chorioallantoic. 30g of shredded bark was used in one liter of water. This process enabled the obtention of aqueous Barbatimão - BSA at a concentration of 30mg / ml. The angiogenic activity of the aqueous solution of barbatimão was assessed by laboratory testing "in vivo", using the chorioallantoic membrane of embryonated chicken egg (MCA) as an experimental model. The Regederm® control inductor was used, which exhibits known angiogenic activity. The results showed that the percentage of BSA showed a vascularization of the MCA (50.4%) there was no difference ($p > 0.05$) in the values detected in the control inductor (52.9%). With the obtained results, it is clear that barbatimão shows angiogenic activity under the experimental model used.

Key words: Angiogenesis, barbatimão, membrane, egg.

Evaluation of wound healing treated with latex derived from rubber trees and *Aloe Vera* extract in rats¹

Marcelo Luiz Brandão^I, Paulo Roberto Melo Reis^{II}, Lillian Alves de Araújo^{III}, Ana Carolina Vicente Araújo^{IV}, Maisa Helena de Abreu Silva Santos^{IV}, Marina Pacheco Miguel^V

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-865020160090000001>

^IPhD, Associate Professor, Laboratory of Surgical Technique, School of Medical Sciences, Pharmaceutical and Biomedical, Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-Goiás), Goiânia-GO, Brazil. Intellectual, scientific and design of the study; acquisition and interpretation of data; technical procedures; critical revision; supervised all phases of the study.

^{II}PhD, Associate Professor, Master's Program in Environmental Sciences and Health, School of Medical Sciences, Pharmaceutical and Biomedical, PUC-Goiás, Goiânia-GO, Brazil. Intellectual, scientific and design of the study; acquisition and interpretation of data; technical procedures; critical revision.

^{III}Master, Fellow PhD degree, Program in Biotechnology and Biodiversity - Pro-Midwest Network, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia-GO, Brazil. Acquisition of data, technical procedures.

^{IV}Graduate student, School of Medical Sciences, Pharmaceutical and Biomedical, PUC-Goiás, Goiânia-GO, Brazil. Acquisition, analysis and interpretation of data; statistical analysis; technical procedures; manuscript preparation.

^VPhD, Class A Professor, General Pathology, Tropical Institute of Pathology and Public Health, UFG, Goiânia-GO, Brazil. Technical procedures, analysis and interpretation of data, statistical analysis, manuscript preparation, critical revision.

ABSTRACT

PURPOSE: To compare the use of latex derivative and *Aloe vera* extract to wound healing.

METHODS: Twenty one rats were randomly divided into three groups and each one had a wound made by incision. The treatment consisted in: derivative of latex (GL), *Aloe vera* extract (GA) and saline solution (GC). The wound area was measured on the 7th, 14th and 21st days and macroscopic and microscopic evaluation were done.

RESULTS: The comparison between the measurements of the wounds presented statistical difference in GC and GA from the 7th day of evaluation and GL from the 14th day. The extent of the wound was significantly smaller by the 7th day in GL. Histologically, in GL, the neovascularization was significant on the 7th, 14th and 21st days. On the 21st day the scar was large and little mature. In GA and GC, the findings were similar on the 7th, 14th and 21st days with a slight better organization of skin and collagen on the 21st in GA.

CONCLUSIONS: Statistical analysis did not allow for the definition of the best topical agent. The latex had the highest angiogenesis, but a possible foreign body granuloma. *Aloe vera* has revealed a healing process adequated temporally in histology.

Key words: Angiogenesis. Wound Healing. Aloe. Hevea. Rats.

**Perfil bioquímico de *Sapajus libidinosus spix*, 1923,
e bugios (*Alouatta caraya Humboldt*, 1812) de vida
livre do Sul do Estado do Tocantins**

*Profile biochemist of sapajus libidinosus spix, 1923
and Alouatta caraya Humboldt, 1812 monkeys
from Southern Tocantins State, Brazil*

Cynthia Leão Baldini Ribeiro¹, Nelson Jorge da Silva-Júnior¹, Susy Ricardo Lemes²,
Lilhan Alves de Araújo², Paulo Roberto de Melo-Reis³

1 Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde. Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas. Avenida Universitária, 1440 – Setor Universitário. CEP 74605-010 – Goiânia - GO.

2 Universidade Federal de Goiás. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade. Rua 235, s/n – Setor Universitário. CEP 74605-050 – Goiânia – GO.

3 Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos. Rua 232, 128, 3º andar – Setor Universitário. CEP 74605-140 – Goiânia – GO

Resumo: Este estudo objetivou estabelecer valores de referência para dosagens de parâmetros sanguíneos de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*) e bugios (*Alouatta caraya*) de vida livre no Sul do estado do Tocantins, Brasil. Foram colhidas amostras de sangue de 15 macacos-prego e 47 bugios pretos, todos capturados manualmente durante o resgate de fauna da usina hidrelétrica São Salvador situada ao sul do Estado do Tocantins, no alto rio Tocantins. Foram avaliadas variáveis distribuídas nos seguintes grupos: dosagens bioquímicas (dez variáveis), lipídicas (cinco variáveis) e hormonais (duas variáveis). Os resultados obtidos para cada variável foram apresentados e comparados por sexo usando estatística descritiva considerando os valores mínimos, máximos, média e desvio padrão. Para *S. libidinosus* foi observada diferenças significativas em apenas três variáveis (Peso corporal, creatinina e hormônio T3), houve diferença sexual significativa em apenas um grupo de variáveis (hormônios), enquanto que para *A. caraya* foi observada diferença significativa em oito variáveis (peso corporal, VLDL, triglicérides, proteínas totais, RDW, plaquetas, DHL e fosfatase alcalina), apenas o grupo de variáveis relacionado à bioquímica geral apresentou diferença sexual significativa. A importância deste trabalho científico deve-se ao seu caráter inédito relacionado à avaliação e variação sexual do perfil bioquímico de *Sapajus libidinosus* e *Alouatta caraya* de vida livre.

