

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**

MAXLEY MARTINS ALVES

**INFLUÊNCIA DO SORO LÁTEX NATURAL DA SERINGUEIRA *Hevea*
Brasiliensis SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR
SEPSE
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

**Goiânia
2014**



MAXLEY MARTINS ALVES

**INFLUÊNCIA DO SORO LÁTEX NATURAL DA SERINGUEIRA *Hevea*
Brasiliensis SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR
SEPSE
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - graduação Stricto-sensu, Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde pela PUC- Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis e Profa. Dra. Fátima Mrúe.

**Goiânia
2014**

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)
(Sistema de Bibliotecas PUC Goiás)

Alves, Maxley Martins.
A474i Influência do soro látex natural da seringueira Hevea
Brasiliensis sobre a resposta inflamatória aguda induzida por
sepsis [manuscrito] : estudo experimental em ratos / Maxley
Martins Alves. – Goiânia, 2014.
73 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de
Goiás, Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, 2014.
“Orientadores: Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis e Profa.
Dra. Fátima Mrúe”.
Bibliografia.

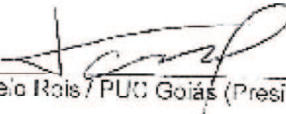
1. Septicemia. 2. Látex. 3. Seringueira. I. Título.

CDU 616-085(043)



DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE
DEFENDIDA EM 03 DE SETEMBRO DE 2014 E CONSIDERADO
APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA:


1)


Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis / PUC Goiás (Presidente)

2)


Profa. Dra. Fátima Mrué / PUC Goiás (Membro)

3)


Profa. Dra. Cacilda Pedrosa de Oliveira / UFG (Membro Externo)

4)

Prof. Dr. Nelson Jorge da Silva Jr. / PUC Goiás (Suplente)

DEDICATÓRIA

*A minha esposa Luciana e minha amada
filha Maria Eduarda por toda a
compreensão durante esta trajetória, ao
nosso novo Bebê, ainda no ventre materno.
Aos meus pais Custódio e Luslemar, por me
conduzirem até este momento.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS** por permitir este momento;

A Professora **Dra. Fátima Mrúe** pela paixão, sabedoria, orientação, paciência e estímulo a pesquisa;

Ao Professor **Dr. Paulo Roberto de Melo Reis** pela orientação e motivação em estudar a *Hevea brasiliensis*;

A doutoranda **Lilhian Alves de Araújo** pelo grande apoio e contribuições nos experimentos, nas dosagens de interleucinas e durante o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Biomédico **Roberpaulo Anacleto** pelo grande apoio;

Ao **Dr Milton Adriano Pelli de Oliveira**, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da Universidade Federal de Goiás, pelo empenho na orientação e dosagem de interleucinas;

A toda equipe envolvida neste projeto, aos técnicos dos laboratórios, aos amigos e professores do curso de Mestrado, Dra. **Edilaine Murari da Silva** (Laboratório de Análises Clínicas e Saúde) , Dra **Mirian de Almeida Franco Campos** (Seção de Ensino e Pesquisa-LACEN/GO), Dra **Robmary Matias de Almeida** (Microbiologista LACEN). Agradeço ao Dr **Marcelo Seixo de Brito e Silva** (Veterinário e Pesquisador) pela disposição no ensino dos experimentos animais.

Aos membros da banca de avaliação Qualificação e Defesa, **Dr Paulo Roberto de Melo Reis, Dra Fátima Mrué, Dra Cacilda Pedrosa de Oliveira e**

Dr Leonardo Emílio da Silva pelas críticas e sugestões que enriqueceram principalmente minha alma e conhecimento.

RESUMO

A resposta inflamatória aguda é uma manifestação do organismo desencadeada por um insulto. Fatores que predisõem são, por exemplo: bactérias, vírus, dentre outros micro-organismos ou traumas. É um mecanismo interno de sobrevivência. A resposta inflamatória leva ao desenvolvimento de uma cascata de eventos imunológicos na tentativa de destruir o agente agressor, com alterações cardiológicas, hemodinâmicas, respiratórias, renais, endocrinometabólicas, gastrointestinais e hematológicas determinando um quadro clínico sindrômico. As alterações vasculares e imunológicas desencadeiam uma resposta de “contra-balanço” inflamatória. Pesquisas recentes utilizando uma fração específica derivada do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*, denominada *Hev b 13*, tem mostrado capacidade de induzir síntese de interleucina 10 (IL-10) *in vitro*, estimulando a resposta anti-inflamatória, podendo resultar em homeostase. Estas evidências são avaliadas no modelo experimental adotado com indução de sepse grave, após procedimento cirúrgico com lesões gástrica, intestinal e pancreática, além de infusão de cepas de *Acinetobacter baumannii* com perfil de resistência a múltiplos antibióticos testados. Foi infundido solução *Hev b 13* via subcutânea na dosagem 0,5 mg/Kg. Observou-se semelhança na sobrevivência dos animais que foram tratados com esta solução e os animais do grupo controle, tratados com 1 ml de SF0,9% ($p = 0,8106$). A contagem de leucócitos totais ($p = 0,0207$) e linfócitos totais ($p = 0,0032$) apresentou diferenças estatisticamente significativas. Nas demais células as contagens não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$). A solução de *Hev b 13* pode induzir a redução da amplificação da cascata celular imunológica, reduzindo a produção de

leucócitos e linfócitos totais, modulando a resposta imunológica. O experimento realizado induziu síntese de interleucina 10 (IL-10) e Fator de necrose tumoral (TNF). Os ratos que receberam *Hev b 13*, apresentaram no tecido pulmonar menor envolvimento de células inflamatórias.

Palavras- chave: Sepses. Látex. *Hevea brasiliensis*. Síndrome da resposta inflamatória aguda. Interleucinas.

ABSTRACT

The acute inflammatory answer is a manifestation of the organism triggered by an infectious or non-infectious taunting. Predisposal factors are, for instance: bacteria, viruses, amongst other microorganisms or traumas. It is an internal survival mechanism. The development of a cascade of immunological events in an attempt of destroying an aggressive agent, with cardiologic, hemodynamic, respiratory, renal, endocrine, metabolic, gastrointestinal and hematological alterations occurs determining a syndrome clinic case. Vascular and immunological alterations trigger a counter balance inflammatory response. Recent researches using a specific derived fraction of the natural gum of *Hevea brasiliensis* rubber tree, called *Hev b 13*, has shown induction capability to synthesize interleukin 10 (IL-10) *in vitro*, stimulating the anti-inflammatory response that may result in homeostasis. These evidences are assessed with high mortality sepsis induction, after surgical procedure with gastric, intestinal and pancreatic damaging and strain infusion of *Acinetobacter baumannii* of resistance profile to multiple antibiotics tested. In dose 0,5 mg/kg of *Hev b 13* solution, subcutaneous, similarities were observed in the survival of animals treated with this solution and the control group, treated with 1 ml of SF0, 9% ($p=0,8106$). The laboratorial analysis, on the other hand, showed total leukocytes reckoning ($p = 0,0207$) and total lymphocyte ($p= 0,0032$) with statistically significant differences. In further counting there was no significant difference ($p>0,05$). The *Hev b 13* solution may lead to the induction of reducing the amplification of immunological cellular cascade, reducing the production of total leukocytes and lymphocytes, with effect over the immunological response, anti-

inflammatory effect. The experiment induced synthesis of interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor (TNF). Rats receiving *Hev b 13*, lung tissue showed lesser involvement of inflammatory cells.

Keywords: Sepsis. Latex. *Hevea brasiliensis*. Acute inflammatory response syndrome. Interleukins.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Sepsis - Definições e diagnóstico -----	14
Tabela 02 - Sinais e sintomas da sepsis com disfunções orgânicas -----	15
Tabela 03 - Critérios para sepsis em ratos baseado em sinais clínicos (adaptado de WICHTERMAN <i>et. al.</i> , 1980) -----	26
Tabela 04 – Antibiograma das cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> utilizados neste estudo -----	31
Tabela 05 – Grupo sobrevivida, ratos tratados com <i>Hev b 13</i> -----	42
Tabela 06 – Grupo sobrevivida, ratos tratados com SF0,9% -----	42
Tabela 07 - Sobrevivida, em horas, entre os grupos controle e tratado com a solução <i>Hev b 13</i> -----	43
Tabela 08 - Estatística descritiva das análises laboratoriais, entre os grupos controle e grupo tratado com a solução <i>Hev b 13</i> . -----	46
Tabela 09 – Valores de IL-10 em pg/mg de tecido entre os grupos referência, cirúrgico, controle e tratado com a solução <i>Hev b 13</i> -----	48
Tabela 10 – Valores de TNF em pg/mg de tecido entre os grupos referência, cirúrgico, controle e tratado com a solução <i>Hev b 13</i> -----	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Estrutura tridimensional da IL10 e do IL10R -----	20
Figura 02 - Placa de <i>Acinetobacter baumannii</i> utilizada no experimento. Cultivadas no Laboratório de Análises Clínicas e Saúde (LAS) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, provenientes do Laboratório de Análises Clínicas do Estado de Goiás (LACEN).-----	30
Figura 03 – Incisão e dissecação da parede abdominal.-----	33
Figura 04 – Visão da secção gástrica e da primeira porção do intestino delgado.-----	33
Figura 05 – Visão da manipulação no pâncreas espraído.-----	34
Figura 06 – Injeção de cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> na cavidade abdominal.-----	34
Figura 07 - Sobrevida, em horas, dos grupos tratado com a solução <i>Hev b 13</i> e do grupo controle (soro fisiológico) -----	44
Figura 08 - Correlação de Pearson entre a sobrevida (horas) e o peso (gramas) dos animais tratados com a solução <i>Hev b 13</i> -----	45
Figura 09 - Correlação de Pearson entre a sobrevida (horas) e o peso (gramas) dos animais do grupo controle -----	45
Figura 10 - Distensão gástrica comum aos ratos que receberam cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> -----	47
Figura 11 - Presença cromodocriorréia-----	48
Figura 12 –Lâmina de pulmão apresentando agregados linfóides, septo espessado, tratado com <i>Hev b 13</i> . -----	54
Figura 13 – Lâmina de pulmão apresentando agregados linfóides, septo intensamente espessado, tratado com SF09%. -----	54

Figura 14 – Gráfico comparativo de IL-10 nos diferentes grupos. ----- 55

Figura 15 – Gráfico comparativo de TNF nos diferentes grupos. ----- 56

LISTA DE ABREVIÇÕES

Anti-TNF- α – Anti Fator de Necrose Tumoral alfa

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

BLN – Biomembrana do Látex Natural

bpm – batimentos por minuto

C5 – Complemento 5

CD54 - Cluster of Differentiation 54

CD80 - Cluster of Differentiation 80

CD86 - Cluster of Differentiation 86

DL-50 – Dose Letal

EDTA – Ácido Etilenodiamono Tetra-acético

ELAM – moléculas de adesão leucócito-endotélio

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

e-PTFE – polytetrafluoroethylene

FDA - Food and Drug Administration

FiO₂ – Fração Inspirada de Oxigênio

FMRP-USP – Faculdade de Medicina Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

FW – Complexos de Frey- Wyssling

GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Monócitos

HLA-DR – Antígeno Leucocitário Humano

IL-1- Interleucina- 1

IL-2- Interleucina- 2

IL-3- Interleucina- 3

IL-4- Interleucina- 4

IL-5- Interleucina- 5

IL-6- Interleucina- 6

IL-8- Interleucina- 8

IL-10- Interleucina- 10

IL-12- Interleucina- 12

IL-18- Interleucina- 18

IL-1 β – Interleucina-1 Beta

ILAS- Instituto Latino Americano de Sepse

ILAM – moléculas de adesão intracelular

iNOS – Inducible nitric oxide synthase

INR – International Normalized Ratio

irpm – incursões respiratórias por minuto

Linfócitos Th – Linfócitos T helper

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

MR – multirresistente

mmHg – milímetros de mercúrio

nm - nanometros

PAF – Fator Ativador de Plaquetas

PaO₂ – Pressão arterial de oxigênio

PAM – Pressão Arterial Média

PAS – Pressão arterial sistólica

PBE – Peritonite Bacteriana Espontânea

PGE₂ - Prostaglandina - E₂

PIRO – Predisposition, Infection, Response and Organ Failure

PBS – Tampão fosfato-salino, do inglês “Phosphate buffered saline”

PNPMF – Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas

SDMO – Síndrome da Disfunção dos Múltiplos Órgãos

SF0,9% – Soro Fisiológico a 0,9%

SIRS: Síndrome da resposta inflamatória aguda

TFA - Fator de Atividade Tissular

TGF- β 1 – transforming growth factor beta

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

VEGF – Vascular endothelial growth factor

UFC/mm³ – Unidades Formadoras de Colônias por milímetro cúbico

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. O estudo de plantas medicinais.....	4
2.2. A família <i>Euphorbiaceae</i>	5
2.3. O gênero <i>Hevea</i>	6
2.4. A espécie <i>Hevea brasiliensis</i>	6
2.4.1. Constituintes químicos do látex da <i>H. Brasiliensis</i>	8
2.4.2. Atividades biológicas da <i>Hevea brasiliensis</i> descritas na literatura	9
2.5. Sepsis	13
2.6. Alterações imunológicas associadas a sepsis	18
2.6.1. Citocina Inflamatória Interleucina-10 (IL-10)	20
2.6.2. Fator de Necrose Tumoral (TNF)	22
2.7. Peritonite	23
2.8. <i>Acinetobacter baumannii</i>	26
3. OBJETIVO	28
3.1. Objetivos específicos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Animais para experimentação	29
4.2. Obtenção da solução contendo cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> multiresistente	29
4.3. Obtenção da fração <i>Hev b 13</i> do soro do látex da <i>Hevea brasiliensis</i>	31
4.4. Aspectos éticos	32
4.5. Estudo piloto	32
4.6.1. Procedimento experimental mortalidade	35
4.6.2. Coleta de material para análise histológica	37

4.6.2.1. Confeção de lâminas	37
4.6.3. Coleta de sangue para análise hematológica	38
4.6.4. Contagem de leucócitos	38
4.6.5. Coleta de material para análise de interleucinas	38
4.6.6. Preparo das amostras para Elisa	39
4.6.7. Elisa TNF e IL-10	39
4.6.8. Avaliação histológica	40
4.6.9. Análise estatística.....	41
5. RESULTADOS	42
5.1.1. Avaliação sobrevida	42
5.1.2. Análise variância sobrevida	43
5.2. Análise hematológica	46
5.3. Avaliação macroscópica	47
5.4. Avaliação IL-10	48
5.5. Avaliação TNF	49
6. DISCUSSÃO	50
6.1. Experimento sobrevida	50
6.2. Análise laboratorial	51
6.3. Análise histológica	53
6.4. Análise de IL-10	55
6.5. Análise de TNF	56
7. CONCLUSÃO	58
CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

A resposta inflamatória aguda é uma manifestação do organismo desencadeada por um insulto. Fatores que predispõe são, por exemplo, bactérias, vírus, dentre outros microorganismos ou traumas. É um mecanismo interno de sobrevivência, conhecido como SIRS, síndrome da resposta inflamatória aguda (HARDIN, 1999). O desenvolvimento de uma cascata de eventos imunológicos na tentativa de responder frente agente agressor, como alterações cardiológicas, hemodinâmicas, respiratórias, renais, endocrinometabólicas, gastrointestinais e hematológicas ocorrem determinando um quadro clínico sindrômico (DELLINGER, 2008). Em casos graves, de alta infectividade ou traumas de grande impacto, ocorre desarranjo desta resposta de proteção orgânica, levando ao desequilíbrio dos demais órgãos e sistemas do corpo humano. Dessa forma a homeostase é perdida e instala-se o quadro. Uma cascata de eventos ocorre no organismo, com liberação de citocinas, interleucinas, sinalizadores humorais (VICENT, 2007). Objetivando-se a homeostase através do balanço entre a resposta de fase aguda, mas o descontrole dessas ações origina as disfunções orgânicas.

