

**Maria Taciana Ralph**

Análise funcional da fração proteica P1G10 extraída do fluído laticífero de *Carica candamarcencis* aplicada ao controle de infecção experimental por *Salmonella enterica* Sor. Typhimurium

**RECIFE**

**2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**Maria Taciana Ralph**

Análise funcional fração proteica P1G10 extraída do fluído laticífero de *Carica candamarcencis* aplicada ao controle de infecção experimental por *Salmonella enterica* Sor. Typhimurium

Dissertação submetida ao programa de Pós Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. Área de Biotecnologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Salas

**RECIFE**

**2013**

## **Maria Taciana Ralph**

Análise funcional fração proteica P1G10 extraída do fluído laticífero de *Carica candamarcencis* aplicada ao controle de infecção experimental por *Salmonella enterica* Sor. Typhimurium

Dissertação submetida ao programa de Pós Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. Área de Biotecnologia.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2013

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho.  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Orientador

---

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Examinador

---

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Examinador

---

Prof.Dr. Mario Ribeiro de Melo Junior  
Universidade Federal de Pernambuco  
Examinador

---

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho  
Universidade Federal de Pernambuco  
Suplente

Dedico...

**Aos meus Pais e à Minha Irmã,**

Por todo amor e apoio incondicional

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus, por ter permitido que toda essa conquista se tornasse possível, por todas as bênçãos, enfim, “Para Ele são todas as coisas”.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, ao Departamento de Biologia e ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, por todas as oportunidades fornecidas.

Ao meu orientador José Vitor Moreira Lima Filho, por todos os ensinamentos e por toda dedicação para realização de mais este trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Carlos Salas e a todos os integrantes do laboratório de Bioquímica e Imunologia/ UFMG, pelo fornecimento das proteínas utilizadas neste trabalho.

Aos professores participantes da banca, por disponibilizarem parte do seu tempo para contribuir para melhoria deste trabalho.

À todos os integrantes do Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA/UFRPE, em especial ao Prof Paulo Eleutério pela ajuda e paciência, a Profa. Maria de Mascena, Prof. Martim Montes, Sérgio e Mayara por todos os ensinamentos.

Ao Prof. Manoel Adrião e todos os integrantes do Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada/UFRPE, em especial Carliane e Diogo, pela ajuda na realização dos experimentos.

Aos professores Joaquim Evêncio e Antônio Pedro e a todos os integrantes do Laboratório de Histologia/UFRPE, pela ajuda na realização das análises histopatológicas.

Ao professor Márcio Ramos e aos integrantes do Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais/UFC por ter-nos cedido espaço físico e parte dos animais utilizados nesta pesquisa. Agradecendo de forma especial à Ayrles Fernanda, por ter abraçado a realização deste projeto.

Ao departamento de Medicina Veterinária, pelo fornecimento de amostras de sangue de ovinos utilizado neste trabalho.

A todos os amigos do laboratório de Microbiologia e Imunologia/UFRPE, Jacqueline, Nelito e Gisnaye e em especial à Renata, Dani, Daiane, Cynthia e Camilly. À todos muito obrigada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes - pelo subsídio financeiro na forma de bolsas de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico e Inovação - CNPq – pelo apoio financeiro (Edital Transversal Semiárido/ 2010).

Aos amigos feitos durante as aulas do mestrado.

À minha mãe Maria Lucia, ao meu pai João Ralph, à minha irmã Lidiana Nayara e ao meu namorado Heitor Duarte pelo apoio e amor incondicional sempre.

À todos que me ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

## RESUMO

*Carica candamarcensis* é uma planta pertencente à família Caricaceae, cujo látex possui proteínas com importantes atividades biológicas descritas. A fração proteica P1G10, obtida por cromatografia de gel-filtração a partir do conjunto de proteínas desse látex, já foi relatada por suas atividades mitogênica, angiogênica e gastroprotetora. No presente estudo, um modelo de infecção sistêmica experimental, causada por *Salmonella enterica* Sor. Typhimurium, em camundongos, foi utilizado para avaliar o potencial de P1G10 no controle da infecção e inflamação decorrente. Os animais receberam P1G10 (1, 5 ou 10 mg/ Kg), ou solução salina tamponada (PBS), via intraperitoneal, 24 horas antes da infecção por *Salmonella* Typhimurium (0,2 mL;  $10^7$  UFC/ mL). A taxa de sobrevivência dos animais pré-tratados com 10 mg/ Kg de P1G10 atingiu 60% após 7 dias da infecção, ao passo que o grupo controle sucumbiu por inteiro até o terceiro dia após o desafio infeccioso. As análises histológicas dos fígados e baços dos animais experimentais, após 72 horas de infecção, mostraram células mais preservadas em relação ao grupo controle. Apesar do menor número de bactérias no fígado, P1G10 não estimulou o clareamento bacteriano no baço, fluido peritoneal e sangue dos animais após a infecção e não demonstrou atividade antibacteriana *in vitro* contra *S. Typhimurium* na dosagem máxima de 1 mg/ ml. Após 72h de infecção, houve maior migração de leucócitos para a cavidade peritoneal dos animais experimentais, porém não houve diferença significativa na quantidade de leucócitos no sangue ou na produção de óxido nítrico entre os animais controle e experimentais. A avaliação da expressão gênica de citocinas, por RT-PCR Tempo Real, demonstrou que ocorreu diminuição relativa na produção de transcritos de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no fígado dos animais experimentais em relação ao grupo controle e que IL-10 não foi expresso por nenhum dos grupos. Para melhor compreensão do efeito das proteínas presentes em P1G10 sobre a resposta inflamatória foi utilizado um modelo de peritonite, em camundongos, induzida pelo agente flogístico carragenina. Foi observado que quando administrada por via intraperitoneal a fração proteica P1G10 potencializa o efeito pró-inflamatório desenvolvido pelo agente flogístico, por outro lado, um efeito anti-inflamatório é desencadeado quando P1G10 foi administrado via endovenosa. Tal efeito parece estar relacionado à inibição da cascata do sistema complemento, uma vez que a exposição de P1G10 ao soro humano e ovino, inibiu a lise de

*Escherichia coli in vitro*, nas concentrações de 5 e 10 mg/ mL, o mesmo não foi observado quando as proteínas presentes em P1G10 foram desnaturadas pelo calor, sugerindo que a ação anti-complemento seja devido a intensa atividade proteolítica presente nesta fração proteica. Conclui-se que, P1G10 possui potencial anti-inflamatório, além de estimular a migração de leucócitos para o foco infeccioso e diminuir relativamente a expressão das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  evitando assim o choque séptico nos animais pré-tratados, desta forma, P1G10 capaz de aumentar a sobrevivência de animais infectados por *S. Typhimurium*.

Keywords: Inflamação. *Salmonella Typhimurium*. Proteínas laticíferas.



## ABSTRACT

*Carica Carica candamarcensis* is a plant belonging to the family Caricaceae, which has latex proteins with important biological activities described. The P1G10 protein fraction obtained by gel-filtration chromatography from the set of proteins that latex has been reported by their mitogenic, angiogenic and gastroprotective. In this study, a model of experimental systemic infection caused by *Salmonella enterica* Ser. Typhimurium in mice was used to evaluate the potential of P1G10 in the control of infection and inflammation caused. The animals received P1G10 (1, 5 or 10 mg / kg) or buffered saline (PBS) intraperitoneally 24 hours prior to infection with *Salmonella typhimurium* (0,2 ml, 10<sup>7</sup> CFU / ml). The survival rate of the animals pretreated with 10 mg / kg P1G10 reached 60% after 7 days of infection, while the entire control group succumbed to the third day after challenge infection. Histological analysis of the livers and spleens of experimental animals after 72 hours of infection, showed cells more preserved in the control group. Despite the low number of bacteria in the liver, P1G10 did not stimulate bacterial clearance in the spleen, peritoneal fluid and blood of animals after infection and did not demonstrate in vitro antibacterial activity against *S. Typhimurium* at the maximum dosage of 1 mg / ml. After 72 h of infection, there was a higher leukocyte migration into the peritoneal cavity of experimental animals, but there was no significant difference in the number of leukocytes in the blood or in the production of nitric oxide between the control and experimental animals. The evaluation of cytokine gene expression by RT-PCR Real Time, showed that there was a relative decrease in the production of transcripts of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the liver of experimental animals in the control group and IL-10 was not expressed by any of the groups. To better understand the effect of the proteins present in P1G10 on the inflammatory response, we used a model of peritonitis in mice induced by phlogistic agent carrageenan. It was observed that when administered intraperitoneally to P1G10 protein fraction enhances the pro-inflammatory effect developed by the phlogistic agent, on the other hand, an anti-inflammatory effect is triggered when P1G10 was administered intravenously. This effect seems to be related to inhibition of the complement cascade, since the exposure of P1G10 human serum and sheep inhibited the lysis of *Escherichia coli* in vitro at concentrations of 5 and 10 mg / mL, it was not observed when proteins present in P1G10 were denatured by heat, suggesting that the anti-complement action is due to intense

proteolytic activity present in this protein fraction. It is concluded that, P1G10 has anti-inflammatory potential and stimulates the migration of leukocytes to the infection and relatively decreases the expression of inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  thus preventing septic shock in the animals pretreated in this form, P1G10 capable of increasing the survival of animals infected with *S. Typhimurium*.