Palavras-chave: *Alouatta caraya*. Dosagens bioquímicas. *Sapajus libidinosus*.

Abstract: This study aimed to establish reference values for dosing sanguine parameters of free-ranging capuchin (*Sapajus libidinosus*) and howler (*Alouatta caraya*) monkeys from southern Tocantins state, Brazil. Were collected 15 blood samples from capuchin and 47 howler monkeys, all captured manually during a fauna rescue from a hydroelectric plant in southern Tocantins state, on the Tocantins river high. Were evaluated distributed variables in the groups: biochemical tests (ten variables), lipid (five variables) and hormonal (two variables). The results achieved for each variable were presented and compared by gender through descriptive statistics, considering minimum, maximum, mean and standard deviation. Was observed significant differences for *S. libidinosus* in only three variables (body weight, creatinine and T3), there was significant difference in the gender only one group variables (hormones), while it was observed significant difference in eight variables *A. caraya* (body weight, VLDL, triglycerides, total protein, RDW, platelets, DHL and alkaline phosphatase), only the variable group of general biochemistry showed significant difference gender. The importance of this scientific work is due to its unprecedented nature relative to assessment and gender variation of the biochemical profile of ree-ranging *Sapajus libidinosus* and *Alouatta caraya* monkeys.

Keywords: *Alouatta caraya*. Biochemical dosages. *Sapajus libidinosus*.

Autor correspondente: susynzr@gmail.com

Recebido: fevereiro, 2016 | Aceito: março, 2016 | Publicado: outubro, 2016



Este artigo está licenciado com uma Licença Creative Commons. Atribuição Sem Derivações 4.0 CC BY-NC-ND.



Physicochemical/photophysical characterization and angiogenic properties of *Curcuma longa* essential oil

LILHIAN A. ARAÚJO¹, RAFAEL G.M. ARAÚJO², FLÁVIA O. GOMES², SUSY R. LEMES¹, LUCIANE M. ALMEIDA³, LAURO J.Q. MAIA⁴, PABLO J. GONÇALVES⁴, FÁTIMA MRUE⁵, NELSON J. SILVA-JUNIOR² and PAULO R. DE MELO-REIS²

¹Universidade Federal de Goiás, Biotecnologia e Biodiversidade, Campus Samambaia, ICB IV, Avenida Esperança, Setor Itatiaia, 74001-970 Goiânia, GO, Brasil

²Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos, Área V, Rua 232, 128, 74605-140 Goiânia, GO, Brasil

³Universidade Estadual de Goiás, UnU-Ipameri, Rodovia GO-330, Km 241 Anel Viário, 75780-000 Ipameri, GO, Brasil

⁴Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Avenida Esperança, Setor Itatiaia, 74001-970 Goiânia, GO, Brasil

Manuscript received on September 3, 2015; accepted for publication on March 1, 2016

ABSTRACT

This study analyzed the physicochemical and photophysical properties of essential oil of *Curcuma longa* and its angiogenic potential. The results showed that curcumin is the main fluorescent component present in the oil, although the amount is relatively small. The experimental chorioallantoic membrane model was used to evaluate angiogenic activity, showing a significant increase in the vascular network of *Curcuma longa* and positive control groups when compared to the neutral and inhibitor controls ($P < 0.05$), but no significant difference was found between *Curcuma longa* essential oil and the positive control ($P > 0.05$). Histological analysis showed extensive neovascularization, hyperemia and inflammation in the positive control group and *Curcuma longa* when compared to other controls ($P < 0.05$), characteristic factors of the angiogenesis process. In conclusion, *Curcuma longa* oil showed considerable proangiogenic activity and could be a potential compound in medical applications.

Key words: angiogenic activity, curcumin, essential oil, physicochemical.

INTRODUCTION

In recent years the search for materials that stimulate the angiogenesis process has received considerable attention. In particular, biomaterials produced from natural rubber latex have shown biocompatibility as well as stimulating angiogenesis, cell adhesion and extracellular matrix formation (Floriano et al.

2013, Mrue et al. 2004). Angiogenesis is a complex biological process that favors the formation of new blood vessels from preexisting vascular tissue by proliferation, migration, regulation and differentiation of vascular cells (Folkman 2003). From the point of view of medical applications, materials that induce angiogenesis are important for tissue engineering, to enhance cell proliferation or promote wound healing (Schulz et al. 2003, Shen and Falanga 2003).

Correspondence to: Lilhian Alves de Araújo
E-mail: lilhianalves@gmail.com



ARTIGO

Análise hematológica de macacos-prego (*Sapajus libidinosus* Spix, 1923) e bugios (*Alouatta caraya* Humboldt, 1812) de vida livre no sul do estado de Tocantins, Brasil

Cynthia Leão Baldini Ribeiro¹, Paulo Roberto de Melo-Reis¹, Susy Ricardo Lemes², Lihlian Alves de Aratijo^{1,3*} e Nelson Jorge da Silva-Júnior^{1,3}

Recebido: 23 de dezembro de 2014 Recebido após revisão: 9 de março de 2015 Aceito: 18 de maio de 2015
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3260>