Alterações vasculares e imunológicas desencadeiam uma resposta de “contra-balanço” inflamatória, ou seja, um real efeito anti-inflamatório (ADAMS, C.A., 2011). Dentre as substâncias liberadas na circulação sanguínea destaca-se uma citocina imunorregulatória amplamente estudada denominada Interleucina-10 (IL-10) (OPAL, STEVEN M, 2009, DE BOTTOLI TEIXEIRA L, et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2012)

Devido esse quadro de descontrole do balanço acentuado, com ativação excessiva e talvez inapropriada do sistema imunológico, associado a debilidade

nutricional, uso de cateteres invasivos (sondas, drenos, acessos venosos e respiratórios), a utilização de amplos espectros de antibioticoterapia, principalmente por tempos prolongados, ocorre o inevitável comprometimento da função imunológica e susceptibilidade a colonização bacteriana (LOWRY, 2009).

Diversos protocolos de tratamento têm sido propostos no intuito de reduzir a morbimortalidade induzida pela resposta inflamatória e pela sepse. Sendo que esta última é uma síndrome inflamatória desencadeada por agente infeccioso (ASSUNÇÃO, 2010). Desde o diagnóstico e introdução precoce de terapêutica, com coleta de exames, estabilização precoce, adequada terapia antimicrobiana nas primeiras horas e tratamento do foco infeccioso (DELLINGER, et al., 2008).

A mortalidade e morbidade apresentada por quadro de infecção abdominal, por exemplo, são ainda muito elevados, principalmente quando relacionados a presença de germes multirresistentes (MARTIN, 2003). Esses são aqueles que induziram resistência as terapêuticas medicamentosas existentes na atualidade por diversos mecanismos. Ressalta-se, principalmente aqueles internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e em pacientes debilitados (BERGOGNE-BEREZIN; TOWNER, 1996). No Brasil, como em outros países, a modernização da terapia antimicrobiana e seu emprego em larga escala, tem selecionado floras bacterianas de forma endêmica, destacando-se a presença do *Acinetobacter baumannii* multirresistente, de alta morbidade e mortalidade (KULAH et al., 2009).

Apesar de todas as terapêuticas conhecidas, o prognóstico de sobrevida decorrente da infecção e do desajuste inflamatório causado por esse germe é

reservado. O desenvolvimento de substâncias que possam equilibrar esta resposta imunoinflamatória ainda não tem alcançado resultados satisfatórios. O uso de proteína C reativa (LILLY, 2000) foi abandonada devido a permanência de altos índices de desfechos desfavoráveis ao longo prazo nos subgrupos estudados com redução da mortalidade em apenas 6% (RANIERI et al., 2012). Assim não se dispõem de nenhuma outra medicação com efetividade de interagir e alcançar o contrabalanço da resposta inflamatória aguda até o momento (KAK, VIVEK, 2011).

Pesquisas recentes utilizando uma fração específica derivada do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*, denominada *Hev b 13*, tem mostrado capacidade de indução celular para síntese de interleucina 10 (IL-10) *in vitro*, estimulando uma resposta anti-inflamatória, podendo resultar em homeostase (TEIXEIRA et al., 2012). Em outros experimentos utilizando modelos animais de retocolite ulcerativa, bem como de artrite reumatoide, o tratamento dos animais com a fração *Hev b 13* demonstrou importante regressão das lesões em estudo (DE BOTTOLI TEIXEIRA L, et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2012). Estas evidências sugerem que esta fração do látex da *Hevea brasiliensis* possa desempenhar uma possível ação anti-inflamatória ou moduladora da resposta inflamatória frente a doenças ou condições de intensa atividade inflamatória, configurando-se potencialmente como uma nova opção terapêutica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O estudo de plantas medicinais

O Brasil é detentor de uma enorme biodiversidade, maior que 120 mil espécies de plantas, estimada por pesquisadores. Isso garante um enorme potencial para o desenvolvimento de medicações fitoterápicas e outros fármacos a partir dos extratos vegetais. A história revela que as populações nativas brasileiras sempre utilizaram plantas com finalidade terapêutica, conhecimento herdado e transmitido, que vão sendo reinterpretados e adaptados ao tempo por gerações, somados a elementos de diferentes influências da colonização (CAMARGO, 1985).

O conhecimento tradicional sobre as propriedades medicinais das plantas contribui para a descoberta de novos fármacos e auxilia nas tradições populacionais (SCHMIDT et al., 2008). Segundo a OMS, cerca de 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais (FARNSWORTH, 1985). Dos medicamentos utilizados em terapêuticas, 25% tem sua origem vegetal (PHILLIPSON et al., 2007) e cerca de 60% dos fármacos com atividade antitumorais e antimicrobianas, já comercializados ou em fase de pesquisa clínica, tem bases de extração na natureza (SHU, 1998).

O país possui um plano desenvolvido pelo Ministério da Saúde de Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), graças a abundância de espécies medicinais, que visa propor formas alternativas à terapêutica e incentivar o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a participação social na saúde (BRASIL, 2006).

Uma das diretrizes mais importantes da PNPMF é incentivar grupos de pesquisa com atuação voltada para a farmacologia de plantas medicinais,

tornando possível a validação do uso terapêutico de plantas bem como indicar parâmetros que indiquem a sistematização do seu uso (HEINRICH; GIBBONS, 2001).

2.2. A família *Euphorbiaceae*

A família *Euphorbiaceae* abrange plantas com cerca de 300 gêneros e 6000 espécies, distribuídas predominantemente em regiões tropicais. No Brasil, estima-se 70 gêneros e 1000 espécies, tornando-a uma família facilmente encontrada na formação da flora brasileira e uma das mais complexas, do ponto de vista taxonômico. Entre suas principais características botânicas, destaca-se a presença de substâncias laticíferas, visíveis quando a planta é submetida às injúrias mecânicas (SOUZA; LORENZI, 2008).

A família *Euphorbiaceae* destaca-se economicamente, especialmente na produção de alimentos, látex e óleos, e ainda na medicina popular. A mandioca, *Manihot esculenta* é utilizada no nordeste brasileiro como fonte de amido, e a sua farinha é consumida em todo o país (CORRÊA et al., 2002). A seringueira, *Hevea brasiliensis* é utilizada para a manufatura de borracha natural a partir do látex extraído, sendo extensamente cultivada em alguns trechos da floresta amazônica (RIBEIRO, 2004). Nativa da África, e conhecida como mamona, a *Ricinus communis* é fonte do óleo de rícino usado medicinalmente, também como lubrificante utilizados em propulsores de ônibus espaciais e foguetes (BELTRÃO, 2003).

2.3. O gênero *Hevea*

Da família das *Euphorbiaceae*, o gênero *Hevea* tem como área de ocorrência na região amazônica (Amazônia brasileira, Bolívia, Colômbia, Peru, Venezuela, Equador, Suriname e Guiana) latitudes 7° Norte a 15° Sul. A *Hevea brasiliensis* entre as 11 espécies do gênero *Hevea* é a espécie mais cultivada comercialmente e a mais produtiva (MARTO, 2007). Áreas de plantios comerciais de *H. brasiliensis* compreende de 24° Norte (China) até 25° Sul (São Paulo, Brasil).

Em 1876, o inglês Henry Alexander Wickham, a serviço do *Royal Botanical Garden* em Londres, coletou e enviou para a Inglaterra 70 mil sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis*), coletadas da região de Boim, no Vale do Tapajós. As sementes produziram próximo de 2.700 mudas, posteriormente enviadas e plantadas em colônias britânicas na Malásia, originando extensos seringais de cultivo de alta produtividade de borracha (SENA, 2008).

2.4. A espécie *Hevea brasiliensis*

A *Hevea brasiliensis* é uma árvore de hábito ereto que cresce melhor sob temperaturas entre 20-28°C, com uma pluviosidade de 1800-2000 mm bem distribuída durante o ano, podendo atingir 30 metros de altura total sob condições favoráveis. Com produção de sementes a partir de 4 anos e aos 6-7 anos a produção de látex, quando propagada por enxertia. Apresenta vida média estimada entre 30-35 anos, com aproveitamento de madeira para processamento mecânico e de energia (galhos), ao final do ciclo (BALSINGER et al., 2000).

A seringueira desenvolve-se bem em solos de textura leve, profundos e bem drenados, ligeiramente ácidos (pH 4,5-5,5), em altitudes até 600 metros. A seringueira é uma planta semidecídua, heliófita ou esciófita. No Brasil pode ser encontrada na floresta Amazônica. Desenvolve-se nas margens de rios e lugares inundáveis da mata de solos argilosos (LORENZI, 2000). Por isso o cultivo de seringueira ocorre em mais de 30 países, localizados nas regiões subtropicais e tropical. A área total de plantio mundial é de aproximadamente 9 milhões de hectares, sendo 90% situado na Ásia (HONG, 1995).

A expansão da área de cultivo de seringueira no Brasil procurou ocupar as chamadas áreas de escape, ou seja, áreas sem problemas com doenças foliares, em especial o mal-das-folhas, causado pelo fungo *Microcyclus ulei*. Essas áreas apresentam regime hídrico caracterizado por um período seco definido e com elevado déficit hídrico. No país, atualmente a heveicultura estende-se pela Amazônia, Mato Grosso e Bahia. Em outras regiões, a seringueira é cultivada nos Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Maranhão, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, Minas Gerais e São Paulo (IAPAR, 2006). Plantios pioneiros de seringueira em Minas Gerais vieram demonstrar o zoneamento ecológico para a cultura da seringueira efetivamente no Triângulo Mineiro, Zona da Mata, Rio Doce e Alto São Francisco (ORTOLONI, 1985; RUFINO, 1986).

A seringueira toma importância devido a qualidade da borracha natural produzida a partir do látex. Combina resistência com fricção, plasticidade, impermeabilidade a gases e líquidos, bem como isolamento elétrico. Essas características são fundamentais para a fabricação de pneus e de uma série de manufaturas relevantes na vida do homem moderno (MACEDO et al., 2002).

Devido as inúmeras aplicações da borracha natural, estima-se que seu uso em mais de 50 mil artigos, como farmacêuticos, brinquedos, revestimentos e forrações, preservativos, luvas cirúrgicas dentre outros (IAPAR, 2006; MARTINELLI, 2004). Recentemente, como biomaterial para aplicação médica (THOMAZINI et al., 1997; FRADE et al., 2001).

A cultura da seringueira também possibilita a obtenção de renda em outros produtos como o óleo de sementes, usados na indústria de tintas e vernizes, madeira e para alimentação animal (LORENZI, 2000).

2.4.1. Constituintes químicos do látex da *H. Brasiliensis*

O látex de *Hevea brasiliensis* é composto por um sistema polidisperso, no qual partículas negativamente carregadas de vários tipos estão suspensas em um soro. Predominam três tipos de partículas: de borracha (30 a 45% em massa do látex), os lutóides (10 a 20%) e os chamados complexos de Frey-Wyssling (FW). O soro no qual as partículas estão dispersas é chamado de soro C (AGOSTINI, 2009). A densidade do soro é de 1,020 g/cm³, pois eletrólitos e água são transportados na seiva e participam de reações que envolvem a biossíntese do látex (ARIYOSHI, 1997).

As partículas de borracha apresentam forte atividade devido às longas cadeias de hidrocarbonetos, principalmente na superfície. As moléculas de fosfolipídios se ligam fortemente as proteínas que permanecem adsorvidas na superfície da borracha. É possível explicar essa forte adsorção pelas cargas constituintes levando a associação iônica entre dois tipos de moléculas: fosfolipídios de carga positiva e as proteínas de carga negativa (RIPPEL, 2005).

Os lutóides e complexos de Frey-Wyssling formam o segundo e terceiro componentes principais do látex. São constituídos de proteínas solúveis e insolúveis, fosfolípidios e sais minerais ligados ou circundados por membranas, são maiores em tamanho do que as partículas de borracha (BLACKLEY, 1997). Possuem de 2.000 a 5.000 nm de diâmetro, ligados por uma membrana de cerca de 8 nm de espessura, também com carga negativa. O conteúdo dos lutóides é denominado soro B, contendo vários cátions, principalmente cálcio, magnésio, potássio, cobre, também proteínas catiônicas, que têm ação floculante muito rápida sobre as partículas de borracha no látex, resultando na formação de microflocos. Os complexos de Frey-Wyssling são constituídos de carotenóides e lipídios, conferindo a borracha sua coloração amarelada (BLACKLEY, 1997).

O principal carboidrato encontrado é o quebrachitol (ou 1-metil inositol) (BLACKLEY, 1997). O látex recém coletado apresenta pH entre de 6,0 e 7,0, densidade menor que o soro, 0,975 a 0,980 g/cm³ e viscosidade variável. Quando é necessário preservar o látex por mais tempo deve-se acrescentar a amônia (RIPPEL, 2005).

2.4.2. Atividades biológicas da *Hevea brasiliensis* descritas na literatura

No Laboratório de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP desde 1994 vêm sendo realizados estudos extenuante com o látex natural da seringueira sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto (*in memoriam*). Suas propriedades físicas, microarquitetura e biocompatibilidade foram determinadas inicialmente em modelos animais (MRUÉ et al., 2004).

Pesquisadores envolvidos com biomaterial investigam as propriedades bioquímicas do látex natural a partir do desenvolvimento da biomembrana (MRUÉ et al., 2004).

Pesquisas com isolamento de 03 ações por cromatografia e teste de Miles, demonstraram que a chamada fração F1 (cromatografia de DEAE-celulose) tem maior atividade sobre a permeabilidade vascular em coelhos (MAURÍCIO, 2006).

A reparação tecidual é estimulada a partir de proteínas do soro do látex, com propriedades angiogênicas.

Em outro estudo, objetivando a atividade angiogênica, as frações isoladas foram colocadas na membrana cório-alantóica de ovos de galinha *Gallus domesticus*, sendo que a F1 demonstrou ser mais eficaz em promover esta atividade. Posteriormente, realizou-se estudo de citotoxicidade do látex, no qual as concentrações de 0,01 mg/mL e 0,1 mg/mL da F1 permitiram que as células leucêmicas da linhagem Jurkat e em culturas de células mononucleares do sangue periférico proliferassem sem anormalidades. Finalmente, a fim de analisar se a F1 estimularia células endoteliais, foi feita cultura de células endoteliais isoladas da veia umbilical humana, como descrito por JAFFE, et al., 1973. A F1 também não estimulou diretamente as células endoteliais do cordão umbilical humano, comprovando que a ação angiogênica da BLN não se dá diretamente sob o estímulo proliferativo das células endoteliais, mas sim um efeito indireto por sua ação angiogênica na liberação de fatores de crescimento por monócitos/macrófagos estimulados (MENDONÇA et al., 2010).

A fração F1 foi incorporada em gel de carboximetilcelulose 4% (Bayer – São Paulo, SP) em 3 concentrações diferentes: 0,01%, 0,1% e 1% e aplicou-as

sobre as úlceras dérmicas em orelhas de coelhos. A conclusão final mostrou que a concentração 0,01% foi a mais eficiente para estimular a cicatrização da lesão em menor tempo. (MENDONÇA, 2004; MENDONÇA, et al., 2010)

Proposto a importância da BLN sobre a cicatrização, procurou-se seus mecanismos de ação realizando a implantação subcutânea da BLN no dorso de camundongos C57BL/6 sadios (sem doença associada), analisando qualitativamente e quantitativamente o tecido neoformado. Também, induzido trauma cirúrgico no tecido subcutâneo de camundongos e acompanhamento nos momentos pós-cirúrgicos representativos das fases inflamatória e de formação tecidual (angiogênese e fibrogênese), comparando-a com a membrana de látex desnaturado (luva cirúrgica) e implante sintético (ePTFE). Utilizando-se de diferentes metodologias como análise de imagens pelo software ImageJ de seções histológicas coradas com hematoxilina e eosina, quanto ao infiltrado inflamatório, angiogênese e fibroplasia; e tricrômio de Gomori quanto à colagênese; imunohistoquímica para iNOS, IL-1 β , TGF- β 1, VEGF; além das dosagens de IL-1 β e TGF- β 1 por ELISA e de mieloperoxidase (determinante da função neutrofílica), ambas feitas a partir do macerado tecidual da região de implante (ANDRADE, 2007; ANDRADE et al., 2011).