Keywords: Inflammation. *Salmonella* Typhimurium. Laticifer proteins.

# SUMÁRIO

## CAPÍTULO I

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>16</b>
2.1 Látex e plantas laticíferas	16
2.2 <i>Carica candamarcensis</i> : propriedades gerais	17
2.3 Plantas como fonte de moléculas imunomoduladoras	19
2.4 Infecções sistêmicas: Características gerais	21
2.5 <i>Salmonella enterica</i> Sor. Typhimurium como modelo de infecção sistêmica experimental	22
2.6 Papel do sistema complemento em infecções sistêmicas	26
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>31</b>

## CAPÍTULO II

Artigo – Fração proteica P1G10 do látex de <i>Carica candamarcensis</i> aumenta a sobrevivência de camundongos Swiss infectados com <i>Salmonella enterica</i> Ser. Typhimurium	<b>40</b>
<b>Resumo</b>	<b>41</b>
<b>Introdução</b>	<b>42</b>
<b>Métodos</b>	<b>43</b>
Proteínas laticíferas de <i>C. candamarcensis</i>	43
Micro-organismo	43
Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	43

Animal	44
Desing experimental	44
<i>Análise histopatológica</i>	45
<i>Avaliação da depuração bacteriana</i>	45
<i>Contagem total e diferencial de leucócitos</i>	45
<i>Análise da expressão gênica de citocinas</i>	46
<i>Quantificação do óxido nítrico no soro dos animais</i>	46
<i>Influência de P1G10 sobre a migração de leucócitos no modelo de inflamação por peritonite</i>	47
<i>Influência de PIG10 sobre a ativação do sistema complemento</i>	47
Análises estatística	47
<b>Resultados</b>	<b>48</b>
<b>Discussão</b>	<b>49</b>
<b>Conclusão</b>	<b>51</b>
<b>Agradecimentos</b>	<b>52</b>
<b>Referências</b>	<b>53</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>56</b>

Anexo I- Protein fraction P1G10 from latex of *Carica candamarcensis* increases survival of Swiss mice infected with *Salmonella enterica* Ser. Typhimurium **63**

AnexoII – Guia do Autor da Revista: Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Qualis A2 na Medicina Veterinária **82**

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1. *Carica candamarcensis* \_\_\_\_\_ 17

### CAPÍTULO II

Figura 1. Sobrevivência de animais pré-tratados com P1G10 e infectados com *Salmonella* Typhimurium. Os grupos experimentais foram tratados com 1 mg / kg (quadrado preto), 5 mg / kg (triângulo preto) ou 10 mg / kg (círculo preto) de P1G10 por via intraperitoneal. O grupo controle recebeu PBS (círculos brancos). (a) Sobrevivência dos animais foi observado durante sete dias após a infecção por *Salmonella*; (b) Contagens totais de leucócitos no fluido peritoneal de animais previamente tratados com P1G10 e infectadas com *Salmonella* typhimurium. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM e a comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. O intervalo de confiança foi determinado com  $p < 0,05$ . \* Diferença significativa entre P1G10 e grupos PBS. \_\_\_\_\_ 58

Figura 2. Padrão histológico do fígado e do baço de camundongos pré-tratados com P1G10 72 horas após a infecção por *Salmonella* Typhimurium. (a) Fígado de camundongo no grupo PBS, mostrando severa vacuolização, necrose individual de hepatócitos com distribuição difusa (seta fina) e trombose (estrela); (b) Fígado de camundongo no grupo experimental (P1G10, 10 mg /kg) , demonstrando necrose hepática (seta fina) e acúmulo de células mononucleares (seta larga); (c) Baço de camundongo do grupo controle, mostrando depleção linfóide (seta fina) e a presença de células gigantes (seta larga); (d) Baço de camundongos no grupo experimental com aparência preservada da polpa branca e polpa vermelha. \_\_\_\_\_ 59

Figura 3. Contagens totais de leucócitos no fluido peritoneal de camundongos suíços pré-tratados com P1G10 no modelo de peritonite induzido por carragenina. Os camundongos foram tratados com 1, 5, 10 mg / kg de P1G10, intravenosamente ou

intraperitonealmente, e 30 minutos mais tarde receberam 500 mg de carragenina por via intraperitoneal. Os grupos controle receberam PBS. A migração de leucócitos para dentro da cavidade peritoneal de todos os grupos de animais foi avaliada 6 horas após a administração do agente flogístico. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM e comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. O intervalo de confiança foi determinado com  $p < 0,05$ . \* Diferença significativa entre P1G10 e grupos PBS.

60

Figura 4. Atividade anti-complemento *in vitro* de P1G10. O soro humano (a) ou soro de ovelha (b) foram pré-tratados com P1G10, em concentrações de 1 mg / mL (triângulo preto), 5 mg / mL (quadrado preto), 10 mg / mL (círculos pretos) ou de 10 mg / mL de calor desnatura P1G10 (100 ° C/30 min) (triângulo branco), e depois foram expostos a uma cultura de *Escherichia coli*. Os grupos de controle foram formados por soro ativos (quadrado vazio) ou soro inativado pelo calor (círculo branco) desprovidos de P1G10. O número de unidades formadoras de colônias foi quantificado em horários predeterminados.

61

Figura 5 Liberação de óxido nítrico e os resultados comparativos de PCR em tempo real expressos em vezes de aumento, para o TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  nas células do fígado de camundongos pré-tratados com P1G10 e infectadas com *Salmonella typhimurium*. Os grupos experimentais foram tratados com 10 mg / kg de P1G10 enuqnato os grupos controle receberam PBS 24 horas antes do desafio com *Salmonella Typhimurium* ( $10^7$  CFU / mL). (a) Expressão gênica de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  relativas a camundongos do grupo controle. (B) Resultados da produção de óxido nítrico foram expressos como média  $\pm$  EPM e a comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. O intervalo de confiança foi determinado com  $p < 0,05$ .

62

## CAPITULO I

### 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais no mundo, especialmente na América do Sul, muitas vezes é reconhecido como a única forma de tratamento de doenças e manutenção da saúde, principalmente nas comunidades de baixa renda. Essas plantas vêm sendo bastante estudadas e o interesse da comunidade científica por elas é crescente. Isso devido à descoberta de moléculas ativas nestes vegetais e a possível transformação das mesmas em compostos biológicos e em sua utilização na síntese de medicamentos. Contudo, apesar do vasto conhecimento empírico e científico sobre tais moléculas, somente uma pequena parte destes derivados vegetais foram investigados em estudos aprofundados e sequenciais, que conduziram a geração de produtos comerciais.

Grande parte dessas plantas de interesse farmacológico estão entre as aproximadamente 12.500 espécies de plantas laticíferas como é o caso da *Carica candamarcensis*, conhecida popularmente como mamão da montanha. O látex dessa planta é rico em proteinases e supõe-se que a função biológica dessas proteínas seja a de fornecer proteção ou promover a cicatrização do fruto após injúrias. Isso porque o processo de cicatrização da planta se dá devido à formação de um coágulo de látex no ferimento. Neste processo de natureza sequencial, essas proteinases são ativadas anteriormente à formação do coágulo.

Tendo em vista a atividade biológica de proteínas laticíferas de *C. candamarcensis* no vegetal, o seu potencial farmacológico tem sido avaliado por diferentes grupos de pesquisa. Particularmente, a separação cromatográfica de extratos proteicos possibilitou o isolamento de duas frações com elevada atividade proteolítica (P1G10 e P2G10). Estas frações apresentaram potente atividade mitogênica, sendo P1G10 a fração com maior poder proteolítico (SILVA et al., 2003). As proteínas presentes em P1G10, também apresentaram efeito anti-tumoral e angiogênico, além de um alto potencial cicatrizante de lesões dérmicas e

queimaduras experimentais induzidas em camundongos (MELLO et al., 2006, MELLO et al., 2008, GOMES et al, 2010) P1G10 também foi capaz de reduzir o índice de ulceração induzida em camundongos em até 62%, mostando-se assim, como um potencial agente gastroprotetor (MELLO et al., 2008).