RESUMO: (Análise hematológica de macacos-prego (*Sapajus libidinosus* Spix, 1923) e bugios (*Alouatta caraya* Humboldt, 1812) de vida livre no sul do estado de Tocantins, Brasil). Com o objetivo de estabelecer os valores hematológicos e comparar possíveis diferenças relacionadas ao sexo de macacos-prego (*Sapajus libidinosus*) e bugios (*Alouatta caraya*) adultos, saídos e de vida livre, foram colhidas amostras de sangue de 15 macacos-prego (5 machos e 10 fêmeas) e 47 bugios pretos (28 machos e 19 fêmeas), todos capturados durante o resgate da fauna de uma usina hidrelétrica no sul de Tocantins, Brasil. Foram avaliadas nove variáveis de perfil hematológico e os resultados entre os grupos e sexo comparados pelos testes ANOVA e MANOVA, considerando valores significativos para $p \leq 0.05$. Não foram encontradas diferenças significativas nos valores hematológicos para ambos os sexos de *S. libidinosus*, entretanto, para a espécie *A. caraya* os resultados de RDW ($\delta 14.37\%$; $\delta 13.53\%$) e plaquetas ($\delta 186 \times 10^9/\text{mm}^3$; $\delta 153 \times 10^9/\text{mm}^3$) foram significativamente maiores em machos. Além disso, as médias das variáveis hematológicas analisadas de ambas as espécies, se apresentaram em geral, semelhantes as relatadas em animais de cativeiro.

Palavras-chave: Hematologia, Primatas Neotropicais, Vida livre

ABSTRACT: (Hematological analysis of free-ranging capuchin (*Sapajus libidinosus* Spix, 1923) and howler (*Alouatta caraya* Humboldt, 1812) monkeys from southern Tocantins state, Brazil). In order to determine the hematological values and compare possible sex-related differences in healthy, adult free-ranging black-striped capuchin (*Sapajus libidinosus*) and howler (*Alouatta caraya*) monkeys, blood samples were collected from 15 capuchins (5 males and 10 females) and 47 black howler monkeys (28 males and 19 females). All monkeys were captured during a fauna rescue from a hydroelectric plant in southern Tocantins state, Brazil. Nine hematological profile variables were assessed, and the results were compared between groups and sexes using ANOVA and MANOVA, with a significance level of $p \leq 0.05$. No significant difference was found in the hematological values of neither sex of *S. libidinosus*. However, in *A. caraya*, the RDW ($\delta 14.37\%$; $\delta 13.53\%$) and number of platelets ($\delta 186 \times 10^3/\text{mm}^3$; $\delta 153 \times 10^3/\text{mm}^3$) were significantly higher in males. Furthermore, the mean values of the hematological variables in both species were overall similar to those reported to captive animals.

Keywords: free-ranging, hematology, neotropical primates.

INTRODUÇÃO

A espécie de primatas *Sapajus libidinosus*, pertence à família Cebidae, conhecida popularmente por “macacos-prego”, foi recentemente incluída no gênero *Sapajus* por Lynch *et al.* (2012), e pode ser encontrada ao longo das Américas Central e Sul. No Brasil sua distribuição se estende principalmente no Cerrado e Caatinga (Sussman 2000, Silva-Júnior 2008).

Já a espécie *Alouatta caraya*, também conhecida popularmente por “bugio”, pertence à família Atelidae e pode ser encontrada nas florestas tropicais do sudoeste e centro do Brasil, nordeste da Argentina, leste da Bolívia e do Paraguai e no extremo noroeste do Uruguai (Auricchio 1995, Bicca-Marques 1991, Treves 2001, Murphey 1976, Gregorin 2006).

Os valores hematológicos são uma importante ferramenta laboratorial que auxilia a medicina veterinária estabelecer diagnósticos, acompanhar a evolução de doenças e também terapias medicamentosas. No entanto, esses valores para animais de vida livre raramente são estudados, pois são de difícil captura e manejo, é necessária autorização de órgãos competentes, treinamento técnico específico, e ainda, as condições de campo nem sempre são favoráveis (Barguer 2003).

Estão descritos nos exames hematológicos a quantidade e a qualidade de elementos celulares presente no sangue, características que podem sofrer alterações por vários fatores como: condições ambientais e escore corporal dos indivíduos, manejo, uso de anestésico, raça, sexo, idade e condições estresse. A influência desses fatores são importantes e devem ser considerados durante

1. Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde. Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO). Área V, Campus I, Rua 232, no. 128, 3º andar, CEP 74605-140, Goiânia, GO, Brasil.

2. Mestrado em Genética. Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO). Av. Universitária, 1440, Área IV, Bloco I, Campus I, Setor Universitário, CEP 74605-010, Goiânia, GO, Brasil.

3. Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade. Universidade Federal de Goiás (UFG). Campus Samambaia, ICB IV. Avenida Esperança, Setor Itatiaia, CEP 74001-970, Goiânia, GO, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: lihlianalves@gmail.com

Angiogenic activity of latex from *Euphorbia tirucalli* Linnaeus 1753 (Plantae, Euphorbiaceae)

Bessa, G.^a, Melo-Reis, PR.^{b*}, Araújo, LA.^a, Mrué, F.^c,
Freitas, GB.^a, Brandão, ML.^c and Silva Júnior, NJ.^a

^aPró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC-GO,
Campus I, Rua 232, 128, 3º andar, Área V, CEP 74605-140, Goiânia, GO, Brazil

^bLaboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos – LEB, Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e
Saúde, Departamento de Biomedicina e Farmácia, Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC-GO, Campus I,
Rua, 232, 128, 3º andar, sala 6, Área V, CEP 74605-140, Goiânia, GO, Brazil

^cDepartamento de Medicina, Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC-GO, Campus I,
Avenida Universitária, 1440, Setor Universitário, Área IV, Bloco I, CEP 74605-010, Goiânia, GO, Brazil

*e-mail: melo_reis@yahoo.com.br

Received: January 17, 2014 – Accepted: March 10, 2014 – Distributed: August 31, 2015

(With 3 figures)

Abstract

To assess the pro-angiogenic activity of *Euphorbia tirucalli*, commonly known as “avelós” plant, we performed a series of tests by applying an aqueous *E. tirucalli* latex solution (10 mg/mL) to the chorioallantoic membranes (CAMs) of 80 fertilized chicken eggs incubated in a temperature- and humidity-controlled automatic incubator. The results indicated that the aqueous latex solution increased vascular network formation compared to that with the negative control ($p < 0.05$) and the inhibitor control ($p < 0.05$). This suggests that under the experimental conditions tested, the aqueous latex solution induced an inflammatory response leading to neoangiogenesis.