O estudo de Andrade et al. (2011) constatou que a BLN atua na fase inflamatória da cicatrização, com o recrutamento neutrofílico sobre o local aplicado, confirmado quantitativamente pela concentração de mieloperoxidase e IL-1 β . Este fato pareceu influenciar diretamente as fases subsequentes do processo cicatricial, confirmado pela sua capacidade estimuladora de angiogênese, provavelmente não influenciada por VEGF, e pelo estímulo à

fibroplasia independente de TGF- β 1 e sem modificação na produção colagênica (ANDRADE et al., 2011).

Pesquisas de Frade, 2003, propôs de forma eficiente e também econômica a BLN como alternativa para o tratamento de úlceras de perna. Foram observados sinais evidentes de estímulo à granulação com confirmação histopatológica do tecido com diferenciação do tecido de cicatrização, associado ao aumento da detecção e fatores de crescimento como VEGF e TGF- β 1 e redução da enzima iNOS. Sua avaliação como curativo em úlceras de pressão, hipertensivas, venosas e associadas à microangiopatia diabética demonstrou, ainda, a capacidade de manter as lesões umidecidas, não colonizadas e curativo não aderente, sendo eficaz no tanto no desbridamento quanto na angiogênese (FRADE, 2003; FRADE et al., 2005; FRADE et al., 2011; FRADE et al., 2012).

O estudo do uso da fração F1 do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* em ratos induzidos ao diabetes, com indução da cicatrização por meio do estímulo à fase inflamatória aliado às alterações causadas pelo estresse oxidativo em úlceras cutâneas, torna relevante o estudo das modificações teciduais e dos mecanismos envolvidos na cicatrização de úlceras tratadas topicamente (FRADE, 2003; FRADE et al., 2004; ANDRADE et al., 2011).

Em 2012, foi realizado experimento com fração *Hev b 13*, uma esterase obtida do látex da seringueira, que induz a células monocíticas a aumentar a produção e liberação de IL-10. A interação com macrófagos reduziu a produção de fator de necrose tumoral (TNF). Esse estudo abriu caminho para a pesquisa

de reações imunológicas mediadas por essa fração (TEIXEIRA, LB, 2012; DE BORTOLI TEIXEIRA L, et al., 2012).

No mesmo ano, outro trabalho publicado sobre colite induzida por medicação a fim de simular doença inflamatória intestinal, utilizou a fração *Hev b 13*. Os resultados mostraram evidências clínicas com redução de episódios de diarreia, prolapso retal e perda de peso, dos animais que fizeram uso da substância em relação ao grupo controle. Resultado evidenciando o potencial anti-inflamatório desta fração (TEIXEIRA et al., 2012).

2.5. Sepses

A sepsis é uma síndrome complexa induzida por agente causador de resposta inflamatória sistêmica que evoluiu de forma desarmônica no indivíduo afetado. Origem infecciosa, normalmente bacteriana, caracterizada por múltiplas manifestações, e que pode determinar disfunção ou falência de um ou mais órgãos, até mesmo a sua morte.

Nas últimas décadas ocorreram inúmeros avanços no entendimento fisiopatológico desta síndrome, através de estudos multicêntricos, que resultaram na pesquisa de alguns marcadores diagnósticos e prognósticos, também no potencial benefício de alternativas terapêuticas. O diagnóstico da sepsis e a introdução precoce de tratamento são bem definidos, mas a mudança ou interrupção do seu curso têm sido o objetivo de pesquisadores nesses últimos anos (ZENI F, 1997; HOTCHKISS RS, 2003).

No ano de 1991, definiu-se no "International Sepsis Definitions Conference", posteriormente publicadas em revista médica, as novas

definições e os critérios para o diagnóstico da sepse, que permitiram aos pesquisadores padronização para as pesquisas (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: 1992). Posteriormente, protocolo proposto pelo Dr Rivers E, (RIVERS E, 2001), impactou a curva de sobrevivência, e na Conferência Internacional de Definição da Sepse, agregou maior número de pesquisadores da saúde, que optaram por não modificar as definições vigentes e por ampliar a lista de sinais e sintomas da sepse (Tabela 01), valorizando assim a experiência clínica multiprofissional dos intensivistas (LEVY MM, 2003).

Tabela 1 - Sepse - Definições e diagnóstico

Infecção	Processo patológico causado pela invasão de tecidos estéreis por microorganismos patogênicos
Síndrome de Resposta Inflamatória sistêmica (SIRS)	Temperatura > 38°C ou < 36°C Frequência cardíaca > 90 bpm Frequência respiratória > 20 irpm Leucometria (leucócitos > 12.000 ou < 4.000), ou > 10% de formas jovens
Sepse	Síndrome clínica definida pela presença de infecção e SIRS
Sepse grave	Sepse complicada com 1 ou mais disfunções orgânicas
Choque séptico	Sepse associada a hipotensão refratária a volume adequado e uso de drogas vasoativas

O termo sepse é aplicável quando o agente agressor dispara a resposta sistêmica clinicamente relevante, podendo manifestar-se por uma variedade de sinais e sintomas, de alta complexidade crescente: 1) sepse grave, entendida como sepse associada à disfunção de órgãos, hipoperfusão e hipotensão;

2) choque séptico, a sepse associada com as alterações da hipoperfusão e hipotensão persistente mesmo após ressuscitação volêmica adequada, necessitando do uso de drogas vasoativas e 3) síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO), que pode representar o estágio final da resposta inflamatória sistêmica grave (LEVY MM, 2003). Posteriormente, foi proposto o desenvolvimento de um sistema de estadiamento para a sepse caracterizando melhor a síndrome com base nos fatores predisponentes e nas condições pré-mórbidas, na natureza da infecção subjacente, nas características da resposta do hospedeiro e na extensão da disfunção de órgãos resultante (sistema PIRO) (Levy MM, 2003).

Tabela 2 - Sinais e sintomas da sepse com disfunções orgânicas

Hipotensão	PAS < 90, PAM < 65 ou queda de 40 mmHg na PA basal
Diurese	< 0,5 ml/Kg/min ou elevação abrupta da creatinina
Insuficiência respiratória	Necessita de suplementação de oxigênio (PaO ₂ /FiO ₂ < 250)
Coagulopatia	Plaquetopenia < 100.000/mm ³ ou redução de 50% em relação ao valor registrado nos últimos 3 dias ou INR > 1,5
Acidose metabólica	Déficit de bases < 5,0 mEq/L e lactato > 1,5 vezes o valor normal
Alteração neurológica	Rebaixamento do nível de consciência, agitação ou delirium
Insuficiência hepática	Alteração de bilirrubinas, > 2,0 vezes o valor normalidade

Inúmeras terapêuticas são pesquisadas objetivando o controle da resposta inflamatória, hipoteticamente para prevenir os danos fisiopatológicos, melhorando a taxa de sobrevivência. Agentes que neutralizam a ação das citocinas inflamatórias nos respectivos receptores, tais como os anticorpos monoclonais anti-TNF- α tenderiam a reduzir a produção dos mediadores seguintes da cascata inflamatória (IL-1 e IL-6). Estudo multicêntrico,

randomizado, duplo-cego e controlado, com 1.879 pacientes de 105 hospitais dos EUA e Canadá, utilizando anticorpo monoclonal murino para o TNF- α (TNF- α Mab), não mostrou diferença na mortalidade de 28 dias entre os pacientes que receberam o anticorpo e os que receberam placebo (ABRAHAM E, 1998). Outro estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego e controlado, com 498 pacientes de 44 hospitais dos EUA e Europa, não demonstrou redução da mortalidade entre os que receberam o anticorpo em relação ao placebo, mesmo recebendo receptores solúveis de fusão protéica para o TNF- α (p55) (ABRAHAM E, 2007).

Estudos posteriores com receptores antagonistas a IL-1 tenderiam a atenuar as alterações hemodinâmicas, reduzindo a gravidade da acidose láctica e melhorando as taxas de sobrevivência. Criou-se um Grupo Investigador da Sepse para Antagonistas dos Receptores da IL-1, através de estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego e controlado, com 696 pacientes de 91 hospitais dos EUA e Europa, que também não demonstrou redução de mortalidade (OPAL SM, 1997).

Outro estudo utilizou o fator de ativação plaquetária (PAF) para mediar as ações de inúmeras citocinas, antagonizando seus receptores, podendo interferir na terapia da sepse por gram-negativos. Estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego e controlado com 600 pacientes com sepse grave, que testaram antagonistas de receptores PAF por quatro dias, também não demonstrou qualquer redução na taxa de mortalidade dos mesmos (DHAINAUT JF, 1998).

Várias outras terapias foram propostas para neutralizar a explosão de radicais livres e evitar o dano celular na SIRS, com agentes antioxidantes

(α -tocoferol, dimetil-sulfoxide, coenzima Q10, N-acetilcisteína, glutation, alopurinol, vitaminas C e E, β -caroteno, catalase e superóxido-dismutase entre outras) estão em avaliação através de estudos em animais, com resultados inconclusivos (KRISHNAGOPALAN S, DELLINGER RP, 2001).

Outros estudos com agentes não-esteróides, avaliaram o efeito de anti-inflamatórios para o resgate de pacientes em sepse, sem modificar a curva de mortalidade. Meta-análise com 18 ensaios clínicos em fases II e III, em 6.429 pacientes, demonstrou haver apenas tendências de melhora pela análise das vias de cicloxigenase e lipoxigenase (BONE RC, 1996).

Foram realizados outros estudos com uso de interferon- γ , capaz de restaurar a expressão HLA-DR dos macrófagos e reduzir a produção e liberação de TNF- α em pacientes com sepse. Também o uso de anticorpos contra produtos de ativação do complemento C5, melhorando a sobrevida, mas não impactando na mortalidade final (NATHENS AB, MARSHALL, JC, 1996).

A última medicação de impacto utilizada na prática clínica foi a drotrecogina- α , proteína C ativada recombinante humana. Foi autorizada pelo FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos da América em novembro de 2001. Um trabalho multicêntrico conhecido por PROWESS, avaliou a utilidade desta droga contra sepse. O resultado foi uma redução global de 19,4% no risco relativo de morte e uma redução de 6,1 % no risco absoluto de morte (30,8% de mortalidade aos 28 dias no grupo placebo versus 24,7% com drotrecogina- α). Posteriormente, uma análise detalhada revelou que apenas os pacientes com alto risco de morte (APACHE II \geq 25) mostraram redução significativa da mortalidade, em 13% (mortalidade de 44% com placebo versus 31% com drotrecogina- α) (BERNARD G, VINCENT JL, 2001).

Essa substância quando aplicada em pacientes selecionados melhorava aparentemente a curva de mortalidade inicial. Devido o elevado risco de efeitos colaterais, um antitrombótico, passou-se a questionar sua eficácia (HECKSHER, 2008; RANIERI et al., 2012).

No Brasil em 2014, o Instituto Latino Americano da Sepsis (ILAS), com base em dados de 77 hospitais, públicos e privados, incluiu 19.182 pacientes entre 2005 e 2013. A taxa geral de mortalidade por sepsis em serviços públicos é de 58,5%, no sistema privado 34,5%, com taxa global de 46%, ainda muito altos se comparados com dados mundiais, 30,8% (ILAS, 2014).

2.6. Alterações imunológicas associadas a sepsis

A sepsis é considerada uma perturbação fisiológica e imunológica marcada pela ativação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (COHEN J., 2002). Após a agressão inicial, instala-se a resposta orgânica inflamatória, com intuito de proteção imunológica. Citocinas são liberadas pelas células de defesa do organismo ativando diversos mecanismos, um fenômeno em ampliação com o recrutamento de células inflamatórias (MARSHALL JC, et al., 2003), aumento da produção de radicais livres, ativação das células endoteliais, vasodilatação, aumento de permeabilidade capilar, exacerbação de apoptose e trombose da microcirculação, comprometimento da função mitocondrial, com consequente hipoxia citopática, desbalanço entre oferta e consumo de oxigênio, resultando em disfunções orgânicas (DE BACKER D, 2011, et al., 2007).

Diferentes padrões de perfis de citocinas podem ser espelhados por apresentações clínicas distintas e gravidade (ULLOA L, 2005). A resposta

inflamatória e a produção de citocinas de forma desregulada desempenham papéis importantes no desenvolvimento da disfunção múltipla dos órgãos (RIEDEMANN NC, 2003).

As citocinas são proteínas secretadas pelos componentes do sistema imunológico, atuando como efetores ou moduladores da resposta inflamatória, que por sua vez, desempenha papel fundamental no desenvolvimento de sepse (COHEN J., 2002). São produzidas predominantemente por linfócitos e monócitos. Estes últimos liberam citocinas próinflamatórias (TNF- α e IL-1). Já os primeiros, T helper, originam 2 fenótipos diferentes de citocinas, TH-1 (TNF- α , IL-2, IL-3, IL-12, interferon- γ) e TH-2, estimulados pelos linfócitos B, sendo expresso por IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 (ROITT IM, 1997).

Diversos estudos demonstraram que concentrações elevadas de IL-6, IL-8 e TNF- α são presentes em não sobreviventes quando comparados a sobreviventes (PINSKY MR, 1993; HOFER S, et al, 2009). Outro trabalho demonstrou que as concentrações de IL-6 e IL-8 podem prever probabilidade de mortalidade nas primeiras 48 horas e em 28 dias (BOZZA FA, 2007).

Uma das alterações imunológicas mais importantes na resposta inflamatória aguda, conseqüentemente na sepse e no choque séptico, é a adesão de leucócitos nas células endoteliais. Isso ocorre mediado por partículas elétricas e pela presença de receptores específicos da membrana das células envolvidas. Esse processo é estimulado pela ação das citoquinas inflamatórias, especialmente IL-1 e TNF- α (POBER JS, 1986). Quando as células endoteliais são expostas às citoquinas ou acometidas por isquemia, expressam glicoproteínas chamadas moléculas de adesão leucócito-endotélio

(ELAM), moléculas de adesão intracelular (ILAM) ou moléculas de adesão intracelular vascular, que são responsáveis pela ligação dos receptores nos leucócitos (RICEM GE, 1991; VEDDER NB, 1990; KAK, VIVEK, 2011).

2.6.1. Citocina Inflamatória Interleucina-10 (IL-10)

A IL10 tem uma estrutura homodimérica, sem a presença de carboidratos, constituída por uma cadeia polipeptídica que se estrutura em quatro hélices alfa (α) (Figura 01) (MOORE et al, 2001). A IL10 é produzida por linfócitos Th0, linfócitos Th2, células B, células dendríticas e queratinócitos (BLACKBURN, 2007).

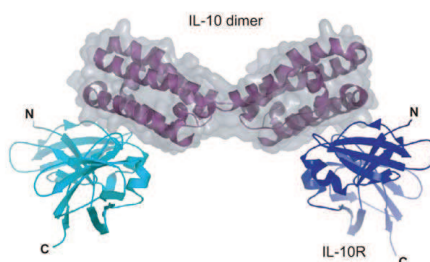


Figura 01 - Estrutura tridimensional da IL10 e do IL10R.

Fonte:

<http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/vol2004/issue231/images/large/2312004re7F8.jpeg>, acessado em 20 de fevereiro de 2014.

É uma citocina anti-inflamatória. Age inibindo a síntese de vários mediadores inflamatórios, normalmente secretados por monócitos e macrófagos ativados nesta cascata, tais como: IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 e GM-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Monócitos), M-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Monócitos), TNF- α , PAF (Fator Ativador de Plaquetas), TFA (Fator de Atividade Tissular), PGE2 (Prostaglandina - E2)

(FIORENTINO et al, 1991).

Os principais alvos da IL-10 são os monócitos e macrófagos. Inibe a expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe II, CD54, CD80 e CD86 em monócitos mesmo após a indução dessas moléculas por outras interleucinas, reduzindo a proliferação de linfócitos T (MOCELLIN et al, 2003).