No entanto, apesar do grande interesse existente nas propriedades farmacológicas das proteínas laticíferas de *C. candamarcencis*, o conhecimento sobre possíveis ações biológicas antimicrobianas e imunoreguladoras ainda é bastante incipiente. Tais descobertas poderiam ser de extrema importância à saúde humana e animal, contribuindo com a possibilidade de novos tratamentos para condições patológicas diversas e infecções graves. Neste sentido, e considerando outros resultados com proteínas laticíferas, neste projeto um modelo de infecção sistêmica por bactérias Gram-negativas, causada por *Salmonella enterica* Sor. Typhimurium em camundongos foi utilizado para avaliar o potencial de proteínas laticíferas de *C. candamarcencis* no controle da infecção e inflamação decorrente.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Látex e plantas laticíferas

Cerca de 6% de todas as espécies de plantas vasculares são reconhecidas como laticíferas. Essas plantas possuem um sistema de canais pressurizados a partir do qual o látex é produzido, acumulado e exalado e muitas delas são reportadas por possuírem relevantes atividades biológicas (RAMOS et al., 2006; FREITAS et al., 2010) como anti-helmíntica, anti-inflamatória, pro-inflamatória (RAMOS et al., 2009; BUTTLE et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012), além da aplicação como inseticidas (KONNO et al., 2006).

Entende-se por látex, um fluido geralmente de aspecto leitoso, que é liberado por plantas que sofrem ferimentos por danos mecânicos ou por animais, sendo o mesmo constituído de componentes celulares, carboidratos, lipídeos, proteínas, além de metabólitos secundários (KEKWICK, 2001; MORECELLE et al., 2004; AGRAWAL, KONNO, 2009). Estudos ecofisiológicos têm mostrado que o látex e seus associados metabólitos são vitais para defesa da planta contra predadores como insetos, bactérias e fungos além de terem importância tradicional e contemporânea como toxinas e bioprodutos valiosos (HAGEL et al., 2008).

Vários estudos têm mostrado a utilização do látex para fins medicinais, dentre esses, podemos citar a utilização do látex da espécie *Ficus pumita* no tratamento de verrugas e como possuidor de atividade anti-helmíntica, o que se dá devido a uma enzima de baixa toxicidade para mamíferos, a ficina (GAUGHRAN, 1976; PERELLÓ et al., 2000). Além deste, segundo Silva Junior (2009), o látex da espécie *Croton urucurana* apresenta intensa atividade antimicrobiana. Já o látex de *Jatropha mollissima* foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, enquanto que *Salmonella typhi* foi inibida pelo látex de *Jatropha gossypifolia* (ROCHA et al., 2009). No centro-oeste brasileiro, por exemplo, o látex de *Synadenium umbellatum* é utilizado empiricamente no combate a várias enfermidades, tais como, alergia, câncer, doença de Chagas, diabetes, gripe, hemorragias internas, impotência sexual, lepra, obesidade, úlcera nervosa, cólicas menstruais e dores no corpo ao câncer

(ORTÊNCIO, 1997). Em se tratando de animais ruminantes, Buttle e colaboradores (2011), constataram que proteinases cisteínicas derivadas do látex de *Carica papaya* apresentaram interessante atividade anti-helmíntica contra *Haemonchus contortus* em carneiros.

Por outro lado, o látex de determinadas plantas pode ter um efeito bastante nocivo. O látex da *Euphorbia millis* provoca casos freqüentes de intoxicação quando em contato com a pele e mucosas causando uma condição inflamatória. Em contato com os olhos, pode levar ao desenvolvimento de conjuntivites e queratites (OLIVEIRA et al., 2003). Segundo Allarcon et al. (2003) e Yeang et al. (2002), as proteínas presentes no látex da planta *Hevea brasiliensis*, a seringueira, podem ser os principais agentes causadores de alergia devido a utilização de produtos produzidos a partir do látex.

Outra planta laticífera que vem sendo estudada é a *Carica candamarcensis*, que tem mostrado interessantes propriedades farmacológicas que serão discutidas a seguir.

## 2.2 *Carica candamarcensis*: propriedades gerais

A *Carica candamarcensis* é uma planta nativa da região oeste da América do Sul, pertencente à família Caricaceae e conhecida popularmente como mamão da montanha ou babaco. Ela pode alcançar até 10 metros de altura e caracteriza-se por um tronco grosso, mais largo na base e frequentemente ramificado. As folhas são de formas variáveis, com 5 a 7 lóbulos recortados. O fruto da *C. candamarcensis* é elipsoidal ou oval, apresenta cinco sulcos e é de coloração amarela quando maduro (LEON, 2000; LORENZI, 2000).

Figura1 - *Carica candamarcensis*



Seus canais laticíferos estão presentes na região cortical do tronco, nas folhas, e mais abundantemente nas camadas mais externas do endocarpo, principalmente dos frutos imaturos (WALRAEVENS et al., 1999). Tal fluido possui altos níveis de carboidratos, vitaminas, sais minerais e proteínas (BAEZA et al., 1990).

Muitos estudos têm comprovado as ações biológicas de *Carica candamarcensis*, principalmente de frações proteicas derivadas do seu látex.

Silva et al. (2003), através de separação cromatográfica do látex em coluna Sephadex G10, obtiveram dois picos de frações proteicas bem definidos, denominados P1G10 e P2G10, sendo o primeiro rico em proteinases. Neste mesmo trabalho, os autores comprovaram a atividade mitogênica de ambas as frações, no entanto, a grande quantidade de proteinase contidas em P1G10 pode ter danificado a cultura de células do ensaio. Em estudo posterior, duas proteinases obtidas após etapas de purificação cromatográfica a partir de P1G10 também apresentaram atividade mitogênica em fibroblastos e células epiteliais (GOMES et al., 2005).

A fração P1G10 também foi avaliada em relação à sua atividade anti-ulcerogênica, a partir dos seus efeitos de proteção e cicatrização gástrica (MELLO et al., 2008). Para avaliação da atividade gastroprotetora, lesões gástricas foram induzidas pela administração subcutânea de 50 mg / kg de indometacina em ratos Wistar, já o tratamento oral com P1G10 dissolvida em água destilada, foi administrado 30 min antes da indometacina e repetido após 3 horas da indução. Os resultados mostraram que as doses entre 0,1 e 10 mg/Kg de P1G10 diminuíram significativamente o número de úlceras gástricas em relação ao controle (MELLO et al., 2008).

Mello e colaboradores (2008), também avaliaram o efeito cicatrizante do P1G10 mediante lesões gástricas induzidas pela injeção sub-serosa de ácido acético 10%, seguido pela administração oral diária de P1G10 durante 8 dias. Os resultados mostram uma redução significativa (60%) do número de úlceras para dose de 10 mg / kg, enquanto doses inferiores (1-0,1 mg / kg) não tiveram efeito significativo. Este efeito parece ser mediado pela estimulação da angiogênese em 64%, etapa indispensável no processo de cicatrização (MELLO et al., 2008). Surge então a hipótese de que a propriedade de cura de P1G10 está ligada a um efeito proliferativo mostrado anteriormente em culturas celulares (SILVA et al., 2003).

Mello e colaboradores (2006), avaliaram o efeito cicatrizante de P1G10 sobre abrasões dérmicas induzidas por fricção de uma lixa na pele de camundongos *Mus musculos Hairless*. Os animais foram tratados com a fração protéica durante nove dias e apresentaram taxa de recuperação seis vezes mais rápida (MELLO et al., 2006). Ademais, constatou-se que a fração P1G10, em outro modelo de lesão cutânea, promovido por queimadura após exposição da pele de camundongos *Hairless* à água quente, reduziu o tempo de reepitelização da área lesionada quando aplicado na concentração de 0,1% em creme Polawax®. As análises histopatológicas desde estudo confirmam a melhoria na recuperação de queimaduras dos animais tratados com P1G10, evidenciado pela diminuição dos infiltrados inflamatórios e pela maior organização das fibras colágenas na área lesionada. A hipótese dos autores é de que a contribuição da cura mais eficiente por P1G10 seja devido ao seu efeito mitogênico e angiogênico anteriormente observado (SILVA et al., 2003; MELLO et al., 2008; GOMES et al., 2010).

Contudo, apesar do vasto conhecimento sobre os efeitos biológicos da *C. candamarcensis*, pouco se sabe a respeito de uma possível propriedade imunomoduladora e antimicrobiana.

### 2.3 Plantas como fonte de moléculas imunomoduladoras

Antibióticos tradicionais estão se tornando cada vez mais ineficientes tendo em vista o desenvolvimento de estirpes bacterianas mais resistentes, assim, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias para o combate de infecções (NICHOLLS et al., 2010). Uma nova alternativa seria o uso de imunomoduladores, substâncias que atuam estimulando ou reprimindo o sistema imune, podendo conferir um aumento da resposta imunológica contra micro-organismos (MEGID et al., 1998; DUTTA, 2002) . Ao contrário dos antibióticos, os imunomoduladores podem melhorar um sistema previamente concebido para ter um amplo espectro de ação antimicrobiana, além disso, a utilização de um sistema com múltiplos mecanismos de ação minimiza o desenvolvimento de estirpes resistentes (NICHOLLS et al., 2010).

A origem dos imunomoduladores é bastante diversa, podendo incluir substâncias farmacológicas sintéticas, produtos microbianos e derivados de plantas medicinais (BLECHA, 2001). Com a descoberta dos mesmos, tornou-se possível a manipulação do sistema imune em busca de um estado saudável, na tentativa de reduzir os efeitos associados à quimioterapia, à rejeição de enxertos, às doenças alérgicas, doenças cancerígenas, infecções graves dentre outras (DUTTA, 2002).