Keywords: angiogenesis, chorioallantoic membrane, *Euphorbia tirucalli*.

Atividade angiogênica do látex da *Euphorbia tirucalli* Linnaeus 1753 (Plantae, Euphorbiaceae)

Resumo

Com o objetivo de analisar a atividade angiogênica apresentada pela *Euphorbia tirucalli*, popularmente conhecida comumente como “avelós”, foram realizados ensaios utilizando solução aquosa de látex na concentração de 10 mg/ml, aplicada em membrana corioalantóide (MCA) de 80 ovos férteis de galinha, incubado em estufa automática com temperatura e umidade controladas. Os resultados apontaram que a ação da solução aquosa provocou aumento da percentagem da rede vascular formada em relação aos controles negativo ($p < 0,05$) e inibidor ($p < 0,05$), indicando que nas condições deste experimento, foi responsável pela ativação da resposta inflamatória e crescimento de novos vasos sanguíneos.

Palavras-chave: angiogênese, membrana corioalantóide, *Euphorbia tirucalli*.

1. Introduction

Angiogenesis is defined as the formation of new blood vessels from pre-existing capillary vessels, involving a series of coordinated events: proliferation of endothelial cells, migration of cells to distal points, cell realignment, vessel formation, and production of a new basement membrane (Folkman, 1976; Folkman and Ingber, 1992). It occurs in physiologic processes such as menstruation, ovulation, and wound healing. In the heart in particular, angiogenesis promotes vascular ramification of coronary vessels, increase in blood flow, and cardiac contractility. Angiogenesis also occurs in pathological processes such as

chronic arthropathy, psoriasis, diabetic retinopathy, tumoral growth, and metastasis dissemination (González et al., 2000; Safatle et al., 2002; Folkman, 1976, 2004).

To date, diverse studies have been conducted with the aim of finding substances that can induce angiogenesis, since the possibilities of clinical application of these substances in myocardial vascularity and the central nervous system are extensive, after injury or ischemia, partial replacement of large arteries, and even in wound healing (Krupinski et al., 2003; Slevin et al., 2005).

Angiogenic activity of sucupira (*Pterodon emarginatus*) oil

Atividade angiogênica do óleo de sucupira (*Pterodon emarginatus*)

Lilhan Alves de Araújo¹, Lazieny Avelina Assunção¹, Nelson Jorge Silva-Júnior¹,
Susy Ricardo Lemes², Paulo Roberto Melo-Reis³

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Genética, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

³ Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

ABSTRACT

Aims: To assess the angiogenic activity of sucupira (*Pterodon emarginatus*) oil, popularly used as an antirheumatic, analgesic, antimicrobial, and anti-inflammatory agent.

Methods: The chick (*Gallus domesticus*) embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay was used as an experimental model, incubated in a temperature- and humidity- controlled automatic incubator during the first five days. A circular hole was made at the wider base of the eggshell on the fifth day. After 13 days of incubation, filter paper discs containing sucupira oil and control substances were inserted into the CAM. Subsequently, the CAMs were removed and submitted to analysis and quantification of the vascular network. The nonparametric Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's test, was used for the statistical analysis, and differences between the samples were set at a 5% level ($p < 0.05$).

Results: Sucupira oil at a concentration of 1g/mL induced a significant increase in the percentage area of the CAM vascular network of the embryonated chicken eggs, when compared with the neutral control (water) and inhibitory control (dexamethasone) groups ($p < 0.001$). However, no significant difference in the induction of the CAM vascular network ($p > 0.05$) was demonstrated between the oil and the positive control (Biocure) groups.

Conclusions: The sucupira (*Pterodon emarginatus*) bean oil induced the formation of new blood vessels under the experimental conditions of the present study.

KEY WORDS: angiogenesis; membrane, chorioallantoic; *Pterodon emarginatus*

RESUMO

Objetivos: Avaliar a atividade angiogênica do óleo de sucupira (*Pterodon emarginatus*), popularmente utilizado como antirreumático, analgésico, antimicrobiano e anti-inflamatório.

Métodos: Foi aplicado como modelo experimental o ensaio na membrana corioalantóideia (MCA) de ovo embrionado de galinha (*Gallus domesticus*). Os ovos foram incubados em estufa automática com temperatura e umidade controladas durante os primeiros cinco dias. No quinto dia foi realizada uma abertura circular na base maior da casca do ovo. No 13º dia de incubação, discos de papel de filtro contendo óleo de sucupira e as substâncias controle foram inseridos sobre vasos da MCA. Posteriormente, as MCAs foram removidas e passaram por análise e quantificação da rede vascular. Para análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de Dunn, sendo os valores aceitáveis para diferenças significativas entre as amostras de $p < 0.05$.

Resultados: O óleo de fava de sucupira na concentração de 1g/mL induziu um aumento significativo na área de porcentagem da rede vascular na MCA do ovo embrionado de galinha, quando comparados aos grupos controles neutro (água) e inibidor (dexametasona) ($p < 0.001$). Porém, não foi demonstrada diferença significativa entre o óleo e o controle positivo (Biocure) na indução da rede vascular na MCA ($p > 0.05$).