A IL-10 estimula a expressão de receptores das Imunoglobulinas G em monócitos e macrófagos humanos, aumentando a capacidade fagocítica (SPITTLER et al, 1995) e a produção de PGE2 (Prostaglandina - E2) (FIORENTINO et al, 1991).

As células dendríticas são inibidas pela ação de IL-10, reduzindo a ativação de células T (MOCELLIN et al, 2003). O sistema imune apresenta um sistema de *feedback* negativo, com interação entre a inibição da síntese de IL-12, um estimulador na produção de citocinas Th1 por células T e macrófagos, e IL-10. Esta última inibe a produção de IL-12, e com a redução dos níveis séricos ocorre a indução da síntese de IL-10 por células T (MOCELLIN et al, 2003). O efeito inibidor da IL-10 é um fator importante de limitação do tempo de ação e do dano patológico das respostas inflamatórias (MOORE et al, 2001).

2.6.2. Fator de necrose tumoral (TNF)

Em meados de 1970, durante pesquisas dos efeitos de endotoxinas, descobriu-se o TNF (Fator de necrose tumoral). Porém, somente na década seguinte, a clonagem dos genes para o TNF demonstraram seus efeitos. Estudos em animais e em voluntários humanos, que receberam TNF, confirmaram seu potencial de induzir alterações metabólicas e disfunções parecidas com as observadas após endotoxemia (SALLES, M. J. C., 1999).

O TNF é uma citocina envolvida em inflamações sistêmicas e estimulador da reação de fase aguda. Causa o processo de apoptose celular, proliferação celular, diferenciação, inflamação, combate a replicação viral e tumores.

Os macrófagos, monócitos, neutrófilos, células T e Natural Killers, após estimulação por lipopolissacarídeos são os maiores indutores do TNF. A produção é estimulada por, IL-1, IL-2, GM-CSF, substância P, bradicinina, imunocomplexos, inibidores da cicloxigenase e PAF. A produção é inibida por ciclosporina, dexametasona, PGE₂, IL-6 e antagonistas do PAF (TRACEY KJ, CERAMI F., 1993).

As ações do TNF abrangem desde as alterações endoteliais, com perda da função da coagulação, atividade quimiotática e estímulo ao metabolismo oxidativo. Apresenta atividade de pirógeno endógeno, aumenta a reabsorção óssea, a atividade de adipócitos e a expressão de MHC-I e II. Estimula a produção de IL-6, estimulando os hepatócitos na produção de proteínas da fase aguda da inflamação (MACKAY F, et.al., 1993.; TARTAGLIA LA, et.al, 1993.)

Altas concentrações de TNF no sangue de pacientes com sepse correlacionam-se com a piora do prognóstico, devido a uma importante ação deletária quando sintetizado em quantidades excessivas (KUNKEL SL, et.al., 1991).

2.7. Peritonite

O peritônio é a maior e mais complexa membrana serosa no corpo. Ele forma um saco fechado que reveste as superfícies interiores da parede abdominal (anterior e lateral), formando o limite para o retroperitônio (posterior), onde se localizam as estruturas retroperitoneais pélvicas, e superiormente cobrindo a parte inferior do diafragma. Esta camada parietal do peritônio reflete sobre os órgãos viscerais abdominais para formar o peritônio visceral. Assim cria um espaço potencial entre as duas camadas, denominada de cavidade peritoneal. Este tem a função de reduzir o atrito entre os órgãos abdominais e de defesa, permitindo a migração de leucócitos e armazenamento de gordura (FELDMAN M, 2006).

O peritônio é composto por uma única camada de células mesoteliais achatadas de tecido areolar frouxo. A camada de tecido conjuntivo contém uma rica rede de capilares vasculares e linfáticos, terminações nervosas e células do sistema imune, em especial os linfócitos e macrófagos (PAVLIDIS TE, 2003).

A inflamação desta serosa denomina-se peritonite, tendo como causa a introdução de um agente no ambiente peritoneal, seja de forma estéril até através de perfuração de órgãos. Pode resultar também de outras substâncias irritantes, como corpos estranhos, bile a partir de uma vesícula biliar perfurada

ou um fígado traumatizado, ou ácido gástrico de uma úlcera perfurada. As mulheres, principalmente, também experimentam peritonite localizada a partir de uma trompa de Falópio infectada ou um cisto ovariano roto. Os sintomas podem apresentar-se agudamente ou de forma insidiosa, e ser limitada e leve, podendo ocasionar uma doença sistêmica e grave, como choque séptico (FELDMAN M, 2006).

A etiologia da doença depende do tipo e localização: peritonite primária, peritonite secundária, peritonite terciária, peritonite química, até formação de abscesso peritoneal. A compartimentalização da cavidade peritoneal, em conjunto com o omento, influencia a localização e propagação da inflamação peritoneal e infecções.

A peritonite primária é exemplificada mais comumente pela peritonite bacteriana espontânea (PBE), uma infecção bacteriana aguda de líquido ascítico. A contaminação da cavidade peritoneal é resultado de translocação de bactérias através da parede do intestino ou vasos linfáticos mesentéricos, podendo ser através de semeadura hematogênica na presença de bacteremia grave. Os mais susceptíveis são crianças com nefrose ou lúpus eritematoso sistêmico e portadores de lesão hepática crônica, cirrose (LATA J, 2009; RUNYON BA, 2004).

A peritonite secundária abrange as lesões diretas de órgãos peritoneais ou extraperitoneais que extravasam seus conteúdos para a cavidade estéril. Apendicite perfurada, úlcera gástrica ou duodenal perfurada, lesão de cólon causado por diverticulite ou neoplasia, até pancreatite necrotizante (TUBAU F, 2010).

Peritonite terciária se desenvolve mais frequentemente em pacientes imunocomprometidos e com comorbidades preexistentes. Embora raramente observado em infecções não complicadas peritoneais, a incidência de peritonite terciária em pacientes que necessitam de internação em UTI para infecções abdominais graves podem ser tão elevada quanto 50-74%. Peritonite tuberculosa é rara nos Estados Unidos (menos que 2 % de todas as causas de peritonite), mas ela continua a ser um problema significativo nos países em desenvolvimento e entre os pacientes com vírus da imunodeficiência humana. Os sintomas são inespecíficos e insidiosos (FELDMAN M, 2006).

Peritonite química habitualmente é estéril, causada por agentes irritantes tais como a bile, sangue, bário ou outras substâncias. Por inflamação transmural de órgãos viscerais, por exemplo, na doença de Crohn, sem inoculação bacteriana da cavidade peritoneal (FELDMAN M, 2006).

A peritonite é uma forma de doença grave, mas com a combinação de tratamento precoce, técnicas operatórias, melhora do arsenal de antibioticoterapia disponível, cuidados intensivos, têm levado a uma redução significativa da morbidade e mortalidade. Porém, ainda de elevada mortalidade, 50-70% dos pacientes com peritonite primária hospitalizados, por exemplo (EVANS LT, 2003). Varia de 30-50% no casos graves de sepse em peritonites secundárias, podendo atingir 70% na forma terciária (SORIANO G, 2010).

Devido a essas elevadas taxas de mortalidade, vários são os estudos na pesquisa de soluções para esta patologia. Modelos experimentais com o objetivo de simular a peritonite aguda em humanos, com variados aspectos de tratamento, uso de múltiplas substâncias e técnicas cirúrgicas vem sendo realizados (URIARTE et al.,1991, WHITESIDE, O, 2005).

Em animais de experimentação estabeleceu-se critérios para avaliação clínica dos estágios de peritonite (Tabela 03) (WICHTERMAN et al., 1980).

Tabela 03 - Critérios para sepse em ratos baseado em sinais clínicos (adaptado de WICHTERMAN et al., 1980)

Estágios da peritonite em animais experimentais
1. Mal-estar e astenia
2. Isolamento
3. Hiporexia
4. Letargia progressiva e falta de interesse pelo que ocorre ao redor
5. Piloereção
6. Reduzida ingesta hídrica
7. Taquipnéia
8. Olhos vitrificados com exudatos
9. Urina concentrada e purulenta, diarreia
10. Não faz objeção ao decúbito dorsal na mesa
11. Nível de consciência reduzido, falta de sensibilidade a dor, e morte entre 15 e 30 minutos

2.8. *Acinetobacter baumannii*

O *Acinetobacter baumannii* é uma espécie bacteriana gram negativo que pode ser encontrado no solo e água, todas as subespécies são causadoras de infecção nos seres humanos. Podem causar desde uma otite a sepse grave. É um patógeno de baixo risco para seres imunocompetentes, porém compromete a sobrevivência dos que estão sobre intensa resposta inflamatória aguda com desajuste do sistema imune, diabéticos, pacientes submetidos a grandes estresses cirúrgicos e imunossuprimidos. A transmissão geralmente ocorre pelo contato com superfícies contaminadas, contato direto podendo sobreviver na pele e artigos biológicos por vários dias (CHOI, AHK, 2009).

Coloniza comumente a pele, secreções orofaríngeas, respiratórias e urinária. O trato gastrointestinal, respiratório, feridas operatórias, meninges, válvulas cardíacas (nativas e próteses) também são usualmente acometidas (GO J., 1999).

A resistência aos carbapenêmicos entre esses patógenos está se tornando um problema terapêutico mundial e a produção de metalo-beta-lactamases tem emergido como um dos mecanismos responsáveis por esta resistência (FIGUEIREDO, DQ, 2009). Apresenta sobrevivência prolongada no meio ambiente e habilidade desenvolver resistência a antibióticos através da produção de carbapenemases (TSAKRIS et al., 2000).

Tecnicamente, o *Acinetobacter baumannii* é uma bactéria oxidase negativa, com ausência de beta-hemólise, ornitina e lisina-descarboxilase negativas, arginina dehidrolase negativa, Indol negativa. Apresenta colônias com aspecto entre puntiforme e mucóide, sem mobilidade, podendo ou não apresentar hemólise parcial em ágar Sangue Carneiro. As colônias são lactato negativas e bem delimitadas em ágar MacConkey (MONTALVÃO, 2006).

Constitui-se de um importante patógeno para os seres humanos por estar envolvido em diferentes sítios de infecção, tais como feridas operatórias, sistema respiratório, e outros (SMITH, et al, 2007). Apresenta um importante papel de transmissão por permanecer em superfícies como formadora de biofilme ou na pele, o que gera o perfil de resistência bacteriana (GADDY, 2009). Estudo de MARCHAIM et al, 2007, demonstra a persistência de cultura positiva em até 17,5 meses em alguns indivíduos, mesmo assintomáticos.

Dados do estudo SENTRY relatam que no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2001 o Brasil contribuiu com o maior número de isolados de *Acinetobacter spp* (n = 400) da América Latina (CLSI, 2005).

3 . OBJETIVO

Avaliar o efeito do uso da fração purificada *Hev b 13*, extraído de soro do látex da *Hevea brasiliensis*, na sobrevida em horas de ratos com peritonite experimental induzida com cepas de *Acinetobacter baumannii* e submetidos a agressão cirúrgica.

3.1. Objetivos específicos

Avaliar a sobrevida dos animais em horas submetidos ao tratamento com Soro Fisiológico 0,9% e com a solução componente da fração do soro *Hev b 13*;

Avaliar as alterações macroscópicas externas, intratorácicas e intra-abdominais;

Avaliar as alterações hematológicas;

Avaliar alterações teciduais em pulmão, fígado, rins, glândula adrenal;

Avaliar as alterações de TNF- α e IL-10 no tecido pulmonar;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais participantes do estudo

Para realizar o estudo, foram utilizados *Rattus norvegicus albinus* linhagem *Wistar*, machos e fêmeas adultos, apresentando peso corpóreo variando entre 200 a 300 gramas, procedentes do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica de Goiás e faixa etária entre dois e três meses. Os animais foram alojados em gaiolas individuais de polipropileno, com piso sólido, forradas com maravalha, esterilizadas, conforme padrões internacionais e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA. O ambiente foi mantido em temperatura média de 21 °C, sistema de ventilação, ciclo de claro-escuro (claridade 7 às 19h; escuro 19 às 7h). O experimento teve início após o período de sete dias de ambientação, conforme preconizado pelos comitês de ética.

4.2. Obtenção da solução contendo cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistente

As cepas utilizadas no experimento foram cultivadas e isoladas, com análise de viabilidade e perfil no Laboratório de Análises Clínicas e Saúde (LAS) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, provenientes do Laboratório de Análises Clínicas do Estado de Goiás (LACEN).

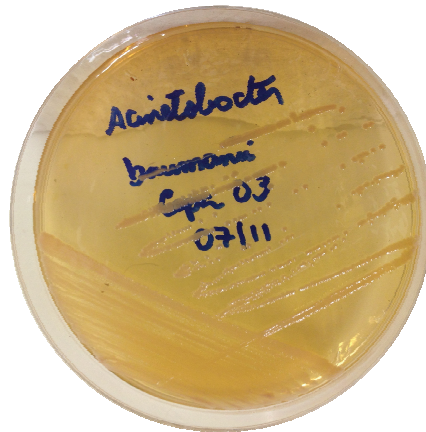


Figura 02 - Placa de *Acinetobacter baumannii* utilizada no experimento. Cultivadas no Laboratório de Análises Clínicas e Saúde (LAS) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, com avaliações de perfil e viabilidade, provenientes do Laboratório de Análises Clínicas do Estado de Goiás (LACEN).

Foram submetidas a cultura e antibiograma para confirmação do perfil de resistência aos antibióticos utilizados, segundo Tabela 04, no Laboratório de Microbiologia do Instituto Fio Cruz e pelo laboratório de microbiologia LACEN.

Foram preparadas em diluições recomendadas para que a concentração de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mm³ sejam efetivas no desenvolvimento de infecções, o que representa uma diluição para $1,5 \times 10^8$ (solução padrão 0,5), 3×10^8 (solução padrão 1,0) e 6×10^8 (solução padrão 2,0), ou concentração para efetividade mínima, através da escala nefelométrica de Mc Farland (Metodos y Diagnosticos del Laboratorio Clinico, 1983).

Tabela 04 – Antibiograma das cepas de *Acinetobacter baumannii* utilizados neste estudo.

Antimicrobiano	MIC	Padrão
Amicacina	>32	Resistente
Amipicilina/Sulbactam	>16/8	Resistente
Cefepime	>16	Resistente
Cefotaxima	>32	Resistente
Ceftadizima	>16	Resistente
Ceftriaxona	>32	Resistente
Ciprofloxacino	>2	Resistente
Gentamicina	>8	Resistente
Imipenem	>8	Resistente
Levofloxacino	>4	Resistente
Meropenem	>8	Resistente
Piperacilina/Tazobactam	>64	Resistente
Tetraciclina	< 4	Sensível
Tobramicina	>8	Resistente
Trimetopim/Sulfadiazina	<2/38	Sensível

A inoculação da cepa na cavidade abdominal será realizada mediante o uso de seringa estéril de 5 ml após aspiração da cepa da diluição previamente preparada e acondicionada em frascos específicos para o *A. baumannii* multirresistente.

4.3. Obtenção da fração *Hev b 13* do soro do látex da *Hevea brasiliensis*

O componente *Hev b 13* derivado do soro do látex foi gentilmente fornecido pelo Laboratório Pele Nova Biotecnologia (SITI ARIJA M., 2004).

4.4. Aspectos éticos

O experimento propõe ser realizado em conformidade com as recomendações contidas nos seguintes documentos:

- a) Declaração de Helsinque
- b) Normas Internacionais de Proteção aos Animais
- c) Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- d) Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, segundo protocolo 002/2013.

4.5. Estudo piloto

Todos os animais foram anestesiados no músculo da face anterior da coxa direita, com cloridrato de quetamina 10% na dose de 12,5 mg/kg e xilazina 0,05 mg/Kg de peso do animal.

Realizado experimento com 10 ratos, sendo instituído programação cirúrgica dos ratos da linhagem *Wistar*, machos e fêmeas com peso médio calculado dos animais de 242,38 gramas, com tempo cirúrgico próximo de 20 minutos.