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de investigar ação imunomoduladora de diversas substâncias. O Imiquimod, uma amina imidazoquinolina [1-(2 metilpropil)-1 H-imidazol (4,5-c) quinolina-4 amina] (NETO e ARIAS, 2006), por exemplo, é capaz de potencializar a resposta imunológica ao Papiloma Vírus Humano (HPV), induzindo a síntese de interferon-alfa e citocinas (LOPES-PAULO, 2005). Segundo Santa (2006), o micélio de *Agaricus brasilienses*, induziu a redução de sarcoma 180, devido a uma redução do fator de necrose tumoral, células B e NK e a um aumento de interleucina 6 e de células T citotóxicas. Alguns imunomoduladores também são utilizados na terapêutica de animais domésticos como o *Propionibacterium acnes*, BCG, Interferon, CpGODN, DHEA, PIND-ORF e Acemanana, utilizados principalmente com o intuito de potencializar a resposta imune levando à um aumento da resistência a infecções e no tratamento de doenças imunossupressoras ou ainda de caráter multifatorial (CASTRUCCI et al., 1994, TIZARD, 2002).

Uma variedade de substâncias, como polissacarídeos, lectinas, peptídeos, saponinas, óleos e outras, oriundas de plantas são capazes de estimular o sistema imune, apresentando atividade imunomoduladora (NUNES-PINHEIRO et al., 2003). Plantas medicinais como *Orbignya phalerata* (SILVA; PARENTE, 2001), *Cedrus deodora* (SHINDE et al., 1999), *Psoralea corylifolia* (LATHA et al., 2000), *Boerhaavia diffusa* (MEHROTRA et al., 2002), *Cassia occidentalis* (BIN-HAFEEZ et al., 2001), *Alternanthera brasiliana* (BROCHADO et al., 2003), *Trichilia glabra* (BENENCIA et al., 2000) dentre muitas outras, tiveram sua atividade imunomoduladora comprovada.

Agentes imunomoduladores avaliados por estudos *in vitro*, *in vivo* e em ensaios clínicos, podem aumentar a estimulação de macrófagos, ativar o sistema complemento, promover a formação de anticorpos, aumentar a proliferação de linfócitos T e modular a secreção de citocinas, podendo por outro lado agir como

imunossupressores. Alguns deles já estão sendo usados clinicamente para artrite reumatoide, lúpus eritematoso e várias outras doenças inflamatórias e infecciosas (BENENCIA et al., 2000; DAVIS, KUTTAN, 2000; PLAEGER, 2003; BIELLA, 2007).

Um grande obstáculo ao uso de imunomoduladores é o desafio de manipular uma resposta sistêmica contra infecções, com o mínimo de efeitos tóxicos para o hospedeiro e o máximo de eficácia anti-infecciosa (NICHOLLS et al., 2010). Desta forma, torna-se necessária a avaliação da segurança e eficácia de novas drogas e medicamentos fitoterápicos, bem como de outros compostos botânicos, através de ensaios pré-clínicos para avaliação de possíveis efeitos imunomoduladores e imunotóxicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998; PUTMAN et al., 2002), bem como a busca de novas substâncias que possam servir como base no desenvolvimento de novos medicamentos.

#### 2.4 Infecções sistêmicas: características gerais

Durante uma infecção, as endotoxinas e bactérias Gram-negativas ativam células específicas no organismo hospedeiro, como, por exemplo, os macrófagos, induzindo-as a secretar moléculas mediadoras da resposta inflamatória. Desta forma, quando uma bactéria penetra o tecido e libera quantidade moderada de endotoxina, a formação de produtos de defesa dos macrófagos pode ajudar a erradicar a infecção (FRACASSO, 2008). No entanto, algumas vezes as bactérias invadem a corrente circulatória onde se multiplicam e acumulam grande quantidade de endotoxinas no sangue, induzindo macrófagos por todo o organismo. Assim, há uma liberação maciça de mediadores que dão início a hipotensão, hipóxia tissular e morte, caracterizando o choque séptico (RICTSCHEL; BRADE, 1992; TITHERADGE, 1999).

Anualmente ocorrem aproximadamente 18 milhões de casos de sepse grave em todo o mundo, chegando a mais de 200 mil óbitos (WENZEL, 2002; RICHTIRSCH et al., 2007). Entende-se por sepse a existência de uma resposta inflamatória sistêmica desencadeada pela presença de um foco infeccioso causado por bactérias, fungos ou vírus e que está comumente associada a injúria tissular, vasodilatação e acúmulo de leucócitos (ANGUS et al., 2001 ; O'BRIEN JR. et al., 2007) . Apesar de ter ocorrido um aumento de casos de sepse por bactérias Gram-positivas, infecções por

bactérias Gram-negativas ainda são muito frequentes, sendo que a maioria dos estudos clínicos e experimentais refere-se à sepse causada pelas bactérias Gram-negativas ou por suas endotoxinas (POLL, OPAL, 2008; FRACASSO, 2008).

## 2.5 *Salmonella enterica* Sor. Typhimurium como modelo de infecção sistêmica experimental

A salmonelose é frequentemente atribuída ao consumo de alimentos contaminados, tais como aves domésticas, carne bovina, carne suína, ovos, frutos do mar, leite, produtos de nozes (TAUXE, 1991; BENENSON et al., 1995; BUGAREL et al., 2011) e os sintomas de gastroenterites começam a surgir algumas horas após a ingestão destes alimentos. Ao percorrer o início do trato digestivo, as bactérias atingem o estômago onde são sensíveis ao ácido estomacal, e boa parte dos micro-organismos são eliminados. No entanto, as bactérias que conseguem escapar com êxito de serem mortas pelo pH baixo do estômago passam através do intestino delgado para o íleo e cólon distais (FINK e COOKSON 2007; TORTORA et al., 2012). Nestes locais as bactérias penetram a barreira da mucosa e com o auxílio das fímbrias se aderem às células epiteliais intestinais (BAUMLER et al., 1996).

*Salmonella* causa rearranjos no citoesqueleto celular, danifica a borda em escova do epitélio normal e induz a modificações subsequentes da membrana plasmática do hospedeiro que absorve o micro-organismo para dentro de vesículas fagocíticas (OHL, 2001; TORTORA et al., 2012). As bactérias adentram principalmente as células M (HASE et al, 2009 ; KNOOP et al, 2009), um tipo de célula epitelial intestinal especializada no transporte de partículas a partir do lúmen do intestino para lâmina própria (FANCHI, 2011). As vesículas então migram até a lâmina própria e a partir daí liberam as bactérias que entram na circulação sanguínea e são absorvidas pelos nódulos linfáticos regionais e levados ao baço e ao fígado. Nestes órgãos, os microrganismos se multiplicam e quando a quantidade intracelular de bactéria atinge certo patamar, elas são liberadas na corrente sanguínea atingindo assim outros órgãos (SCHAECHTER et al., 2002; VAN-DER-VELDEN et al., 2003; MARTINEZ-ARGUDO e JEPSON, 2008).

Com base no agente patogênico iniciador, os modelos animais de sepse podem ser divididos em três categorias: a administração exógena de uma toxina (por exemplo, lipopolissacarídeo), administração exógena de um microrganismo (bactéria, fungo, etc.) ou uma alteração na barreira endógena de proteção do animal (por exemplo, dano que induza permeabilidade do colon permitindo a translocação bacteriana para o abdômen) (BURAS et al., 2005).

Bactérias do gênero *Salmonella* pertencentes à família Enterobacteriaceae, são bastonetes gram-negativos, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos (TORTORA et al., 2012), e representam um grave problema para saúde pública e economia mundial (BOROWSKY et al., 2006; BUGAREL et al., 2011). *Salmonella* pode estar envolvida com três doenças humanas distintas: bacteremia, febre tifóide e enterocolite, além de problemas de infecção em gatos, cavalos, cabras e outros animais (ZHANG et al., 2003; COBURN et al., 2007;) A cada ano aproximadamente 93,8 milhões de casos de gastroenterite ocorrem no mundo devido infecção por *Salmonella* Typhimurium (MAJOWICZ et al., 2010)

A bacteremia é uma síndrome clínica menos comum em humanos causada por *S. enterica* Sor. Choleraesuis ou *S. enterica* Sor. Dublin, que podem entrar na cadeia alimentar por meio de produtos oriundos da carne de porco mal cozidas ou leite não pasteurizado (SAPHRA et al.,1954; FANG, FIERER, 1991;BUGAREL et al., 2011) A Febre Tifóide é uma infecção sistêmica causada por *S. enterica* sorotipos Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B e Paratyphi C. Estas espécies são estritamente adaptados aos seres humanos e primatas superiores (MEAD et al.,1999). A colonização do tecido do hospedeiro pelo sorotipo Typhi pode causar trombose capilar nas placas de Peyer, que pode resultar em hemorragia, necrose e ulceração intestinal (BITAR, TARPLEY, 1985). A enterocolite, frequentemente associada a *S. enterica* Sor Typhimurium, é a segunda causa mais freqüente de infecção alimentar nos Estados Unidos, com aproximadamente 1,4 milhões de casos estimados por ano (MEAD et al.,1999).