Conclusões: O óleo da fava de sucupira (*Pterodon emarginatus*), nas condições deste experimento, foi responsável pela formação de novos vasos sanguíneos.

DESCRIPTORES: angiogênese; membrana corioalantóideia; *Pterodon emarginatus*

Received: May, 2015

Accepted: July, 2015

Published: September, 2015

Correspondence: lilhianalves@gmail.com



This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original publication is properly cited.
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic activities of sucupira oil (*Pterodon emarginatus*)

L.A. Assunção¹, S.R. Lemes², L.A. Araújo^{1,3}, C.R. Costa⁴, L.G. Magalhães⁴, K.K. Moura^{1,2,5} and P.R. Melo-Reis^{1,2,5}

¹Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnologia, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

²Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

³Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

⁴Biomedicina, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

⁵Instituto de Farmácia e Ciências Biomédicas,

Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

Corresponding author: P.R. Melo-Reis

E-mail: melo.reis@ig.com.br

Genet. Mol. Res. 14 (2): 6323-6329 (2015)

Received August 25, 2014

Accepted December 2, 2014

Published June 11, 2015

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2015.June.11.7>

ABSTRACT. The present study aimed to assess the cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic activities of sucupira oil (*Pterodon emarginatus*), which is commonly used as an anti-rheumatic, analgesic, antimicrobial, anticercariae, and anti-inflammatory. We used the mouse bone marrow micronucleus test as an experimental model. The experimental groups, which consisted of 5 animals, was administered sucupira oil (100 mg/kg body weight) intraperitoneally and evaluated 24 h after the treatment. The negative control group was treated with sterile distilled water, and the positive control group received an intraperitoneal dose of 4 mg/kg mitomycin C, a dose that corresponds to 80% of its median lethal dose. Cytotoxicity was determined by the polychromatic to normochromatic

Avaliação de morbidade na área de influência da usina hidrelétrica Cana Brava - GO

Lays Karolina Soares da Cruz¹; Nelson Jorge da Silva Júnior¹; Susy Ricardo Lemes¹; Dwight Assis Chaves¹; Lilhian Alves de Araujo²; Paulo Roberto de Melo-Reis^{1*}

¹Laboratório de Ensaios Biotecnológicos do Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde (MCAS), Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 74605-010, Goiânia-GO, Brasil

²Doutoranda em Biodiversidade e Biotecnologia da Universidade Federal de Goiás, 74690-900, Goiânia - Goiás, Brasil.

*melo_reis@yahoo.com.br

(Recebido em 29 de dezembro de 2014; aceito em 09 de março de 2015)

Este estudo teve como objetivo fazer uma avaliação da possível interferência do processo de implantação da Usina Hidrelétrica (UHE) Cana Brava nos casos de morbidade nos municípios de Cavalcante, Colinas do Sul e Minaçu, que compõe sua área de influência direta. Foram considerados dados relativos às condições de morbidade e o perfil de uso do solo dos três municípios. As informações analisadas foram extraídas das fontes oficiais existentes, Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade (PROBIO) e pela empresa Naturae. As análises dos dados foram feitas pelo teste estatístico Análise de Covariância (ANCOVA). O município de Cavalcante apresentou taxas crescentes de morbidade no período de 1995 a 2006, com queda em 2007. O município de Colinas do Sul apresentou dados de morbidade compatíveis com a diminuição da população no período de 1995 a 1997. Minaçu apresentou, no período de 1995 a 1998, taxas de morbidade inferiores ao crescimento populacional, elevando-se nos anos seguintes. Além destes dados, foi detectada a ocorrência de 982 casos de dengue em Minaçu, dois casos de Dengue em Cavalcante e oito casos em Colinas do Sul. O perfil do uso do solo mostra a intensificação das atividades agropecuárias ao longo dos anos nos três municípios estudados. Considerando os fatores discutidos, sugere-se que a implantação da UHE Cana Brava tenha influenciado na ocorrência de morbidades nos municípios de sua área de influência direta.

Palavras-Chave: Hidrelétrica, Morbidade, Cana Brava.

Evaluation of morbidity in the area of influence of the Cana Brava hydroelectric Power Plant - GO

This study aimed to evaluate the possible interference of the construction process of the Cana Brava hydroelectric power plant (HPP) in cases of morbidity in the municipalities of Cavalcante, Colinas do Sul and Minaçu, which comprises its direct influence area. We considered the data related to the morbidity conditions and the land use profile of the three municipalities. The analyzed information were extracted from the existing official sources, System of Information of Notifiable Diseases (SINAN), National Institute for Space Research (INPE), the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE), Project of Conservation and Sustainable Use of Biodiversity (PROBIO), and the consulting company Naturae. The data analysis was carried out by the statistical test of Covariance (ANCOVA). The municipality of Cavalcante presented increasing morbidity rates from 1995 to 2006, with a drop in 2007. The municipality of Colinas do Sul presented morbidity rated compatible with the decrease of the population between 1995 and 1997. Minaçu presented, from 1995 to 1998, morbidity rates below the population growth, increasing in the following years. Beside these data, the occurrence of 982 cases of dengue in Minaçu, two cases of Dengue in Cavalcante and eight cases in Colinas do Sul was detected. The land use profile shows the intensification of agricultural activities over the years in the three municipalities studied. Considering the factors discussed, it is suggested that the implementation of the Cana Brava hydroelectric plant might have influenced the occurrence of morbidities in municipalities in its area of direct influence.

Keywords: Hydroelectric, Morbidity, Cana Brava.