Os ratos foram mantidos nas gaiolas previamente preparadas até plano anestésico, com manutenção de respiração espontânea e ausência de reflexos de dor. Submetidos a antissepsia padronizada com clorexidina degermante, luva estéril e material cirúrgico previamente esterilizado em autoclave. Tricotomia da região abdominal com lâminas novas.

A cirurgia proposta foi vinculada a modelo previamente realizado em trabalho não publicado (Modelo Piloto – Universidade Federal de Goiás) com

incisão aproximadamente de 3,0 cm na linha mediana abdominal, dissecção de musculatura por meio da linha avascular entre os músculos retos abdominais, seguido de inventário da cavidade para averiguação de anatomia ou alterações que impossibilitassem o procedimento (gestação, alterações anatômicas).

Posteriormente, tração gástrica com realização de secção transversa da parede gástrica de 0,5 cm, aproximadamente 0,3 cm da região proximal do antro gástrico (Figura 03). Seguida de expressão do conteúdo gástrico com gaze estéril.

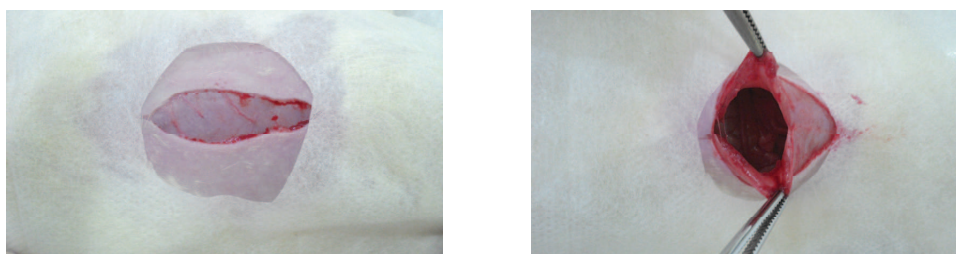


Figura 03 – Incisão e dissecção da parede abdominal.

Realizado dissecção e secção do pâncreas espraiado retrogástrico com ligadura das extremidades com fio de seda 2,0.

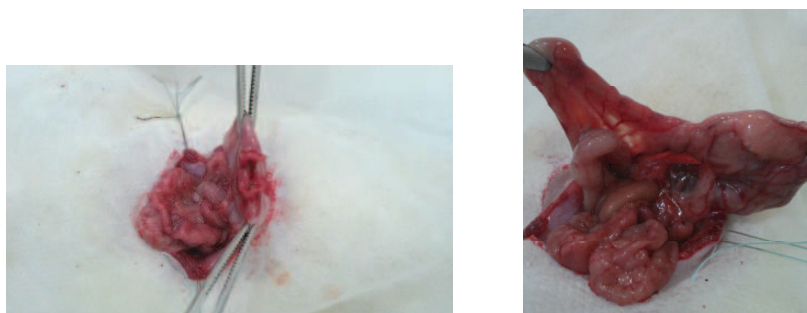


Figura 04 – Visão da secção gástrica e da primeira porção do intestino delgado.

Seguido de secção transversa do duodeno na segunda porção do mesmo. Síntese com fio de poliéster 3,0 agulha cilíndrica, da fabricante

B.Braun^R, tanto gástrica quanto duodenal. Avaliação cuidadosa da gastrorrafia e enterorrafia, checando a patência do trânsito e a perfeita síntese. Revisão de hemostasia posteriormente.

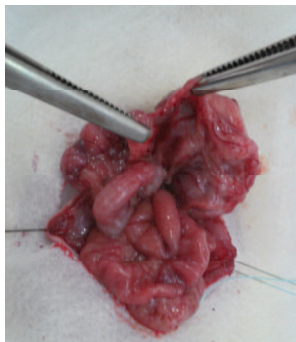


Figura 05 – Visão da manipulação no pâncreas espraído.

Em seguida realizado infusão de 1,0 ml de solução padronizada no laboratório de Microbiologia contendo cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes, na concentração de 3×10^8 UFC/ml, na cavidade peritoneal de 05 animais. Neste momento provavelmente pela temperatura do líquido todos os ratos apresentaram apnéia transitória, com manutenção dos batimentos cardíacos, sendo necessário tração e manutenção da língua dos roedores para manter as vias aéreas pérvias (Figura 06).

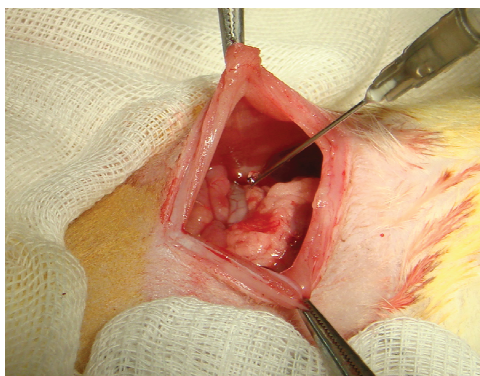


Figura 06 – Injeção de cepas de *Acinetobacter baumannii* na cavidade abdominal.

Síntese de cavidade abdominal em dois planos, evitando o contato do líquido peritoneal com meio externo ou mesmo com a ferida operatória aberta, com fios de poliéster e nylon 3,0.

Todos os ratos deste grupo tiveram piora clínica observada entre a quarta e a sexta hora do experimento, com óbito notificado em todos.

Os demais 05 ratos foram submetidos apenas a cirurgia descrita sem infusão de cepas bacterianas. Sendo que dentre estes apenas 01 rato faleceu antes do período de 24 horas, os demais necessitaram ser submetidos a eutanásia posteriormente com dose letal de quetamina (DL-50 148 mg/Kg) xilazina (DL-50 20 mg/Kg).

4.6.1. Procedimento experimental mortalidade

Foram realizados divisões em 03 grupos de 08 ratos cada, de forma randomizada. A solução contendo *Hev b 13* ou contendo apenas SF0,9% foi fornecida ao cirurgião pesquisador de forma aleatória e cega. Sorteio em envelopes lacrados e numerados. Todos foram submetidos a cirurgia descrita com a gastrorragia, enterorragia e lesão pancreática associada.

No pós operatório imediato os animais são mantidos em gaiolas previamente separadas e preparadas, aquecidas e com hidratação com 05 ml de Soro Fisiológico 0,9% via subcutânea e os olhos umedecidos com 1,0 ml de soro fisiológico. Ofertado água filtrada e ração padrão em livre demanda nas gaiolas.

O tratamento preconizado por meio de randomização foi realizado sempre na sexta hora do término da cirurgia, com administração de 01 ml de

soro fisiológico 0,9% ou solução 0,5 mg/Kg de *Hev b 13*. Esse período foi selecionado conforme experimentos prévios no estudo piloto onde observou-se sinais clínicos de sepse entre a quarta e sexta hora.

Os animais que faleceram antes do período de 06 horas, foram substituídos na sequência. Os ratos 1, 2, 4, 11 e 14 (31,25%) evoluíram ao óbito antes de seis horas, sendo que o primeiro rato faleceu no intervalo de 04 horas e 15 minutos após o término do procedimento cirúrgico. Foram substituídos, respectivamente pelos ratos numerados 17, 22, 18, 23 e 24, dentro dos padrões da randomização realizada.

Foi administrado o tratamento contendo 0,5 mg/Kg de solução de *Hev b 13* (DE BOTTOLI TEIXEIRA L, et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2012) ou 1,0 ml soro fisiológico 0,9% via subcutânea, nos ratos com numeração correspondente a randomização prévia. Apresentou-se o sorteio na seguinte sequência para receber o a solução padrão de *Hev b 13*: 17, 3, 18, 5, 8, 9, 10, 12, 16. Sendo os ratos 17 e 18 os substitutos dos 1 e 4.

Os ratos foram observados segundo os critérios estabelecidos por WICHTERMAN, 1980, de sepse, como adinamia, piloereção, redução de ingesta hídrica e de ração. Sinais de peritonite com irritabilidade, agressividade e tentativa de escape a palpação abdominal.

Devido randomização não foi possível estabelecer o tratamento que seria administrado aos mesmos, sendo realizado substituição por outros ratos numerados e mantido padrão do controle randomizado. Nenhuma cobaia faleceu diretamente logo após o procedimento.

4.6.2. Coleta de material para análise histológica

Após o óbito, seguiu-se abertura ampla da cavidade torácica e abdominal. Inventário da cavidade e das gastrorrafia e enterorrafia com coleta de material na seguinte sequência: fígado, suprarenal direita, rim direito e pulmão direito. Realizado pesagem em balança de precisão, previamente calibrada. Estocado material coletado em frascos com formaldeído a 10% e identificados.

4.6.2.1. Confecção de lâminas

Realizado preparo de material para histopatologia com retirada das peças imersas em formaldeído 10%. Incluído em parafina para posterior cortes entre 5 e 7 micrômetros.

As fitas obtidas a partir do micrótomo foram imersas em água (3º e 8º abaixo do ponto de fusão da parafina utilizada) para serem distendidas.

Após a distensão, os cortes foram separados individualmente, utilizando-se lâminas de vidro previamente limpas com detergente, estocadas em álcool 70% e secas. Os cortes obtidos foram transferidos para uma estufa onde ficaram por 10 minutos para posteriormente serem colocados em um suporte inclinado. Os cortes permaneceram em uma estufa a 60º para secagem.

O corante utilizado foi a hematoxilina e a eosina (HE). A hematoxilina é uma base que cora, preferencialmente, componentes ácidos das células em um tom azulado escuro. Como os componentes ácidos mais abundantes são o DNA e o RNA, tanto o núcleo, quanto certas partes do citoplasma, se tornam azulados. Já a eosina é um ácido que cora as estruturas básicas da célula de rosa (acidófilas) (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983; GARTNER e HIATT,

1999). As etapas foram obedecidas na seguinte sequencia: desparafinação, hidratação dos cortes, corante com hematoxilina por 15 minutos, lavagem em água corrente por 10 minutos, e desidratação com álcool 70%, montagem em resina e finalmente na lâmina. Catalogação individualizada.

4.6.3. Coleta de sangue para análise hematológica

Foram realizadas coletas de sangue intracardíaco. Foram coletados no mínimo 1,0 mL de sangue dos ratos em seringa, imediatamente transferido para tubo com Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA).

4.6.4. Contagem de leucócitos

O leucograma e o plaquetograma foram realizados no equipamento COBAS XE 2100D da ROCHE, pela metodologia de citometria e impedância elétrica.

Já a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada manual por microscopia óptica, levando em consideração que a referência utilizada pela automação para caracterização dos diferentes tipos de leucócitos é diferente entre humanos e animais, sendo então necessária a contagem manual destas células.

4.6.5. Coleta de material para análise de interleucinas

Propõe-se a análise das interleucinas IL-10 e TNF- α .

Após o óbito, realiza-se abertura ampla da cavidade torácica e abdominal. Coleta de material na seguinte sequencia: fígado, suprarenal direita, rim direito e pulmão direito. Pesagem em balança de precisão

previamente calibrada. Estocado material coletado em frascos de Eppendorf com solução de 200 μ L de PBS 1X (Phosphate Buffered Saline), identificados e transferidos para estocagem em temperatura 80° C negativo.

4.6.6. Preparo das amostras para Elisa

Os fragmentos de pulmões foram descongelados e acrescidos de 15 mL/mg de PBS 1X, 10% de solução de lise e 1% de inibidor de protease (Sigma), macerados manualmente, homogeneizados pelo aparelho Politron e posteriormente, centrifugados à 10000 rpm. Utilizou-se o sobrenadante do macerado das amostras para as dosagens de IL-10 e TNF, através do método quantitativo Elisa, seguindo protocolo realizado pelo Laboratório de Citocinas do Instituto de Patologia Tropical de Saúde Pública da UFG e conforme recomendações dos kits BD-Biosciences^R.

4.6.7. Elisa TNF e IL-10

Placas de 96 poços (Jetbiofil) foram cobertas com 80 μ L/poço de anticorpo de captura (2,5 μ L/mL), específico para cada citocina. Estes anticorpos foram diluídos em carbonato pH 9,0 (TNF), PBS (IL-10) e incubados por 18-24 horas à 4 °C. As placas foram lavadas 5X com PBS-Tween-20. As ligações não específicas foram bloqueadas com 160 μ L de PBS 1X e soro bovino fetal 3% por 1 hora em temperatura ambiente e, posteriormente, lavados 5X com PBS-Tween. As amostras e o padrão foram adicionados na placa (80 μ L/poço), sendo o padrão diluído em 80 μ L de PBS/SBF 3% (diluição seriada) e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. Após esse

período, as placas foram lavadas 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 e a placa foi colocada em leitora de Elisa 455/620 nm.

4.6.8. Avaliação histológica

As lâminas dos pulmões foram avaliadas sob supervisão de patologista de forma cega, não sendo informado ao mesmo qual tratamento foram submetidos os ratos. Observadas em microscopia de luz.

Foram avaliados os seguintes parâmetros pulmonares: a congestão vascular; septo alveolar: infiltrado inflamatório, espessamento e formação de matrizes fibrinosas.

A gradação de cada evento foi realizada da seguinte forma: (-): ausente; (+):leve; (++) : moderado; (+++) : acentuado.

4.6.9. Análise estatística

Os dados foram tabulados e organizados em uma planilha Excel. Em seguida, os dados de sobrevivência e laboratoriais foram analisados por meio de estatística descritiva (média, desvio-padrão e variação). A fim de verificar se houve diferença significativa entre os grupos tratados e controle quanto à sobrevivência e análises laboratoriais, foi utilizado o teste T. Antes foram testados se os dados seguiam distribuição Normal por meio do teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov). Foi utilizado o teste de correlação de *Pearson* para verificar associação entre o peso e sobrevivência dos animais dos grupos tratado e controle. Para todas as análises foi adotado um nível de significância igual a 5% ($p \leq 0,05$). Todas as análises foram realizadas no programa Bioestat 5.0 (AYRES et al., 2007).

As concentrações de citocinas contidas nas amostras foram calculadas a partir da curva padrão, obtida pela diluição seriada, sendo as concentrações iniciais de 1ng/mL. Para comparação múltipla utilizou-se ANOVA com nível de significância $p < 0.05$. Os resultados estão expressos em picogramas de citocinas/miligramas de tecido e foi realizada pelo programa Graph Pad Prism versão 6.05 para Windows.

5. RESULTADOS

5.1.1. Avaliação sobrevida

Em comum os ratos apresentavam distensão gástrica acentuada, em nenhuma cobaia foi observado deiscência de sutura ou obstrução gastrointestinal.

Os pesos, tempos cirúrgicos e horário do óbito estão nas tabelas 05 e 06.

Tabela 05 – Grupo sobrevida, ratos tratados com *Hev b 13*.

RATO	TEMPO ATÉ O ÓBITO	PESO EM GRAMAS
3	11:27	231,08
5	08:50	298
8	10:40	264,5
9	08:10	209
10	07:00	212
12	08:25	217
16	09:20	212
17	08:45	212

Tabela 06 – Grupo sobrevida, ratos tratados com *SF0,9%*.

RATO	TEMPO ATÉ O ÓBITO	PESO EM GRAMAS
6	9:00	290
7	10:25	272,12
15	8:28	240,14
18	7:44	246
22	8:10	257
23	8:45	344
24	10:20	292
13	8:28	240,12

O terceiro grupo de 08 ratos, foram submetidos apenas ao procedimento cirúrgico, sem infusão de cepas bacterianas, apenas 01 rato (número 21) (12,5%) apresentou óbito, após 72 horas do procedimento inicial. Os demais ratos foram submetidos a procedimento de eutanásia com doses letais de quetamina (DL-50 148 mg/Kg) xilazina (DL-50 20 mg/Kg) no sétimo dia de pós operatório (ratos 19, 20, 40, 41, 42, 43, 44).

5.1.2. Análise variância da sobrevida

A análise de variância da sobrevida dos animais pertencentes aos dois grupos apresenta-se na Tabela 07. Conforme observado, houve semelhança significativa em relação às horas de vida nos grupos ($p= 0,8106$).