Além dos problemas causados à saúde humana, bactérias do gênero *Salmonella* estão frequentemente relacionadas com enfermidades em animais, atingindo dentre outros, cães, gatos, ovelhas e equinos. A salmonelose em animais



pode estar fortemente associada à higienização inadequada do local onde eles são mantidos (BSAVA, 1997).

O trabalho realizado por Megid et al. (2001), descreveu um surto de salmonelose em cães mantidos em um canil de experimentação. Após 3 semanas, tempo de duração do surto, Megid e colaboradores observaram uma taxa de mortalidade de 50% (15/30) nos filhotes acometidos pela enfermidade. Ainda neste estudo, todos os animais que vieram a óbito foram submetidos à necropsia, sendo verificadas lesões sugestivas de processo septicêmico e pelo cultivo microbiológico do conteúdo intestinal, isolou-se *Salmonella* spp. a partir de todas as amostras. Linde et al.,(1992), observaram que a espécie *Salmonella abortusovis* é capaz de provocar aborto em ovelhas prenhes, no entanto, a vacinação desses animais com células atenuadas de *S. Typhimurium* diminui para até 0,1% a frequência de abortos quando comparado com o controle não imunizado, que teve uma taxa de aborto de 30%. Já Mádic J et al (1997), constataram que um surto de aborto ocorrido em um rebanho europeu de 38 cavalos, dos quais 26 eram éguas grávidas, pode ter ocorrido devido a infecções destas por *Salmonella*.

Infecções sépticas por bactérias gram-negativas são acompanhadas por uma resposta inflamatória sistêmica, caracterizada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias devido ao estímulo do Lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede bacteriana (CAVAILLON et al., 2003). A imunidade a patógenos como a *Salmonella* requer a indução precoce de uma resposta inata que eficientemente induz a ativação da resposta imunológica mediada por células T e B (IWASAKI E MEDZHITOV, 2004). A resposta imunológica inata às bactérias intracelulares consiste principalmente em fagócitos e células Natural Killer (NK). Resistentes a degradação dentro dos fagócito, as bactérias intracelulares estimulam as células dendríticas e os macrófagos a produzirem IL-12. Esta citocina é um potente ativador de células NK, que por sua vez, inicia a produção de INF- $\gamma$  que vai ativar os macrófagos e promover a destruição das células fagocitadas (ABBAS, et al 2008).

No entanto a resposta imunológica mediada por células é a principal protetora contra bactérias intracelulares, especialmente a resposta por células T CD4. Estas células se diferenciam em efectoras T<sub>H</sub>1 sob a influencia do IL-12, em seguida, as

células T CD4 T<sub>H</sub>1 expressam ligante CD40 e secretam INF- $\gamma$ , estímulos estes que ativam os macrófagos a produzirem substâncias microbianas como espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, e enzimas lisossômicas (JORENS et al., 1995; ABBAS et al 2008). Se antígenos bacterianos saírem do fagócito para o citosol, estes microorganismos não serão mais susceptíveis às substâncias bactericidas, e seus antígenos serão apresentados na superfície pelo Complexo Maior de Histocompatibilidade de Classe I (MHC-I), onde uma resposta por células citotóxicas (células T CD8) será estimulada (ABBAS, et al 2008).

O Fator de TNF- $\alpha$  é produzido por macrófagos e linfócitos T e tem como função estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção bem como ativar essas células para destruição do microrganismo (BENJAMIM, 2001). A resposta inflamatória precisa ser rigorosamente regulada para evitar inflamação sistêmica e choque letal (FERNANDEZ-CABEZUDO et al., 2009). Dentre os mecanismos reguladores que atuam para conter a inflamação excessiva estão algumas citocinas como a Interleucina 10 (IL-10), ela é produzida por macrófagos e células T reguladoras, sendo um inibidor das respostas imunes do hospedeiro, particularmente das que envolvem macrófagos à medida que a infecção bacteriana é erradicada (PAVLOV et al., 2003; TRACEY, 2007;)

Como já citado anteriormente, o óxido nítrico (ON) é de grande importância na defesa do hospedeiro contra micro-organismos e funciona dentre outras formas como vasodilatador (KATSUKI et al., 1977) e mediador citotóxico em células imunes efectoras ativadas. (HIBBS et al., 1988 ; KIECHLE, MARLINSKI, 1993). O ON é uma molécula muito instável e devido a essa instabilidade, sua produção é mensurada através da determinação da concentração dos seus produtos oxidativos: nitrato e nitrito (KNOW et al 1990, LEONEL, et al 1991). O ON é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, convertido em L-citrulina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (MARLETTA, 1993).

Atualmente são conhecidas três isoformas da NOS. A NOS neuronal (n-NOS) e a NOS endotelial (e-NOS) são dependentes de cálcio e responsáveis pela liberação basal e contínua do óxido nítrico em pequenas quantidades. Já a NOS Induzível (i-NOS) não é expressa em condições normais e é induzida por citocinas e/ou em uma

variedade de células como macrófagos, linfócitos T, neutrófilos etc (MONCADA, et al., 1991 ; MARLETTA, 1993 ; ROSSELLI et al., 1998).

Em modelos murinos, *S. Typhimurium* induz uma síndrome semelhante à febre tifóide e serve como modelo experimental de infecção sistêmica por *Salmonella* (PORTILLO, 2001; OHM, 2001; SCHAECHTER et al., 2002). Dessa forma, a *Salmonella Typhimurium* tornou-se uma ótima ferramenta no estudo da sepse e de doenças inflamatórias, bem como no desenvolvimento de medicamentos mais eficientes e tratamentos experimentais dessas patologias (LIMA-FILHO et al., 2004). Infecções sistêmicas causadas pela espécie provocam sepse e síndrome do choque tóxico, caracterizada por colapso vascular, coagulação intravascular disseminada e distúrbios metabólicos. Tais efeitos ocorrem devido à produção exagerada de citocinas como Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) e interleucina-12 (IL-12), estimuladas pelo LPS bacteriano (HENKIN et al., 2009).

## 2.6 Papel do sistema complemento em infecções sistêmicas

O sistema complemento e as proteínas reguladoras do sistema complemento desempenham um importante e decisivo papel na proteção do organismo contra agentes infecciosos (KOZLOV et al ,2007). O sistema complemento é formado por um conjunto de proteínas séricas e de superfície celular que permite ao hospedeiro reconhecer partículas de patógenos invasores ou de células próprias alteradas (GROS et al, 2008; ABBAS 2008). O reconhecimento dessas partículas patogênicas por componentes do sistema complemento inicia uma cascata proteolítica que produz fragmentos protéicos (como os fragmentos C3a e C5a) que induzem uma resposta pró-inflamatória e marcam esses antígenos como alvos para lise celular (DEGN et al., 2011; PIE GROS et al, 2008).

A ativação do sistema complemento pode se dar por três vias: 1) A via clássica: é iniciada quando um complexo antígeno-anticorpo liga-se ao primeiro componente do complemento, o C1 ; 2) a via alternativa é desencadeada quando ocorre o contato direto antígeno e complemento sem a participação de anticorpos. ; 3) a via da lectina:

é ativada pelo reconhecimento de estruturas de carboidratos que não estão presentes nas células do hospedeiro (KOZLOV et al ,2007; ZIPFEL, MICHAEL, 2009).

Embora acionadas de maneira diferentes, as três vias de ativação do complemento culminam na formação de dois complexos proteolíticos muito importantes, a C3 convertase (C3Bb e C4bC2a), que cliva C3 nos fragmentos C3a e C3b, e a C5 convertase (C3bBbC3b e C4bC2aC3b), que cliva o C5 em C5a e C5b (ABBAS et al., 2011; KEMPER E ATKINSON, 2007; MAKRIDES, 1998). Após a geração da C5 convertase, as reações subseqüentes são comuns a todas as vias de ativação do complemento para a formação do complexo de ataque a membrana (MAC) (MAKRIDES, 1998).

As C5 convertases geradas pelas vias clássica, alternativa e da lectina iniciam a ativação dos últimos componentes do sistema complemento, o que culmina na formação do MAC (ABBAS et al., 2011). A C5b, liga-se sequencialmente a C6 e C7. O componente C7 do complexo C5b,6,7 é hidrofóbico e se insere na bicamada lipídica da membrana celular da célula alvo, como por exemplo uma bactéria, em seguida, C8 liga-se ao complexo. C5b,6,7,8 que catalisa a polimerização de C9 para formar o MAC (MAKRIDES, 1998; TSCHOPP et al., 1982). Os poros formados pelo MAC na membrana celular alvo permitem a livre entrada de água o que resulta em edema osmótico e ruptura das células na qual o MAC está depositado (ABBAS et al., 2011).