EFFECTS OF TOPICAL TREATMENT WITH EUPHORBIA TIRUCALLI LATEX ON THE SURVIVAL AND INTESTINAL ADHESIONS IN RATS WITH EXPERIMENTAL PERITONITIS

Efeitos do tratamento tóxico com o látex da *Euphorbia tirucalli* na sobrevida e nas aderências intestinais de ratos com peritonite experimental

Lilhan Alves de ARAÚJO¹, Fátima MRUÉ¹, Roberpaulo Anacleto NEVES¹, Maxley Martins ALVES¹,
 Nelson Jorge da SILVA-JÚNIOR¹, Marcelo Seixo de Brito, SILVA², Paulo Roberto de MELO-REIS¹

From the¹Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Área V, Campus I, Pontifícia Universidade Católica de Goiás and ²Departamento de Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Campus Samambaia, Universidade Federal de Goiás (Postgraduate in Master Degree in Environmental and Health Sciences, Pro-Rector of Postgraduate Studies and Research, Area V, Campus I, the Catholic University of Goiás and ³Department of Veterinary Medicine, Veterinary School, Campus Samambaia, Federal University of Goiás), Goiânia, GO, Brazil

HEADINGS - Peritonitis. *Euphorbia tirucalli*. Survival.

Correspondence:
 Lilhan Alves de Araújo
 E-mail: lilhanalves@gmail.com

Financial source: none
 Conflicts of interest: none

Received for publication: 05/05/2015
 Accepted for publication: 18/08/2015

DESCRIPTORES: Peritonite. *Euphorbia tirucalli*. Sobrevida.

ABSTRACT – Background: The use of plants of the family Euphorbiaceae, particularly *Euphorbia tirucalli* (avelós) has been popularly widespread for treating a variety of diseases of infectious, tumoral, and inflammatory. **Aim:** To demonstrated antimicrobial and immunomodulatory effects of these extracts, evaluating the effect of a topical treatment with an aqueous solution of avelós latex on the survival and on intestinal adhesions in rats with experimental peritonitis. **Methods:** Peritonitis was induced in 24 Wistar rats, that were randomized into four groups of six as follows: (1) Control group (n=6), no treatment; (2) Antibiotic group (n=6), treatment with a single intramuscular dose of antibiotic Unasyn; (3) Saline group (n=6), the abdominal cavity was washed with 0.9% saline; and (4) *E.tirucalli* group (n=6), the abdominal cavity was washed with *E. tirucalli* at a concentration of 12 mg/ml. The animals that died were necropsied, and the time of death was recorded. The survivors were killed on postoperative day 11, and necropsy was subsequently performed for evaluation of the intestinal adhesions. **Results:** Significant differences were observed in the control and antibiotic groups (p<0.01) with respect to the survival hours when compared with the saline and *E. tirucalli* groups. There was no significant difference (p>0.05) in the survival of animals in the saline and *E. tirucalli* groups; however, one animal died in the saline group. Necropsy of the animals in the saline and *E. tirucalli* groups showed strong adhesions resistant to manipulation, between the intestinal loops and abdominal wall. The remaining groups did not show any adhesions. **Conclusions:** Topical treatment with *E. tirucalli* latex stimulated an increased formation of intestinal adhesions and prevented the death of all animals with peritonitis.

RESUMO – Racional: O uso de plantas da família Euphorbiaceae, principalmente a *Euphorbia tirucalli* (avelós), tem sido popularmente difundido para o tratamento de uma variedade de doenças de natureza infecciosa, tumoral e inflamatória. **Objetivo:** Avaliar o efeito do tratamento tóxico com a solução aquosa do látex do avelós na sobrevida e nas aderências intestinais de ratos com peritonite experimental. **Métodos:** Foi induzido peritonite em 24 ratos Wistar e randomizados em quatro grupos de seis, assim distribuídos: 1) Controle - (n=6), nenhum tratamento; 2) Antibiótico - (n=6), tratamento com dose única intramuscular de antibiótico Unasyn (Pfizer - São Paulo); 3) Salina - (n=6), lavagem da cavidade abdominal com solução fisiológica 0,9%; 4) *E.Tirucalli* - (n=6), lavagem da cavidade abdominal com *E. tirucalli* na concentração de 12 mg/ml. Os animais que morreram foram submetidos à necropsia e o horário do óbito anotado. Os sobreviventes foram submetidos à eutanásia no 11º dia de pós-operatório e, posteriormente, realizou-se a necropsia para avaliação da formação de aderências. **Resultados:** Os grupos controle e antibiótico obtiveram diferença significativa (p<0,01) com relação às horas de vida entre os grupos salina e *E. tirucalli*. Não houve diferença significativa (p>0,05) na sobrevida dos animais dos grupos salina e *E. tirucalli*, no entanto, houve um óbito no grupo salina. A necropsia dos animais dos grupos salina e *E. tirucalli* mostrou aderências firmes e resistentes à manipulação entre alças intestinais e parede abdominal. Os demais grupos não tiveram formação de aderências. **Conclusão:** O tratamento tóxico com o látex da *E. tirucalli* estimulou maior formação de aderências intestinais e evitou o óbito de todos os animais com peritonite até o período avaliado.

INTRODUCTION

Peritonitis is a serious disease, due to the inflammatory response in the serous membrane lining the abdominal cavity and viscera. The immediate answers to peritonitis are hyperthermia, bowel distension, hyperemia, accumulation of gases and liquids, hypovolemia and pain. At the same time, there are cardiac, respiratory, renal and metabolic responses. It is also high contribution of fibroblasts that produce fibrin, responsible for the formation of intra-abdominal adhesions^{17,20,21,28}.