Tabela 07 - Sobrevida, em horas, entre os grupos controle e tratado com a solução *Hev b 13*

Grupos	Média (\pm Dp) (horas)	Varição (horas)	p^*
Tratado	8,90 (\pm 1,36)	7,00 – 11,27	0,8106
Controle	8,75 (\pm 1,01)	7,44 – 10,25	

*Dp= Desvio Padrão; * Teste t*

A Figura 07 descreve a sobrevida dos animais que foram tratados com a solução *Hev b 13* e os animais do grupo controle. Mostra que eles se sobrepõem, ou seja, foram semelhantes em ambos grupos.

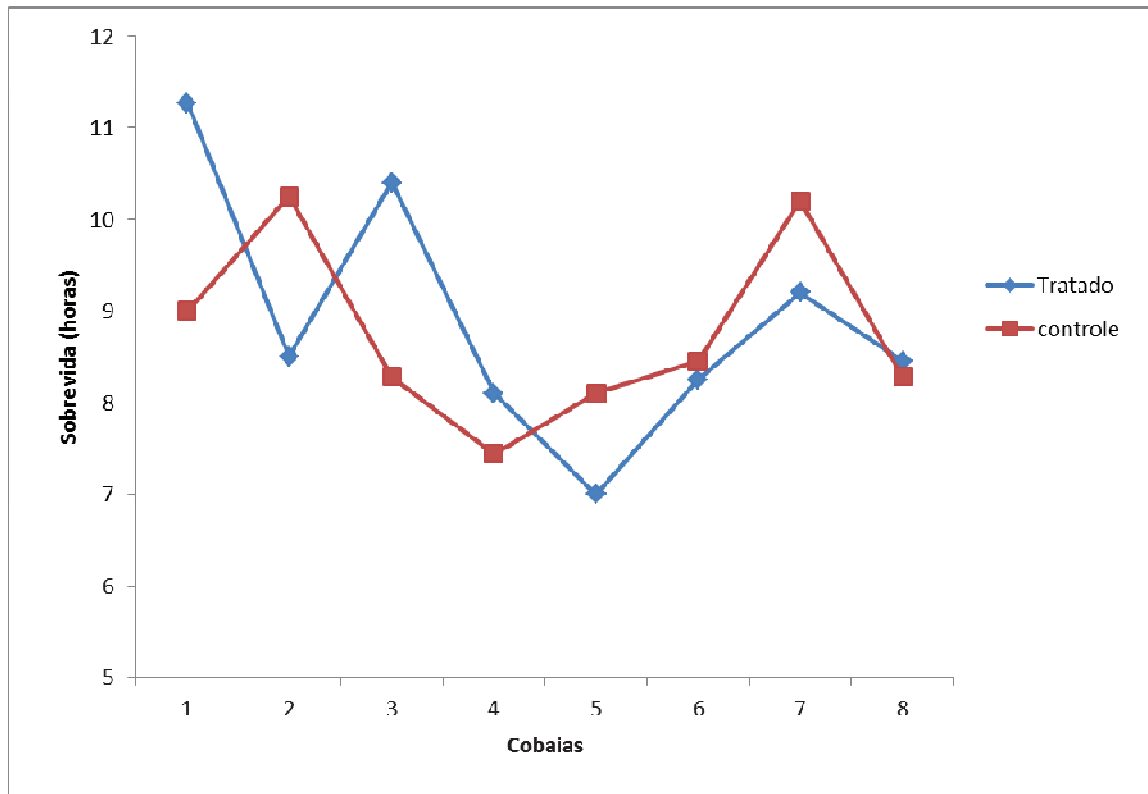


Figura 07 - Sobrevida, em horas, dos grupos tratado com a solução *Hev b 13* e do grupo controle (soro fisiológico).

Os animais dos grupos controle e tratamento não sobreviveram até a décima segunda hora de avaliação do experimento, sendo em horas de vida, estatisticamente semelhante.

As figuras 08 e 09 demonstram que não houve diferença significativa entre o peso e sobrevida dos animais tratados com a solução *Hev b 13* ($p=0,4880$) e dos animais do grupo controle ($p=0,4054$). Ou seja, o peso não interferiu no tempo de sobrevida dos animais.

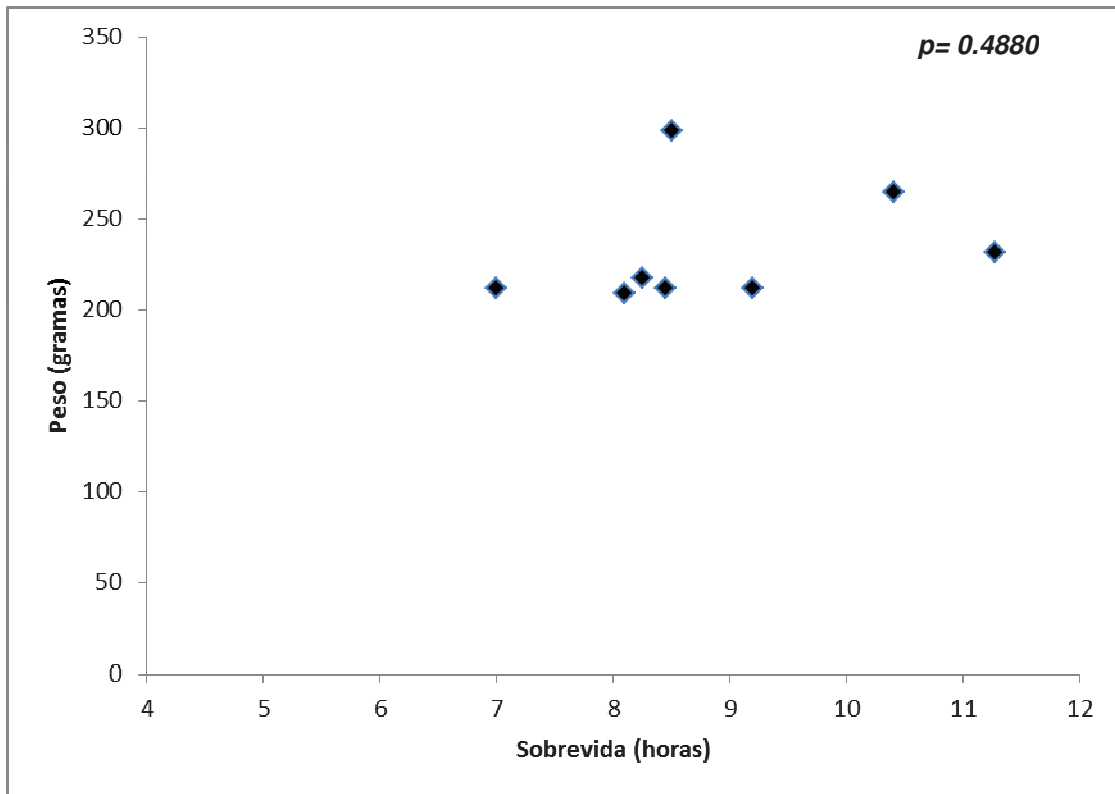


Figura 08 - Correlação de Pearson entre a sobrevida (horas) e o peso (gramas) dos animais tratado com a solução *Hev b 13*.

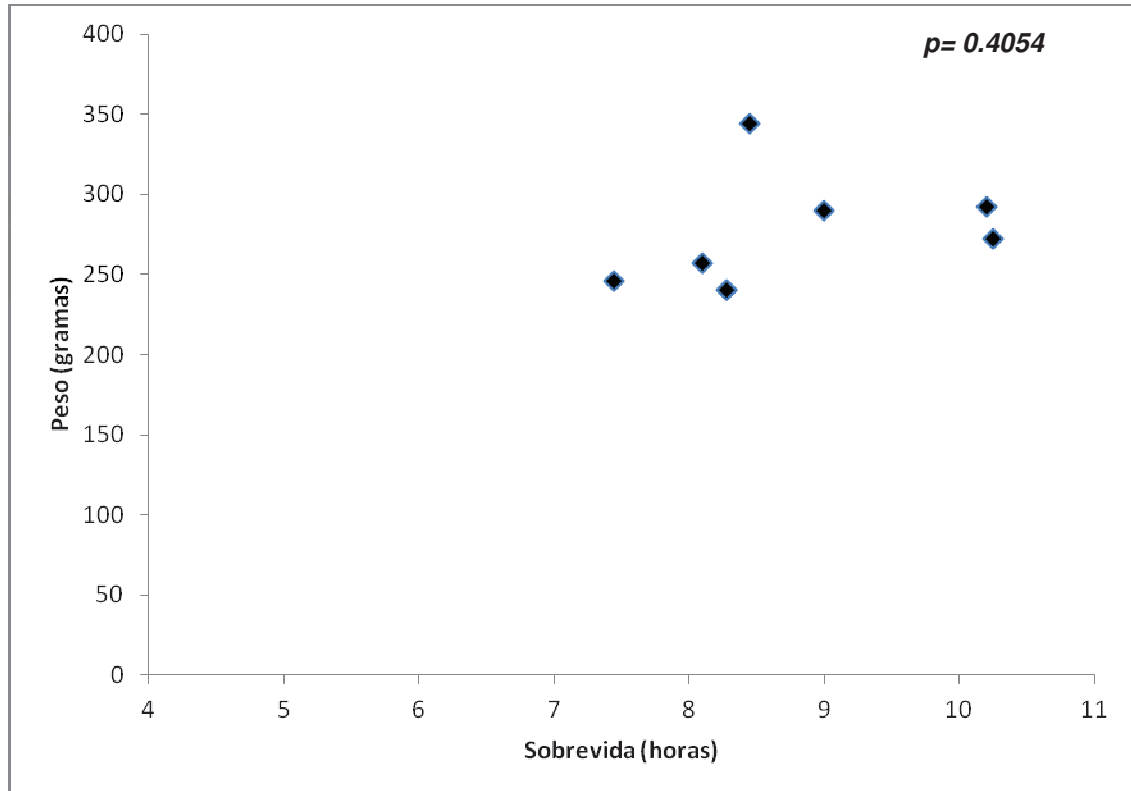


Figura 09 - Correlação de Pearson entre a sobrevida (horas) e o peso (gramas) dos animais do grupo controle.

5.2. Análise hematológica

A estatística descritiva dos resultados das análises laboratoriais dos grupos: controle (SF0,9%); tratamento com *Hev b 13*, estão dispostos na Tabela 08.

Tabela 08 - Estatística descritiva das análises laboratoriais, entre os grupos controle e grupo tratado com a solução *Hev b 13*.

Parâmetros	Controle	Tratado	<i>p</i> *
Plaquetograma			
Média (±DP)	397000 (±114024,1)	479480 (±214806,8)	0,4700
Variação	241000-522000	100400-634000	
Leucócitos Totais			
Média (±DP)	4416 (±1133,2)	2748 (±633,3)	0,0207**
Variação	3340-5700	1930-3600	
Neutrófilos Totais			
Média (±DP)	1869 (±956,429)	1096,28 (±392,655)	0,1330
Variação	939,3-2957,4	579-1530	
Linfócitos Totais			
Média (±DP)	1797,3 (±103,109)	1171,4 (±322,097)	0,0032**
Variação	1666,5-1938	663-1453,5	
Eosinófilos Totais			
Média (±DP)	22,6 (±30,894)	37,56 (±15,013)	0,3574
Variação	0-57	25,5-62,2	
Monócitos Totais			
Média (±DP)	598,04 (±168,9)	429,32 (±287,951)	0,2911
Variação	424,2-855	250,9-936	
Basófilos Totais			
Média (±DP)	22,56 (±30,894)	13,42 (±18,458)	0,5857
Variação	0-57	0-36	

DP= Desvio Padrão, * Teste t, ** Diferença significativa

A Tabela 08 mostra que houve diferença significativa entre os animais que foram tratados com a solução *Hev b 13* e os animais do grupo controle, nas análises laboratoriais apenas na contagem de leucócitos totais ($p= 0,0207$) e linfócitos totais ($p= 0,0032$). As demais contagens não ocorreram diferenças estatísticas significativas ($p>0,05$).

O grupo controle (grupo 3) demonstrou que o procedimento cirúrgico foi realizado de forma segura, sem alteração na curva de sobrevivência, apenas uma cobaia foi a óbito em 72 horas, as demais necessitaram ser submetidas a procedimento de eutanásia no sétimo dia.

5.3. Avaliação macroscópica

Após a verificação imediata do óbito dos animais, foram realizadas incisões abdominal e torácica para avaliação do estado dos órgãos.

Os achados comuns entre os animais que foram submetidos a cirurgia descrita e receberam cepas bacterianas foram a distensão gástrica e presença de líquido inflamatório peritoneal. Verificamos a enterorragia na primeira porção intestinal sempre patente, com fluxo de líquido entérico preservado a ordenha manual (Figura 10). Em nenhum rato houve extravasamento de líquido gastroentérico para cavidade peritoneal.

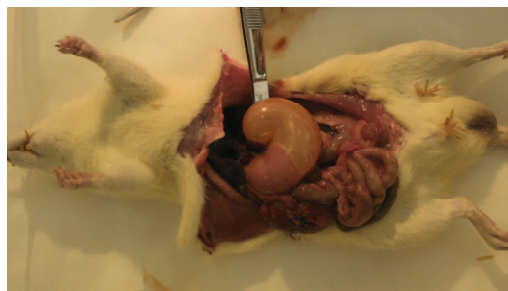


Figura 10 - Distensão gástrica comum aos ratos que receberam cepas de *Acinetobacter baumannii*.

Um dos animais apresentou hemorragia conjuntival (Figura 11).

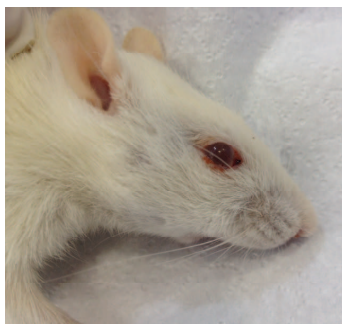


Figura 11 - Presença cromodacriorréia.

Em outro rato observamos pulmão com padrão de lesões hemorrágicas pleurais.

5.4. Avaliação IL-10

Ocorreu um aumento dos níveis de IL-10 no grupo tratado com *Hev b 13* em relação aos do grupo controle normal (Tabela 09).

Tabela 09 – Valores de IL-10 em pg/mg de tecido entre os grupos referência, cirúrgico, controle e tratado com a solução *Hev b 13*

concentração normal	4,8 pg/mg
grupo cirurgia	6,5 pg/mg
grupo tratado com SF 0.9%	9,7 pg/mg
grupo tratado com <i>Hev b 13</i>	11,3 pg/mg

5.5. Avaliação TNF

Ocorreu um aumento dos níveis de TNF em todos os grupos em relação aos do grupo controle (Tabela 10).

Tabela 10 – Valores de TNF em pg/mg de tecido entre os grupos referência, cirúrgico, controle e tratado com a solução *Hev b 13*

concentração normal	1,85 pg/mg
grupo cirurgia	4,73 pg/mg
grupo tratado com SF 0.9%	4,77 pg/mg
grupo tratado com <i>Hev b 13</i>	5,24 pg/mg

6. DISCUSSÃO

6.1. Experimento sobrevida

Na dosagem 0,5 mg/Kg de solução *Hev b 13* via subcutânea, observamos semelhança na sobrevida dos animais que foram tratados com esta solução e os animais do grupo controle, com 1 ml de SF0,9% ($p=0,8106$). O óbito ocorreu em média 8,825 horas após o procedimento cirúrgico, sendo que o grupo que recebeu soro fisiológico 0,9% sobreviveram em média 8,75 horas e o grupo que recebeu *Hev b 13*, 8,90 horas.

Durante o experimento, observamos que os ratos operados apresentavam recuperação anestésica sob aquecimento, com movimentação espontânea nas gaiolas. Próximo a quarta hora do início do mesmo, os sinais e sintomas de sepse descritos por WICHTERMAN, 1980, como adinamia, piloereção, redução de ingesta hídrica e de ração, peritonite com irritabilidade, agressividade e tentativa de escape a palpação abdominal estavam presentes.

Os ratos foram submetidos a procedimento que induziu 100% das amostras no estudo piloto ao óbito. Não receberam nenhum tipo de suporte preconizado na sepse para avaliação isolada do efeito da substância *Hev b 13* (DELLINGER, et al., 2008).