Os fragmentos C3a e C5a são responsáveis por mediar múltiplas reações na resposta inflamatória, dentre elas, contração de músculos lisos, alterações na permeabilidade vascular, indução da desgranulação de mastócitos com conseqüente liberação de histamina, ativação e agregação de plaquetas (ABBAS et al., 2011; MORGAN, 1986; HUGLI, 1989; GERARD E GERARD, 1994), bem como a regulação de moléculas de adesão que desempenham papel fundamental no recrutamento neutrófilos (WALPORT, 2001a, 2001b; Foreman et al, 1994, Mulligan et al, 1996, 1997; Schmid et al, 1997a).

O sistema complemento tem um papel fundamental na resposta inflamatória além de ser um poderoso instrumento para lise celular (MAKRIDES, 1998). Portanto

sua ativação não controlada, dirigida para células do próprio organismo hospedeiro (doença autoimune), pode levá-lo a morte (KOZLOV et al., 2007). Um exemplo do mau funcionamento desse sistema é o edema angioneurótico hereditário, causado por uma deficiência congênita da proteína C1-Inh, que inibe irreversivelmente a proteína quinase C1s, ou a perda da sua atividade funcional devido à mutação (ANDINNA et al., 2004).

Segundo Kozlov *et al.* (2007), apesar de um grande número de inibidores do complemento terem sido isolados de plantas e animais, mas essas substâncias ainda são pouco estudadas e não são consideradas abrangentes. Quando esses inibidores são rigorosamente identificados e têm sua estrutura estabelecida, eles podem formar uma base para a criação de novos medicamentos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi explorar o potencial biotecnológico de *Carica candamarcencis*, principalmente suas propriedades imunomoduladoras e antimicrobianas, a partir da fração proteica P1G10 obtida do seu fluído laticífero, no controle de infecção sistêmica experimental por *Salmonella* Typhimurium em camundongos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Verificar a atividade antibacteriana *in vitro* da fração proteica P1G10 do látex de *C. candamarcencis* contra *S. Typhimurium*;
- b) Avaliar a influência da fração proteica P1G10 do látex de *C. candamarcencis*, quando inoculadas por diferentes vias, sobre o perfil celular leucocitário de camundongos submetidos ao desafio inflamatório por Carragenina;
- c) Avaliar a sobrevivência de camundongos inoculados com a fração proteica P1G10 em diferentes concentrações (grupos experimentais) ou com Tampão Salina-Fosfato, pH 7,0 - PBS (grupos controles), ao desafio experimental com *S. Typhimurium*;
- d) Avaliar a influência da fração proteica P1G10 no clareamento de bactérias viáveis no baço, fígado, fluído peritoneal e no sangue periférico dos animais infectados;
- e) Determinar a contagem total e diferencial de leucócitos no sangue e no fluído peritoneal de animais infectados;
- f) Avaliar o dano histopatológico no baço e fígado dos animais infectados;
- g) Analisar a expressão gênica de TNF-alfa, IL-1e IL-10 por RT-PCR dos animais infectados;
- h) Analisar a produção de óxido nítrico no soro dos animais infectados;

e) Avaliar a influência da fração proteica P1G10 sobre a atividade lítica do sistema complemento;

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. et al. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 341-345.
- AGRAWAL, A. A.; KONNOR, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology and evolution plant defense against herbivory. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 40, p. 311-331, 2009.
- ALLARCON, J. B. et al. Alergia ao Látex. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.53, n. 1, p.89 – 96 , 2003.
- American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Critical Care Medicine**. 1992;20:864-74.
- ANDINNA, S. S. et al. Determination of the functional activity, amount of C1 inhibitor, and autoantibodies as a tool for differential diagnosis of angioedema, v. 50, n. 1, p. 86-8139, 2004
- ANGUS, D.C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, v. 29, p.1303-10, 2001.
- BAEZA, G. et al. Proteolytic enzymes in *Carica candamarcensis*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 51, p. 1-9. 1990.
- BAUMLER, A .J. et al. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. **Infection and Immunity**, v. 64, p.1862–65. 1996.
- BENENCIA, F. et al. In vivo and in vitro immunomodulatory activities of *Trichilia glabra* leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. Lausanne, v. 69, p.199-205. 2000.
- BENJAMIM C. F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.34, p. 18-26, 2001.
- BENENSON, A. S. J.; CHIN, A.S. Control of Communicable Diseases Manual. **American Public Health Association, Washington, DC**. 1995.
- BIELLA, C .A. Avaliação da atividade imunomoduladora de *Alternanthera brasiliana* Colla e investigação de ações do extrato aquoso em modelo de artrite experimental. **Tese do Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, USP**. Ribeirão Preto, 2007.



BIN-HAFEEZ, B. et al. Protective effect of *Cassia occidentalis* L. on cyclophosphamide-induced suppression of humoral immunity in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 13-18, 2001.

BITAR, R.; TARPLEY, J. Intestinal perforation and typhoid fever: a historical and state-of-the-art review. **Reviews of Infectious Diseases**, v.7, p. 257.1985.

BLECHA, F. Immunomodulators for prevention and treatment of infectious diseases in food-producing animals. **Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice, Philadelphia**, v.17, n.3, p.621-633, 2001.

BROCHADO, C. O. et al. Flavonol robinobiosides and Rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation in vitro. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. Rio de Janeiro. v.14, p 449-451, 2003.

BOROWSKY, L.M. et al. Sensibilidade e resistência de amostras de Salmonella Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodoform. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p.1474-1479, 2006.

BSAVA. Salmonellosis. **BSAVA News Scientific Information Document**. J. Small Animal Pract., v. 38, p. 375-376, 1997.

BUAGAREL M., et al. A multiplex real-time PCR assay targeting virulence and resistance genes in Salmonella enterica serotype Typhimurium. **BMC Microbiology**, v.11, n.151, p. 1-11, 2011

BURAS, J.A. et al. Animal Models of Sepsis: Setting the Stage. **Nature**, v, 4. 2005.

BUTTLE, J. D. et al. Oral dosing with papaya latex is an effective anthelmintic treatment for sheep infected with *Haemonchus contortus*. **Parasites e Vectors**, v. 4, p. 1-11, 2011.

CASTRUCCI, G. et al. The use of a non-specific defence mechanism inducer in calves exposed to bovine herpesvirus-1 infection: preliminary trials. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v.18, n.2, p.85-91, 1994.

CAVAILLON, J. M. et al. Cytokine cascade in sepsis. **Scand. J. Infect. Dis**, v.35, p.535-544, 2003.

COBURN, B. et al. Salmonella, the host and disease: a brief review. **Immunol Cell Biol.** v. 85, p. 112-118, 2007.

- DEGN, S.E. , JENSENIUS, J.C., THIEL, S. Disease-causing mutations in genes of the complement system. **American Journal of Human Genetics**, v. 88, p. 689–705, 2011.
- DUTTA, R.C. Peptide immunomodulators versus infection: an analysis. **Immunology Letters**, p. 19, 2002.
- FANG, F.C.; FIERER; J. Human infection with *Salmonella Dublin*. **Medicine (Baltimore)**, v. 70, p. 198–207. 1991.
- FERNANDEZ-CABEZUDO, M. J. et al. Cholinergic stimulation of the immune system protects against lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Immunology**, v.130, p. 388–398, 2010
- FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. **Cellular Microbiology**, v. 9, p. 2562–2570, 2007
- FRACASSO, J.F. Contribuição ao entendimento da patogenia da sepse. **Revista de Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.2, p. 119-127, 2008.
- FRANCHI, L. Role of inflammasomes in *Salmonella* infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 2 Article 8 . Pag: 1-6. 2011.
- FREITAS, C. D .T. et al. Anti-oxidative and proteolytic activities and protein profile of laticifer cells of *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra* and *Euphorbia tirucalli*. **Brazilian Society of Plant Physiology**, v. 22, n.1, p. 11-22, 2010.
- GAUGHRAN, E. R. L. Ficin: History and present status. **Quarterly Journal of Crude Drug Research**, v. 14, p. 1-21, 1976.
- GERARD C., GERARD N. P. C5a anaphylatoxin and its seven transmembranesegment receptor. **Annu Rev Immunol.** v.12, p.775–808, 1994.
- GOMES, M. T. R. et al. Isolation of two plant proteinases in látex from *Carica candamarcensis* acting as mitogenic for mammalian cells. **Planta Medica**, v. 71, p. 244-248, 2005.
- GOMES, F. S. L. et al. Wound healing activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* on experimentally induced burns. **Burns**, v. 36, p283. 2010.
- GROS, P. et al. Complement driven by conformational changes. **Nature Publishing Group**, v. 8. 2008.
- HAGEL,J. M. et al. Got milk: The secret life of laticifers. **Trends in Plant Science**, v. 13, n.12, p.631-639, 2008.

HASE, K. et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH bacteria by M cells initiates mucosal immune response. **Nature Publishing Group**, v. 462, p. 226–230. 2009.