Although often the treatment of peritonitis include mechanical removal of contaminants through peritoneal washings with saline, antibiotics and abdominal integrity restoration associated with modern intensive and surgical care units, currently peritonitis still accounts for approximately 50% of deaths consequent

EFICIÊNCIA DO MÉTODO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM DROGAS DE ABUSO*

MURILO DE MESQUITA CUNHA, CAROLINE REGO RODRIGUES, VINICIUS SOUSA FERREIRA, ANDRYNE REGO RODRIGUES, SUSY RICARDO LEMES, DWIGHT ASSIS CHAVES, MAURO MEIRA DE MESQUITA, LILHIAN ALVES DE ARAUJO, NELSON JORGE DA SILVA JÚNIOR, PAULO ROBERTO DE MELO-REIS

Resumo: com objetivo demonstrar o papel da Espectrometria de Massas como ferramenta à identificação de várias drogas e destacar seus principais efeitos no organismo humano, realizamos uma revisão, por meio de bases de dados online, periódicos científicos e livros, analisando publicações dos últimos 10 anos. Foi alvo deste estudo drogas como cocaína, ecstasy, LSD, maconha e crack. A Espectrometria de Massas é uma técnica fundamental para os testes preliminares de triagem de drogas e essencial para a caracterização destas moléculas.

Palavras-chave: Espectrometria de massa. Drogas de abuso. Química Forense.

A química forense é o ramo das ciências forenses voltado para a produção de provas materiais a fim de convencer o juiz do processo, através da análise de substâncias de diversas áreas tais como drogas lícitas e ilícitas, venenos, resíduos de incêndio, poluentes, explosivos, resíduos de disparo de armas de fogo, combustíveis, etc. Embora a química forense seja um tema muito importante e que desperte cada vez mais interesse perante a sociedade científica, a sua aplicação para a resolução de conflitos judiciais ainda constitui uma nova linha de pesquisa no Brasil (ROMÃO *et al.*, 2011).

Em química forense, análises de drogas de abuso ganham cada vez mais espaço no meio científico e pericial. Grande parte das drogas de abuso causam efeitos no sistema nervoso central (SNC), alteram o estado de consciência e acarretam modificações emocionais, perturbações de humor, pensamento e comportamento, que resultam em um possível aumento da criminalidade na sociedade. Em vista disso, têm-se a necessidade de estudar técnicas analíticas, que identifiquem e detectem drogas de abuso e que, de maneira confiável,

ESTUDO DE CASO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DO AÇAFRÃO (*CURCUMA LONGA*)*

RAFAEL GONÇALVES MACHADO DE ARAÚJO, DWIGHT ASSIS, SUSY RICARDO LEMES, PAULO ROBERTO DE MELO-REIS, LILHIAN ALVES DE ARAÚJO, EDUARDO SILVA DE PAIVA, CLÁUDIO BRAZ DA SILVA

Resumo: com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial da Curcuma longa (açafrão) extraído a partir de 150 g do pó dos rizomas foi utilizado o método de hidrodestilação por arraste a vapor com duração de 120 minutos. Avaliamos a atividade antimicrobiana para bactérias gram negativa Escherichia coli e gram positiva Staphylococcus simulans. Verificamos que não houve formação do halo de inibição em nenhuma das culturas testadas.

Palavras-chave: Fitoterapia. Curcuma longa. Atividade antimicrobiana.

A *Curcuma longa*, também conhecida como açafrão, é originária da Ásia E pertencente à família botânica Zingiberaceae. Os rizomas do açafrão são muito utilizados na culinária como tempero industrialmente como corante natural alimentício e têxtil (LORENZI; MATOS, 2002; CECÍLIO-FILHO *et al.*, 2000).

Na medicina, o açafrão é utilizado por suas características anti-hepatotóxica, anti-inflamatória e anti-hiperlipêmica (LORENZI; MATOS, 2002). Estudos realizados por Kuttan *et al.*, (1985) evidenciaram que o extrato etanólico de *Curcuma longa* e a curcumina, um pigmento presente nos rizomas, são altamente citotóxicos à células de mamíferos. Além disso, foi observado um potencial anticâncer pelo fato das substâncias terem reduzido tumores em ratos. Outras propriedades do açafrão estão relacionadas ao forte potencial antioxidante, em função da curcumina (CECÍLIO-FILHO *et al.*, 2000).

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO DA FAVA DE
PTERODON EMARGINATUS (SUCUPIRA)LAZIENY AVELINA DE ASSUNÇÃO¹; DWIGHT ASSIS CHAVES; SUSY RICARDO LEMES¹; LILHIAN ALVES DE ARAÚJO^{1*}; PAULO ROBERTO DE MELO-REIS¹; MAURO MEIRA DE MESQUITA¹1 – MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE (MCAS), LABORATÓRIO DE ESTUDOS EXPERIMENTAIS E BIOTECNOLÓGICOS, ÁREA V, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
*lilhianalves@gmail.com

Resumo - A espécie vegetal *Pterodon emarginatus*, Fabaceae, conhecida popularmente como sucupira é amplamente utilizada na medicina tradicional. Diversos estudos com o óleo, extratos das sementes e de frutos apresentaram atividades analgésica, antimicrobiana e anti-inflamatória. Considerando a importância da *P. emarginatus* como fitoterápico, o presente estudo analisou a atividade antibacteriana do óleo essencial de suas sementes. O óleo foi adquirido comercialmente e testado em cepas de bactérias Gram positivas, *Staphylococcus simulans*, e Gram negativas, *Escherichia coli*, na concentração de 1mg/µL. Os resultados indicaram que não houve formação de halo de inibição nos discos contendo óleo da sucupira, tanto na placa contendo bactérias Gram negativas quanto na que continha Gram positivas, na concentração testada. Ressalta-se que, fatores como a composição e a interação dos constituintes químicos do óleo essencial da sucupira possam influenciar no efeito antimicrobiano.