6.2. Análise laboratorial

Foram analisadas amostras de células brancas e plaquetas, com contagem diferencial de forma manual, obtendo informações do processo patológico previamente induzido.

De acordo com os dados obtidos em nosso estudo, houve uma acentuação significativa na produção de leucócitos totais no grupo tratamento em relação ao grupo controle ($p=0,0207$). Os que receberam *Hev b 13*, apresentaram média 2748 células/mm³, e desvio $\pm 633,3$ células/mm³. Já o grupo tratado com Soro Fisiológico 0,9%, a média de 4416 células/mm³ com desvio padrão $\pm 1133,2$ células/mm³. Esse último grupo apresentou maior variabilidade da quantidade de células. Isso reflete os achados em outros estudos, nos quais foram observados efeitos anti-inflamatórios da *Hev b 13* sobre o sistema imune, com produção de IL-10 e redução dos números de leucócitos (DE BOTTOLI TEIXEIRA L, et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2012).

A avaliação de neutrófilos não demonstrou diferenças estatísticas ($p=0,1330$), sendo o grupo controle com 1869 células/mm³, desvio padrão $\pm 956,429$ células/mm³. O outro grupo com 1096,28 células/mm³, e desvio de 392,655 células/mm³. Provavelmente por não ser esse o mecanismo de ação da substância testada, como comprovado em outros trabalhos (DE BOTTOLI TEIXEIRA L, et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2012).

A avaliação de eosinófilos elevados em relação ao padrão de normalidade de 0.07 (± 0.04), (CLIFFORD; GIKNIS, 2008), que são células multifuncionais complexas, não demonstrou diferenças estatísticas ($p=0,3574$), sendo o grupo controle com 22,6 células/mm³, desvio padrão $\pm 30,894$

células/mm³. O grupo tratamento com 37,56 células/mm³, e desvio de 15,03 células/mm³. Demonstrou que *Hev b 13*, apesar de ser uma esterase alergênica, não induziu nenhum processo alergênico nos animais, mas estabeleceram importante reação frente a sepse (CHAUFFAILLE, 2010).

Os monócitos variam de 598,04 células/mm³, com desvio padrão $\pm 168,9$ células/mm³ no grupo controle e 429,32 células/mm³, e desvio padrão $\pm 287,951$ células/mm³, não demonstrou diferença significativa ($p=0,2911$). Os valores de referência para animais em condições normais, segundo Clifford e Giknis (2008), são de 0.09 células/mm³ (± 0.06). Essa elevação demonstra a resposta inflamatória aguda em relação ao processo cirúrgico e indução de sepse pelas cepas de *Acinetobacter baumannii*, pois os monócitos são células que se diferenciam em macrófagos e são responsáveis pela fagocitose e morte intracelular de microrganismos (CLIFFORD; GIKNIS, 2008).

A avaliação dos linfócitos isoladamente demonstra uma diferença significativa entre os dois grupos ($p=0,0032$). Os animais que receberam a solução apresentaram 1171,4 células/mm³ com desvio padrão $\pm 322,097$ células/mm³. Em relação ao grupo controle com 1797,3 células/mm³ com desvio padrão $\pm 103,109$ células/mm³. Os linfócitos T helper, originam 2 fenótipos diferentes de citocinas, TH-1 (TNF- α , IL-2, IL-3, IL-12, interferon- γ) e TH-2, estimulados pelos linfócitos B, sendo expresso por IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 (ROITT IM, 1997). Refletindo a resposta esperada com uso de *Hev b 13*, frente as agressões inflamatórias com colite e artrite (DE BOTTOLI TEIXEIRA L, et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2012). Nestes últimos trabalhos observou-se que o principal benefício do uso de *Hev b 13* é a produção de IL-10 pelo aumento dos monócitos e macrófagos, inibindo a expressão de moléculas do Complexo

Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe II, CD54, CD80 e CD86 em monócitos mesmo após a indução dessas moléculas por outras interleucinas, reduzindo a proliferação de linfócitos T (MOCELLIN et al., 2003). A resolução de um processo infeccioso ocorre inicialmente com a produção de citocinas proinflamatórias que provocam um processo inflamatório, que tem como principal ação a remoção dos microrganismos, e em seguida este processo é limitado pela IL-10 evitando assim a manutenção de uma fase proinflamatória exacerbada ou prolongada no presente estudo, houve um aumento na produção de IL-10 sendo que a redução de leucócitos totais e de linfócitos podem ser explicados, pelo menos em parte, pelo recrutamento de leucócitos e linfócitos para os tecidos em busca de restabelecer a homeostase (IYER, SHANKAR SUBRAMANIAN; CHENG, GENHONG, 2012).

6.3. Análise histológica

Na avaliação dos pulmões, os grupos que foram submetidos a cirurgia e receberam cepas de *Acinetobacter baumannii*, apresentaram alargamento septal as custas de linfócitos ao redor dos brônquios, formando, por vezes, agregados (Figuras 12 e 13).

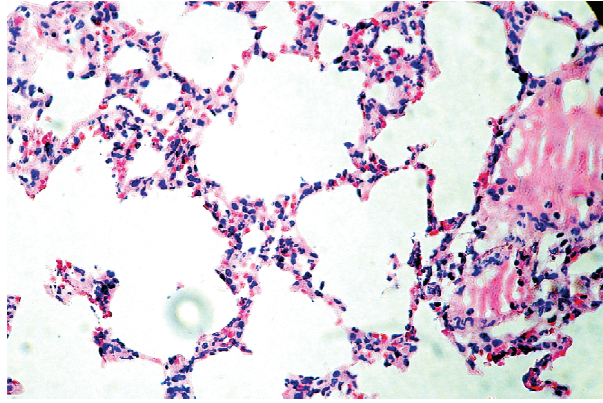


Figura 12 – Lâmina de pulmão apresentando agregados linfóides, septo espessado, tratado com *Hev b 13*.

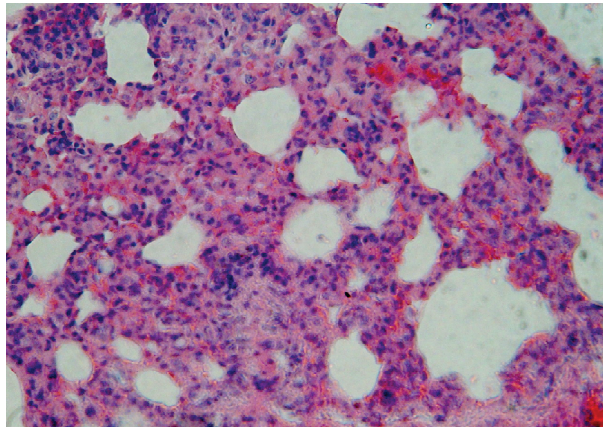


Figura 13 – Lâmina de pulmão apresentando agregados linfóides, septo intensamente espessado, tratado com SF09%.

Em relação aos ratos que foram tratados com *Hev b 13* (Figura 12) e com SF0,9%, (Figura 13) em ambos os grupos houve congestão vascular e principalmente alterações com espessamento septal e presença de matriz mixóide. Houve também hemorragia alveolar de maneira semelhante nos dois grupos. Embora ambos tenham apresentado todas as alterações, a intensidade do espessamento septal foi menor no grupo tratado com a *Hev b 13* em relação ao grupo controle.

6.4. Análise de IL-10

Na dosagem 0,5 mg/Kg de solução *Hev b 13* via subcutânea, observamos semelhança estatística pelo gráfico (Figura 14) dos animais que foram tratados com esta solução e os animais do grupo controle com 1 ml de SF0,9% ($p>0,05$). A comparação múltipla com nível de significância $p<0,05$, demonstra diferença entre o grupo controle normal e os demais grupos (cirurgia, controle com SF0,9% e *Hev b 13*). Apesar do grupo que recebeu tratamento com a solução apresentou maior concentração desta interleucina (11,3 pm/mg) .

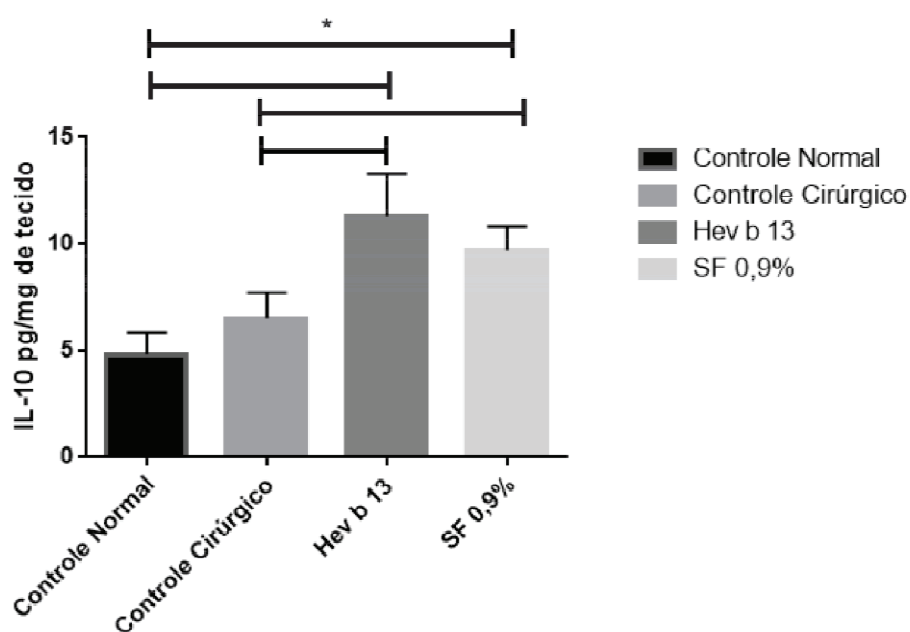


Figura 14 – Gráfico comparativo de IL-10 nos diferentes grupos.

Tratamento com células estromais de medula óssea (células tronco mesenquimais) em modelo de sepse experimental, demonstraram maior sobrevivência nos casos tratados com células tronco antes da indução da sepse ou até 1 hora após. Estes estudos sugerem que a melhora da sobrevivência se deve a modulação da resposta inflamatória mediada pela IL-10 derivada de

macrófagos e monócitos.

6.5. Análise de TNF

Observamos semelhança estatística pelo gráfico abaixo (Figura 15) dos animais que foram tratados com solução *Hev b 13* (5,24 pg/mg) e os animais do grupo controle com 1 ml de SF0,9% (4,77 pg/mg) ($p>0,05$). A comparação múltipla com nível de significância $p<0.05$, demonstra diferença entre o grupo controle normal e os demais grupos (cirurgia, controle com SF0,9% e *Hev b 13*).

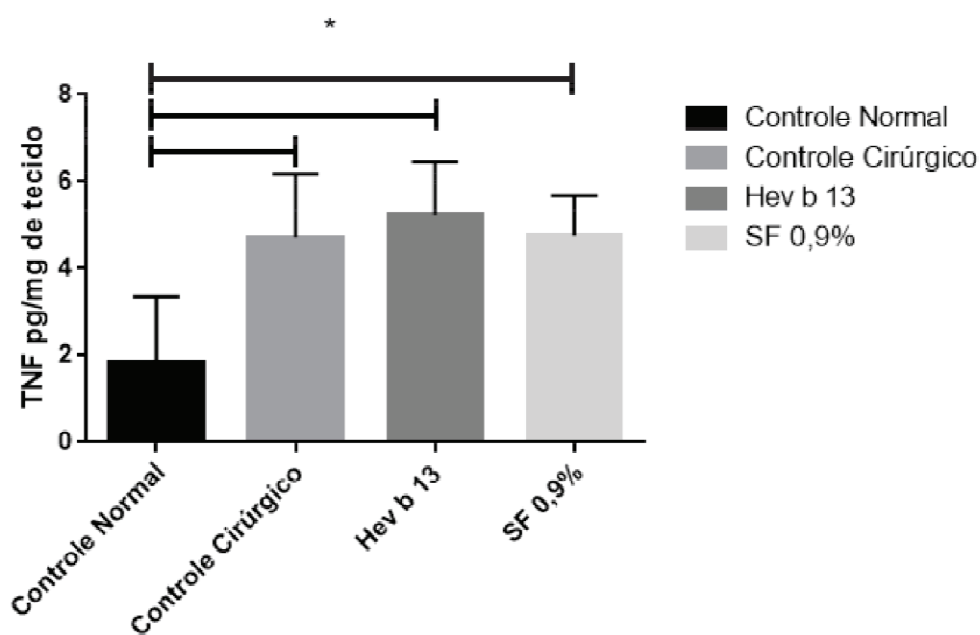


Figura 15 – Gráfico comparativo de TNF nos diferentes grupos.

Estudo prévio, demonstrou que a liberação de IL-10 é maior que de TNF pelos monócitos, demonstrando que a infraregulação deste último está relacionada ao aumento da primeira. As células endoteliais, linfócitos e macrófagos recebem estímulos microbianos gerando uma resposta

proinflamatória. Em defesa o organismo ativa a resposta anti-inflamatória com liberação de IL-4 e IL-10, levando a um estado hiperinflamatório (SFEIR, T, et al., 2011).

7. CONCLUSÃO

- O modelo experimental de síndrome de resposta inflamatória aguda, estabelecido com cepas de *Acinetobacter baumannii* de linhagem multirresistente, associado a agressão cirúrgica com múltiplas anastomoses abdominais confere alta letalidade;

- O modelo experimental de síndrome de resposta inflamatória aguda estabelecido com cepas de *Acinetobacter baumannii* de linhagem multirresistente, associado a agressão cirúrgica com múltiplas anastomoses abdominais é efetivo e seguro, podendo ser utilizado como indutor de resposta inflamatória aguda em animais.

- A solução *Hev b 13* administrada nas condições deste experimento, não foi capaz de diminuir a mortalidade;

- A solução *Hev b 13* administrada nas condições deste experimento, promoveu uma diminuição do espessamento do septo alveolar em relação ao grupo controle;

- A solução *Hev b 13* administrada nas condições deste experimento foi indutor de redução da proliferação de leucocitose e de linfócitos totais;

- A solução *Hev b 13* administrada nas condições deste experimento, promoveu o aumento dos níveis teciduais pulmonares de TNF- α e IL-10.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo proporcionou importantes informações sobre o efeito do uso de *Hev b 13*, derivado do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* na concentração de 0,5 mg/Kg, na concentração de leucócitos totais e linfócitos, como também sobre as concentrações de TNF e IL-10, de ratos com peritonite grave experimental. O efeito da redução da resposta celular sobre o tecido pulmonar foi a mais notória diferença histológica. Estudos adicionais *in vivo*, utilizando o modelo de peritonite induzido por cirurgia e cepas bacterianas multirresistentes associados ao tratamento com *Hev b 13*, em diferentes concentrações e vias de aplicação seriam relevantes para comparação de resultados, principalmente se associados a exames laboratoriais específicos do sistema imunológico.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM E, GLAUSER MP, BUTLER T, GARBINO J, GELMONT D, LATERRE PF, et al. p55 Tumor necrosis factor receptor fusion protein in the treatment of patients with severe sepsis and septic shock. A randomized controlled multicenter trial. **JAMA**; 277:1531-8, 1997.

ABRAHAM E, SINGER M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. **Crit Care Med**; 35(10):2408-16, 2007.

ADAMS, C.A., et al. Sepsis Biomarkers in Polytrauma Patients. **Critical Care Clinics**, 27 (2):345-354, 2011.

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

ARIYOSHI, H. et al. Expanded polytetrafluorethylene (ePTFE) vascular graft loses its thrombogenicity six months after implantation. **Thrombosis Research, Rochester**, v. 88, p. 427-433, 1997.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. **BioEstat: Aplicações estatísticas na área de ciências bio-médicas**. 4. ed. Sociedade Civil Mamirauá , 2007.

BLACKLEY, D. C. Polymers Latices. **Chapman & Hall: Glasgow**, v. 2, p. 138, 1997.

BALSINGER, J.; BAHDON, J.; WHITEMAN, A. Asia-Pacific forestry sector outlook study: the utilization, processing and demand for rubberwood as a

source of wood supply. **Roma: FAO**, 78 p., 2000.

BERNARD GR, VINCENT JL, LATERRE PF, LAROSA SP, DHAINAUT JF, LOPEZ-RODRIGUEZ A, et al. Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) Study Group. Efficacy and safety of recombinant human activated Protein C for severe sepsis. **N Engl J Med**; 344:699-709, 2001.

BLACKBURN SD, WHERRY EJ. IL10, T cell exhaustion and viral persistence. **Trends Microbiol**;15(4):143-6, 2007.

BONE RC. Immunologic Dissonance: A Continuing Evolution in Our Understanding of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) and the Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS). **Annals of Internal Medicine**. 125(8): 680-87, 1996.

BOZZA FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. **Crit Care**; 11(2):R49, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Brasília, DF: Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006.

CAMARGO, M. T. I. A. **Medicina popular**: aspectos metodológicos de pesquisa. São Paulo: Almed, 130p, 1985.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Eosinofilia reacional, leucemia eosinofílica crônica e síndrome hipereosinofílica idiopática. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 395-401, 2010.

CHOI, AHK; SLAMTI, L; AVCI, FYC; PIER, GB; MAIRA-LITRAN, T. The *pgaABCD* Locus of *Acinetobacter baumannii* Encodes the Production of Poly-β-

1-6-*N*-Acetylglucosamine, Which Is Critical for Biofilm Formation. **Journal of Bacteriology**, Vol. 191, No. 19 p. 5953–5963, Oct. 2009.

CLIFFORD, C. B.; GIKNIS, M. L. A. Clinical Laboratory Parameter for Crl:WI (Han), 2008. Disponível em:
http://www.criver.com/sitecollectiondocuments/rm_rm_r_wistar_han_clin_lab_parameters_08.pdf. Acesso em: 2 Abril. 2014.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **Fifteenth informational supplement, M100-S15**. Wayne, PA, 2005.

COHEN J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**. 420(6917):885-91, 2002.

DHAINAUT JF, TENAILLON A, HEMMER M, DAMAS P, LE TULZO Y, RADERMACHER P, et al. 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. **Crit Care Med**; 26:1963-71, 1988.

DE BACKER D, DONADELLO K, TACCONE FS, OSPINA-TASCON G, SALGADO D, VINCENT JL. Microcirculatory alterations: potential mechanisms and implications for therapy. **Ann Intensive Care**.1(1):27, 2011.

DE BORTOLI TEIXEIRA L, AGUILLAR EPIFÂNIO VL, LACHAT JJ, TIRABOSCHI FOSS N, COUTINHO-NETTO J. Oral treatment with Hev b 13 prevents experimental arthritis in mice. **Clin Exp Immunol**. Jun;168(3):285-90, 2012.

EVANS LT, KIM WR, POTERUCHA JJ, KAMATH PS. Spontaneous bacterial peritonitis in asymptomatic outpatients with cirrhotic ascites. **Hepatology**; 37(4):897-901, 2003.

FARNSWORTH, N. R. et al. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the Who**, Chicago, vol. 63, n. 6, p. 965-81, 1985.

FDA, Center for Drug Evaluation Research 2001 Meeting Documents. Disponível em: www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/cder01.htm#Anti-Infective, Acesso em: 20 Fev. 2014.

FIGUEIREDO, Deuseli Quaresma de et al . Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro , v. 45, n. 3, June 2009 .

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442009000300002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 28 Fev. 2014.

FELDMAN M, FRIEDMAN LS, SLEISENGER MH, eds. Sleisenger & Fordtran's **Gastrointestinal and Liver Disease**. Vol 2. 8th ed. Philadelphia, Pa: Saunders; 1935-64, 2006.

FIORENTINO DF, ZLOTNIK A, MOSMANN TR, HOWARD M. IL -10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J Immunol**;147 (11): 3815-22, 1991.

FRADE, A. A.; VALVERDE, R. V.; DE ASSIS, R. V.; COUTINHO-NETTO, J.; FOSS, N. T. Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. **Int. J. Dermatol.**, v. 40, p. 238-240, 2001.

FRADE, M.A.C. **Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico do reparo tecidual na presença da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis***. 2003. 164f. Tese (doutorado em medicina) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de S.o Paulo, Ribeirão Preto.

GADDY, JA; TOMARAS, AP; ACTIS, LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA Protein Plays a Role in Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the Interaction of This Pathogen with Eukaryotic Cells. **Infection and Immunity**, p. 3150–3160. Vol. 77, No. 8, Aug. 2009.

GARTNER, Leslie P.; HIATT, James L. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

GO J, CUNHA BA. *Acinetobacter baumannii*: Infection control implications. **Infect Dis Pract**; 23:65-68, 1999.

HECKSHER, C. A.; LACERDA, H. RAMOS.; MACIEL, M. A. Características e evolução dos pacientes tratados com drotrecogina alfa e outras intervenções da campanha "Sobrevivendo à Sepse" na prática clínica. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.20, n. 2, p. 135-143, 2008.

HOFER S, Brenner T, Bopp C, STEPPAN J, LICHTENSTERN C, WEITZ J, et al. Cell death serum biomarkers are early predictors for survival in severe septic patients with hepatic dysfunction. **Crit Care**, 13(3):R93, 2009.

HEINRICH, M.; GIBBONS, S. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Bethesda, v. 53, n. 4, p. 425-432, 2001.

HONG, L. T. Rubberwood utilization: a success story. In: WORLD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL UNION OF FORESTRY RESEARCH ORGANIZATIONS, 20., 1995, Tampere. Papers and Abstracts... Tampere: UFRO, 1995. p. 1-12,1995.

HORAN TC, GAYNES RP. Surveillance of nosocomial infections. In: Mayhall CG, ed. **Hospital epidemiology and infection control**. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 1659—702, 2004.

HOTCHKISS RS, KARL IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. **N Eng J Med**; 348:138-50, 2003.

ILAS, **Instituto Latino Americano da Sepse**, <http://www.sepsisnet.org/pg.php?v=dados-brasileiros>. Acesso em: 01 março 2014.

IYER, SHANKAR SUBRAMANIAN; CHENG, GENHONG. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. **Crit Rev Immunol** . 32(1): 23–63, 2012.

JAFFE EA, NACHMAN RL, BECKER CG, MINICK CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. **J Clin Invest**. Nov;52(11):2745-56, 1973. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4355998>, Acesso em: Nov 2013.

JUNQUEIRA, Luis Carlos U.; JUNQUEIRA, Luiza Maria M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos,1983.

KAK, VIVEK, et al. Mediators of Systemic Inflammatory Response Syndrome and the Role of Recombinant Activated Protein C in Sepsis Syndrome, **Infectious Disease Clinics of North America**, 25: 835-850, 2011.

KUNKEL SL, STRITER RM, CHENSUE SW, CAMPBELL DG, REMICK DG. The role of TNF in diverse pathologic processes. **Biotherapy**, 3:135-14, 1991.

KRISHNAGOPALAN S, DELLINGER RP. Innovative therapies for sepsis. **BioDrugs**;15:645-54, 2001.

LATA J, STIBUREK O, KOPACOVA M. Spontaneous bacterial peritonitis: a severe complication of liver cirrhosis. **World J Gastroenterol**;15(44):5505-10, 2009.

LEVY MM, FINK MP, MARSHALL JC, ABRAHAM E, ANGUS D, COOK D, et al. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Crit Care Med** ;31:1250-6, 2003.

LORENZI,H. Árvores brasileiras: **Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v.1, 3ª ed. Nova Odessa. Editora Plantarum, 352p, 2000.

MACEDO,R.L.G.; OLIVEIRA,T.K.; VENTURIN,N.; GOMES,J.E. Introdução de clones de seringueira no Nordeste do Estado de Minas Gerais. **Cerne**, v.8, n.1, p.124-133, 2002.

MACKAY F, LOESTER H, STUEBER D, GEHR G, LES-SLAUR W. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF recep-tor type, TNF-R55. **J Exp Med**.177:1277-1286, 1993.

MARCHAIM, D; NAVON-VENEZIA, S; SCHWARTZ, D; TARABEIA, J; FEFER, I; SCHWABER, MJ; CARMELI, Y. Surveillance Cultures and Duration of Carriage of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1551–1555. Vol. 45, No. 5, May 2007.

MARSHALL JC, VINCENT JL, et al. Measures, markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25–26, 2000. **Crit Care Med**, 31:1560-1567, 2003.

Metodos y Diagnosticos del Laboratorio Clinico. Editora Médica Panamericana, 8 Ed.,1983.

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 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

MOCELLIN S, PANELLI MC, WANG E, NAGORSEN D, MARINCOLA FM. The dual role of IL10. **Trends Immunol**;24(1):36-43, 2003.

MOORE KW, Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and interleukin -10 receptor. **Annu Rev Immunol**;19: 683-765, 2001.

MRUÉ,F.;COUTINHONETTO,J.;CENEVIVAA,R.;LACHATC,J.J.;THOMAZINIC, J.A.;TAMBELINID,H. Evaluation of The Biocompatibility of a New Biomembrane. **Materials Research**, São Carlos, v. 7, n. 2, p. 277-283. 2004.

MRUÉ, F. **Neoformação tecidual induzida por biomembrana de latex natural com polilisina. Aplicabilidade em neoformação esofágica e da parede abdominal.** Estudo experimental em cães. 2000. 112 f. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

MRUÉ, F. **Substituição do esôfago cervical por prótese bio sintética de látex – estudo experimental em cães.** 1996. 109 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

NATHENS AB, MARSHALL, JC. Sepsis, SIRS, and MODS: What's in a Name?. **World J Surg**; 20: 386-91, 1996.

NÉMETH, KRISZTIÁN, et.al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2—dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. **Nat Med**. January; 15(1): 42–49, 2009.

NOURI-MAJALAN N, NAJAFI I, SANADGOL H, GANJI MR, ATABAK S, HAKEMI M, et al. Description of an outbreak of acute sterile peritonitis in Iran. **Perit Dial Int**;30(1):19-22, 2010.

OPAL SM, FISHER CJ JR, DHAINAUT JFA, VINCENT JL, BRASE R, LOWRY SF, et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double blind, placebo-controlled, multicenter trial. **Crit Care Med**; 25:1115-24, 1997.

OPAL, STEVEN M. The Evolution of the Understanding of Sepsis, Infection, and the Host Response: A Brief History Review Article. **Crit Care Clin** 25: 637–663, 2009.

PAVLIDIS TE. Cellular changes in association with defense mechanisms in intra-abdominal sepsis. **Minerva Chir**;58(6):777-81, 2003.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and pharmacognosy. **Phytochemistry**,v. 68, n. 22-24, p. 2960-2972, 2007.

PINSKY MR, Vincent JL, DEVIERE J, Alegre M, KAHN RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. **Chest.** ;103(2):565-75, 1993.

POBER JS, BEVILACQUA MP, et al. Two distinct monokines, interleukin-1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. **J Immunol**;136: 1680-87, 1986.

RANIERI, V. M. et al. Drotrecogin Alfa (Activated) in Adults with Septic Shock. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 22, p.2055-2064, 2012.

RICEM GE, MUNRO JM, CORLESS C, BEVILACQUA MP. Vascular and nonvascular expression of INCAM-110: a target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissue. **Am J Pathol**;138: 385-93, 1991.

RIEDEMANN NC, GUO RF, WARD PA: The enigma of sepsis. **J Clin Invest**, 112:460-467, 2003.

RIPPEL, M. M. **Caracterização microestrutural de filmes e partículas de látex de borracha natural**. 2005. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências na área

de Físico-Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RIVERS E, NGUYEN B, HAVSTAD S, RESSLER J, MUZZIN A, KNOBLICH B, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. **N Engl J Med**;345:1368-77, 2001.

ROITT IM. Different CD4 T-cell subsets can make different cytokines patterns. In Roitt IM eds. **The essential immunology**, 9th ed. London, 184-200, 1997.

RUNYON BA. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis. **Hepatology**;39(3):841-56, 2004.

SALLES, M. J. C. et al. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepsis 3/4 revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 45, n. 1, Mar., 1999.

SANTOS, M. **A natureza do espaço**. São Paulo: EDUSP, 2006.

SITI ARIJA M., et.al. Hevea brasiliensis Latex 13: an Allergenic Lipolytic Esterase from Nodule-specific Protein Homologue (Hev b Isolation and Characterization of the Early Enzyme Catalysis and Regulation). **J. Biol. Chem.**, 279:23933-23941, 2004.

SCHMIDT, B.; RIBNICKY, D. M.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W. T.; RASKIN, I. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism**, v. 57, (Supl. 1-7): p. 3-9, 2008.

SFEIR, T, et al. Role of interleukin-10 in monocyte hyporesponsiveness associated with septic shock. **Crit. Care Med**; 29: 129-133, 2011.

SMITH, MG; GIANOULIS, TA; PUKATZKI, S; MEKALANOS, JJ; ORNSTON,LTN; GERSTEIN,M; SNYDER, M. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon metageneses. **Genes and development** 21:601–614, 2007.

SORIANO G, CASTELLOTE J, ALVAREZ C, et al. Secondary bacterial peritonitis in cirrhosis: a retrospective study of clinical and analytical characteristics, diagnosis and management. **J Hepatol**; 52(1):39-44, 2010.

SPITTLER A, SCHILLER C, WILHEIM M, TEMPFER C. IL10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4 driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis. **Immunology**;85(2):311-7, 1995.

LB TEIXEIRA, VL A. A. EPIFÂNIO, JJ LACHAT, N. T. FOSS AND J. COUTINHO-NETTO. Oral treatment with Hev b 13 ameliorates experimental colitis in mice. **Clin Exp Immunol**. Jul; 169(1): 27-32, 2012.

TARTAGLIA LA, AYRES TM, WONG GH, GOEDDEL DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. **Cell**. 74:845-853, 1993.

TRACEY KJ, CERAMI F. A tumor necrosis factor: an update review of its biology. **Crit Care Med**. 21:S415-422, 1993.

TSAKRIS A, PANTAZI A, POURNARAS S, MANIATIS A, POLYZOU A, SOFIANOU D: Pseudo-outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* resulting from false susceptibility testing by a rapid automated system. **J Clin Microbiol**, 38(9):3505-7, 2000.

Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87420/?tool=pubmed>. Acesso em: 22 Fev. 2014.

TUBAU F, LIÑARES J, RODRÍGUEZ MD, CERCENADO E, ALDEA MJ, GONZÁLEZ-ROMO F, et al. Susceptibility to tigecycline of isolates from samples collected in hospitalized patients with secondary peritonitis undergoing surgery. **Diagn Microbiol Infect Dis**;66(3):308-13., 2010.

WICHTERMAN, Keith A. Sepsis and septic shock - A review of laboratory models and a proposal. **J Sur Res**; 29:189-201, 1980.

WHITESIDE, O. J.; TYTHERLEIGH, M. G.; THRUSH. S.; FAROUK. R.; GALLAND, R. B. Intraoperative peritoneal lavage - who does it and why? **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, v. 87, n. 4, p. 225-228, 2005.

ULLOA L, TRACEY KJ: The 'cytokine profile': a code for sepsis. **Trends Mol Med**, 11:56-63, 2005.

URBAN C, MAURER-SEGAL, RAHAL JJ. Considerations in control and transmission of nosocomial infections due to multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Clin Infect Dis**;36:1268—74, 2003.

URIARTE, A. C.; LASHERAS, P. I.; MARTIN, J. L. M. et al. Effect of povidone iodine and chlorhexidine on the mortality and bacterial clearance in the abdominal cavity of peritonitis rats. **The European Journal of Surgery**, v. 157, n. 6-7, p. 393-395, 1991.

VEDDER NB, WINN RK, RICE CL, et al. Inhibition of leukocyte adherence by anti CD 18 monoclonal antibody attenuates reperfusion injury in the rabbit ear. **Proc Natl Acad Sci USA**; 87: 2643-46, 1990.

ZENI F, FREEMAN B, NATANSON C. Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment. **Crit Care Med**. 25:1095-1100, 1997.