Palavras-chave: Fitoterápico. *Pterodon Emarginatus*. Atividade Antimicrobiana.

I INTRODUÇÃO

A família Leguminosae, também denominada Fabaceae, apresenta cerca de 650 gêneros e 18000 espécies (JUDD *et al.*, 1999, SOUZA & LORENZI, 2005). Aproximadamente 200 gêneros e 1500 espécies estão presentes no Brasil e o bioma Cerrado possui a família mais representativa em riqueza de espécies, sendo 777 categorias, distribuídas em 101 gêneros (MENDONÇA *et al.*, 1998).

Um dos gêneros mais diversificados e estudados nesta família é o *Pterodon*, o qual é formado por cinco espécies endêmicas do Brasil: *Pterodon abruptus* Benth., *P. appariciori* Pedersoli, *P. emarginatus* Vogel, *P. polygalaeflorus* Benth. e *P. pubescens* Benth (ALMEIDA *et al.*, 1998).

O gênero *Pterodon* é largamente usado na medicina alternativa em função de suas ações antireumáticas (COELHO *et al.*, 2004), analgésicas (COELHO *et al.*, 2005), antimicrobiana (SANTOS *et al.*, 2010), anticercária (MAHAJAN & MONTEIRO, 1973) e anti-inflamatória (MORS *et al.*, 1967). Estas atividades são atribuídas, principalmente, a presença de compostos alcalóides, isoflavonas e terpenos (MARQUES *et al.*, 1998; ARRIAGA *et al.*, 2000).

Um dos gêneros mais diversificados e estudados nesta família é o *Pterodon*, o qual é formado por cinco espécies endêmicas do Brasil: *Pterodon abruptus* Benth., *P. appariciori* Pedersoli, *P. emarginatus* Vogel, *P. polygalaeflorus* Benth. e *P. pubescens* Benth (ALMEIDA *et al.*, 1998).

A espécie *Pterodon emarginatus* Vogel conhecida popularmente como "sucupira", "sucupira-branca" ou "faveira" tem sido amplamente utilizadas para fins medicinais. No uso popular, os extratos alcoólicos feitos obtidos através das sementes desta espécie possuem efeitos anti-reumático, anti-inflamatório e depurativo. Os frutos são usados no tratamento de dores musculares, artrite e artrose, possuindo também ação analgésica (MORS *et al.*, 1967). As túberas radiculares são aplicadas no tratamento do diabetes e a casca no combate ao reumatismo (LORENZI & MATOS, 2002).

Outros estudos evidenciam que o extrato hexânico obtido dos frutos de *P. emarginatus* possui atividade anti-inflamatória e analgésica devido a presença de compostos terpênicos (CARVALHO, 1998; GALCERAN, 2011). Além disso, este extrato apresenta ação protetora diante de stress oxidativo e nitrosativo gerado por exercícios agudos em camundongos (PAULA *et al.*, 2005). Outras pesquisas indicam que a presença de frações hexânica e butanólica do óleo essencial das sementes e das folhas da sucupira apresentam atividade antibacteriana e leishmanicida (DUTRA *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2010).

Devido à utilização do óleo essencial da sucupira pela população e a presença de atividades farmacológicas e biológicas descritas na literatura, este estudo objetivo-se em analisar a atividade antimicrobiana do óleo essencial das sementes de *P. emarginatus*.

Estudos têm demonstrado que o extrato etanólico bruto do pó da casca do caule possui também efeito bactericida e fungicida, além de atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (BUSTAMANTE *et al.*, 2010; MORAES *et al.*, 2012).

POTENCIAL DE CICATRIZAÇÃO DO LÁTEX DE *SYNADENIUM UMBELLATUM* EM FERIDAS DORSAIS DE RATOS*

PAULO ROBERTO DE MELO-REIS, LILHIAN ALVES
DE ARAÚJO, SUSY RICARDO LEMES, FÁTIMA MRUE,
GABRIELA BEZERRA DE FREITAS, CLÁUDIO BRAZ DA
SILVA, NELSON JORGE DA SILVA JR., LEE CHEN CHEN

*Resumo: para avaliar o potencial de cicatrização do látex da *Synadenium umbellatum* em lesões dorsais limpas, realizamos a excisão de pele e tecido subcutâneo em 15 ratos Wistar, divididos em 3 grupos: I - Controle positivo, Biomembrana Biocure®; II - Solução aquosa de *S. umbellatum* e III - Controle negativo (água destilada). Avaliamos a cicatrização em 7, 14 e 21 dias. Comparamos as médias das áreas lesadas utilizando ANOVA e Teste de Tukey. As diferenças observadas no 14º e 21º foram significativas entre os Grupos I e III e entre os Grupos II e III, indicando a eficiência da solução no processo de cicatrização.*

*Palavras-chave: Cicatrização. Fitoterápicos. *Synademinum umbellatum*.*

A cicatrização de feridas é um complexo e organizado processo que se desenvolve através de uma sequência de eventos celulares e moleculares. Cada fase da cicatrização envolve substâncias biologicamente ativas, substâncias celulares e intercelulares como as citocinas e fatores de crescimento, as quais têm atividades sinalizadoras, supressoras e estimuladoras no processo (ARNOLD; WEST, 1991).

A lesão do subendotélio vascular expõe o colágeno que libera ativadores de plaquetas (Fator Von Willebrand), resultando na agregação e formação do tampão plaquetário. Em contato com o colágeno a trombina e fibronectina promovem a degranulação das plaquetas, liberando o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de transformação de crescimento alfa e beta (TGF α , TGF β), fator de crescimento epidérmico (EGF), fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs). Além disso, as plaquetas ativam a via intrínseca das proteínas responsáveis pela formação do coágulo (HESS, 2002; ARNOLD, WEST, 1991).