HENKIN, C. S. et al. Sepse: uma visão atual. **Scientia Medica**, v. 19, n. 3, p. 135-145, 2009

HIBBS JR., J. B. et al. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 157, p. 87-94, 1988.

HUGLI T. E. Structure and function of C3a anaphylatoxin. **Curr Top Microbiology Immunology**, v. 153, p.181–208, 1989.

KATSUKI, S. A. et al. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. **Journal of Cyclic Nucleotide Research**. v. 3, p. 23-5, 1977.

KEKWICK, R.G.O. Latex and Laticifers. **Encyclopedia of life sciences**, p.1-6, 2001.

KEMPER, C, ATKINSON J. P. T-cell regulation: with complements from innate immunity. **Nature**, v.7, p. 9-18, 2007.

KIECHLE, F.L.; MARLINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology and detection. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 100, p. 567- 75, 1993.

KNOOP, K. A. et al. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. **Journal of Immunology**, v.183, p. 5738–5747. 2009.

KONEMAN E.W. et al. **Diagnóstico microbiológico- Texto e atlas colorido**,. 5. ed. MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2001. p. 204

KONNO, K. et al. Mulberry latex rech in antidiabetic sugar-mimic alkaloids forces dieting on caterpillars. **PNAS**, v. 103, n. 5, p. 1337-1341, 2006.

KOZLOV, L. V. et al. Artificial Inhibition of the Complement System. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 33, p. 449–473, 2007.

LATHA, P. G. et al. Immunomodulatory and antitumour properties of *Psoralea corylifolia* seeds. **Fitoterapia**, v. 71, p. 223-231, 2000.

LEON, J. **Botánica de Los Cultivos Tropicales**. 3. ed. San Jose: IICA, p. 522. 2000.

LIMA-FILHO, J. V. M. et al. Effect of the *Escherichia coli* EMO strain on experimental infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in gnotobiotic mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n.7, p.1005-1013, 2004.

LIMA-FILHO, J. V. et al. Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 327-334, 2010.

LINDE, K. et al. Prophylaxis of *Salmonella abortus ovis* induced abortion of sheep by a *Salmonella* Typhimurium live vaccine. **Vaccine**. V, 10, p. 337-340. 1992.

LOPES, P. F. O Uso do Imiquimod no Tratamento de Lesões Anais Induzidas por HPV. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 25, n. 3, p. 269-271. 2005.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil – terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 3. ed. São Paulo Nova Odessa: Plantarum, 608 p. 2000.

MADIĆ, J. et al. An outbreak of abortion in mares associated with *Salmonella abortusequi* infection. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 3, p. 230-3. 1997.

MAJOWICZ, S. E. et al. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. **Clin Infect Dis**, v. 50, n.6, 2010.

MAKRIDES, S. C. Therapeutic Inhibition of the Complement System. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 1, p. 59-87, 1998.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 17, p. 12231-12234, 1993.

MARTINEZ-ARGUDO I., JEPSON, M. A. *Salmonella* translocates across an in vitro M cell model independently of SPI-1 and SPI-2. **Microbiology**, v. 154, p. 3887-3894. 2008

MEAD, P. S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 607–625, 1999.

MEGID, J. et al. Effect of vaccination and the immunomodulators bacillus of Calmette-Guérin, Avidine and Propionibacterium acnes on rabies in mice. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v.21, n.4, p.305-318. 1998.

MEGID, J. et al. Salmonelose em cães de experimentação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 38, n. 1, p. 44-45, 2001.

MEHROTRA, S. et al. Immunomodulation by ethanolic extract of *Boerhavia diffusa* roots. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 987-996, 2002.

MELLO, V. J. et al. Plant Proteinases: their potential as therapeutic drugs. In: Govil, J.N., Singh, V.K., Arunachalam, C. **Drug Development from molecules**. Texas: Studium Press, p 211-224, 2006.

MELLO, V. J. et al. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. **Phytomedicine**, v.15, n. 4, p. 237-244, 2008.

MONCADA, S. *et al.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-42, 1991.

MORCELLE, R. S. et al. Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex. **Fitoterapia**, v. 75, p. 480–493, 2004.

Morgan, E. L. Modulation of the Immune response by anaphylatoxins. **Complement**. vol 3, 1986.

NETO, C. F.; ARIAS, C. G. Uso de Imiquimod em infartes. **Dernatol Pediatr Lat**, v. 4, n. 3, p. 232-239, 2006.

NICHOLLS, E. F. et al. Antimicrobial Therapeutics Reviews Immunomodulators as Adjuvants for Vaccines And Antimicrobial Therapy. **Annals of the new york academy of sciences Issue**. Hancock Ann. N.Y. Acad. Sci. 1213 p. 46–61. 2010.

O'BRIEN, J. M. et al. Sepsis. **Journal of the American Medical**, v. 120, p. 1012-1022. 2007.

OHL, M. E.; MILLER, S. I. *Salmonella*: A Model for Bacterial Pathogenesis. **Annual Review of Medicine**, v. 52, p. 259–74. 2001.

OLIVEIRA, R.B. et al. **Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes**. Ribeirão Preto, Holos Editora, 64p. 2003.

OLIVEIRA, R. S. B. et al. Inflammation induced by phytomodulatory proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against *Salmonella* infection in a murine model of typhoid fever. **Inflammation Research**, v. 61, n. 7, p. 689–98, 2012.

ORTÊNCIO, W. B. **Medicina popular do Centro-Oeste**. 2. ed. Brasília, Thesaurus, 464 p. 1997.

PAVLOV, V. A., et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. **Mol Med**, v. 8, p.125–134, 2003

PERELLÓ, M. et al. Proteolytic encimes form latex of *Ficus pumila* L. (Moraceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 19, n. 1, p. 257-262, 2000.

PINHEIRO, D. C. S. N. et al. Immunomodulatory activity of the medicinal plants: perspectives for veterinary medicine. **Ciência Animal**, v.13, n. 1, p. 23-32, 2003.

PLAEGER, S. F. Clinical immunology and traditional herbal medicines. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington. v. 10, p. 337-338, 2003.

POLL, T. V. D.; OPAL, S. M. Host-pathogen interactions in sepsis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 32-43. 2008

PORTILLO, F. G. *Salmonella* intracellular proliferation: where, when and how? **Microbes and Infection**, v. 3, p. 1305-1311, 2001.

PUTMAN, E. et al. Assessment of the immunotoxic potential of human pharmaceuticals: a workshop report. **Drug. Inf. J. New York**, v. 36, p. 417-427, 2002.

RAMOS, M.V. et al. Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested upon *in vitro* enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material. **Fitoterapia**, v. 44, n. 4 p.251-256, 2006.

RAMOS, M. V. et al. Involvement of NO in the inhibitory effect of *Calotropis procera* latex protein fractions on leukocyte rolling, adhesion and infiltration in rat peritonitis model. **Journal of Ethnopharmacology**, v.125, p.1-10, 2009.

ROCHA, F.A.G.; DANTAS, L.I.S. Atividade antimicrobiana *in vitro* do látex do Aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.), Pinhão bravo (*Jatropha mollissima* L.) e Pinhão roxo (*Jatropha gossypifolia* L.) sobre microrganismos patogênicos. **Holos**, ano 25, v.4, 2009.

ROSSELLI, M. et al. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. **Human Reproduction**, v. 4, n. 2, p. 125-137, 1998.

SANTA, H. S. D. Efeitos no Metabolismo e Ação Imunomoduladora em Camundongos do Micélio de *Agaricus brasiliensis* Produzido por Cultivo no Estado Sólido. **Tese apresentada como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor no curso de Processos Biotecnológicos**. Universidade Federal do Paraná. 2006.

SAPHRA, I.; WASSERMANN, M. *Salmonella Cholerae suis*. A clinical and epidemiological evaluation of 329 infections identified between 1948 and 1954 in the New York *Salmonella* Center, Am. **Journal of Medicine Sci**, v. 228, p. 525–533.1954.

SCHAECHTER, M. et al. **Microbiologia: Mecanismo das doenças infecciosas**. 3. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 642 p. 2002.

SHINDE, U. A. et al. Preliminary studies on the immunomodulatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. **Fitoterapia**, v. 70, p. 333-339, 1999.

- SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 887- 893, 2001.
- SILVA, C. A. et al. A mitogenic protein fraction in latex from *Carica candamarcensis*. **Planta Medica**, v. 69, p. 926-932, 2003.
- SILVA JUNIOR, I. E. et al. Triagem antimicrobiana de algumas plantas medicinais do Cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 19, n.1b, p. 242-248. 2009.
- TAUXE, R. V. *Salmonella*: A postmodern pathogen. **Journal of Food Protection**, v.54, p. 563–568. 1991
- TITHERADGE, M. A. Nitric oxide in septic shock. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1411, p. 437-55. 1999.
- TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002.
- TORTORA, G .J. et al. **Microbiologia**, 10ª Ed. Porto Alegre. Artmed, 934 p. 2012.
- TRACEY K. J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. **J Clin Invest.**, v. 117, p.289–296, 2007
- VAN-DER-VELDEN, A. W. M. et al. Salmonella Rapidly Kill Dendritic Cells via a Caspase-1-Dependent Mechanism. **The Journal of Immunology**, v.22, p. 6742-6749, 2003.
- YEANG, H. Y. et al. Allergenic proteins of natural rubber latex. **Methods**, v. 27, n. 1, p. 32-45, 2002.
- WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **New England Journal of medicine**, v.344, p 1058–1066, 2001a.
- WALPORT, M. J. Complement. Second of two parts. **New England Journal of medicine**, v. 344, p. 1140–1144, 2001b.
- WALRAEVENS, V. et al. Isolation and primary structure of the CCI papain-like cysteine proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* hook. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.380, n. 4, p.485-488, 1999.
- WENZEL, R. P. Treating sepsis. **New England Journal of medicine**, v.347,p. 966–967, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Regulatory situation of herbal medicines. **A worldwide review**. Bulletin WHO/TRM/98.1, Geneva, P.1-43, 1998.

ZHANG, S. et al. Molecular Pathogenesis of Salmonella enteric Serotype Typhimurium–induceDiarrhea.**Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 1-12, 2003.



## CAPÍTULO II

### **Fração proteica P1G10 do látex de *Carica candamarcensis* aumenta a sobrevida de camundongos Swiss infectados com *Salmonella enterica* Ser. Typhimurium**

Maria Taciana Ralph<sup>1</sup>, Ayrles Fernanda Brandão Silva<sup>2</sup>, Dayane Laíse da Silva<sup>1</sup>, Danielle Cristina Oliveira do Nascimento<sup>1</sup>, Diogo Manoel Farias da Silva<sup>3</sup>, Manoel Adrião Gomes Filho<sup>3</sup>, Paulo Roberto Eleutério Souza<sup>1</sup>, Joaquim Evêncio Neto<sup>3</sup>, Carlos Edmundo Salas<sup>4</sup>, José Vitor Lima Filho<sup>1\*</sup>.

1. Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.
2. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil
3. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.
4. Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, Brasil.

\* Autor para correspondência: Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Departamento de Biologia, Campus Dois Irmãos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco CEP 52171-900, Brasil. E-mail: [jvitor@db.ufrpe.br](mailto:jvitor@db.ufrpe.br), Tel: + 55 31 81 33206312

## Resumo

**Objetivo:** Investigar o potencial da fração proteica P1G10 de *Carica candamarcensis* (Caricaceae) no controle da resposta inflamatória de camundongos Swiss infectados com *Salmonella enterica* Ser. Typhimurium, o modelo murino da febre tifóide humana.

**Métodos:** Os animais receberam P1G10 (1, 5 ou 10 mg/kg) ou PBS, via ip, 24 horas antes da infecção com *S. Typhimurium* ( $10^7$  CFU/mL), também por via ip. A sobrevivência e a infiltração de leucócitos para a cavidade peritoneal foram avaliadas durante a infecção. A quantidade de óxido nítrico (NO) no soro e a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, também foram investigados. Camundongos não infectados e administrados com P1G10 (10 mg/kg) foram submetidos a um modelo de peritonite induzida por carragenina, e a atividade anti-complemento de P1G10 foi avaliada *in vitro*.

**Resultados:** A sobrevivência dos animais pré-tratados com P1G10 (10 mg / kg) foi de 60%, sete dias após a infecção, enquanto o que o grupo PBS morreu entre 1-3 dias. Após a infecção, a infiltração de leucócitos para dentro da cavidade peritoneal foi maior em camundongos administrados com P1G10. As quantificações de ON foram semelhantes entre os camundongos de todos os grupos, mas houve uma diminuição na expressão de RNAm de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Em camundongos não infectados, a administração por via endovenosa de P1G10 reduziu a infiltração dos leucócitos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina. Por outro lado, a sua administração por via intraperitoneal aumentou a inflamação induzida pelo agente flogístico. Além disso, P1G10 mostrou ter atividade anti-complemento, o que foi atribuído à presença de proteínas com atividade proteínica.

**Conclusão:** A fração proteica P1G10 de *C. candamarcensis* é potencialmente uma fonte atraente de biomoléculas com propriedades anti-inflamatórias.

**Palavras-chave:** Inflamação, *Salmonella* Typhimurium, proteínas laticíferas.

## Introdução

*Carica candamarcensis* é uma planta nativa do oeste da América do Sul e pertencente à família Caricaceae (Leon, 2000; Lorenzi, 2000). Popularmente conhecido como Mamão da montanha, esta planta é famosa por lançar uma grande quantidade de látex das folhas e camadas externas do endocarpo após fruto sofrer alguma injúria (Walraevens et al. 1999). Tais fluidos têm sido obtidos principalmente a partir de frutos imaturos, que têm altos níveis de hidratos de carbono, vitaminas, minerais e proteínas (Baeza et al. 1990). Anteriormente, Silva et al. (2003), separou frações proteicas obtidas a partir de látex por cromatografia em coluna de Sephadex, chamadas P1G10 e P2G10. A fração P1G10 é rica em cisteíno proteinases com atividade proteolítica de 5-8 vezes maior do que *C. papaya* (Baeza et al, 1990; Teixeira et al 2008.). Suas atividades biológicas têm sido explorado em diferentes modelos experimentais.

A fração protéica P1G10 têm atividade mitogênica em cultura de fibroblastos e células epiteliais (Gomes et al. 2005) e ação anti-ulcerogênica cujos efeitos sobre a cicatrização do estômago estão relacionados ao estímulo angiogênico (Mello et al. 2008). Além disso, o encurtamento no tempo de repitelialização também foi demonstrado num modelo de ferimento de queimadura na pele quando P1G10 foi aplicada a uma concentração de 0,1% (Gomes et al. De 2010). Assim, o látex *C. candamarcensis* apresenta-se como uma fonte potencial de compostos bioativos com propriedades farmacológicas. No entanto, pouco se sabe sobre seu efeito imunomodulador no curso de diferentes estímulos.

Os dados anteriores com proteínas laticíferos de *Calotropis procera* (Asclepiadaceae), que também é rica em cisteíno proteinases, têm mostrado que estas previnem o choque séptico causado por *Salmonella enterica* Sor. Typhimurium (Lima-Filho et al. 2010; Oliveira et al. 2012). Além disso, essas proteínas mantêm a homeostase de coagulação em camundongos com sepse e exibem atividades semelhantes a trombina e plasmina (Ramos et al. 2012). No presente estudo, foi investigada a influência de P1G10 sobre a resposta inflamatória de camundongos Swiss infectados experimentalmente com *S. Typhimurium*.

## Métodos

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com princípios internacionalmente aceitos para o uso de animais em laboratório e foram aprovados pelo comitê de ética experimental da Universidade Federal Rural de Pernambuco (processo 23082.012528/2012-14).

### Proteínas laticíferas de *C. candamarcensis*

O látex de *C. candamarcensis* foi coletado por várias incisões feitas na superfície do fruto verde com o auxílio de uma lâmina afiada. Após a coleta, o látex foi liofilizado e armazenado no escuro a -20 ° C até o momento do uso. Esta amostra foi dissolvida e, em seguida, equilibrada com tampão acetato de sódio 1,0 M e aplicado a uma coluna de Sephadex G10. As amostras foram triadas por determinação da absorbância a 280 nm e da atividade de amidásica (Silva et al. 2003). O primeiro pico com atividade amidásica constituiu a fração P1G10.

### Micro-organismo

*Salmonella entérica* subsp. enterica sorotipo Typhimurium foi isolada de um caso clínico humano na Fundação Ezequiel Dias (Funed, Belo Horizonte, MG, Brasil) e foi gentilmente cedida pela Dr. Jacques Robert Nicoli (Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil). As bactérias foram mantidas a -18 °C em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) contendo 50% de glicerol. Durante as experiências, as bactérias foram ativadas após cultura em caldo BHI durante 24 horas a 37 °C.

### Atividade antimicrobiana *in vitro*

A atividade antimicrobiana de P1G10 foi avaliada através do método de diluição em caldo (Koneman et al. 2008). As proteínas foram dissolvidas em salina fosfatada tamponada (PBS) para obter concentrações finais que variaram entre 1

mg/ml e 0,0019 mg/ml, em tubos de caldo Mueller Hinton contendo *S. Typhimurium* ( $10^5$  UFC / ml). Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Tubos de controle não possuíam as proteínas do látex. A concentração inibidora mínima foi estimada como sendo a concentração mais baixa que inibiu o crescimento visível após incubação durante 24 h a 37 °C.

## Animal

Camundongos Swiss (*Mus musculus*) foram obtidos a partir de Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais pesavam entre 30 e 35 gramas e foram mantidos em gaiolas com iluminação controlada (12 h claro / escuro - ciclos), temperatura de 25 °C, com livre acesso à água e ração comercial (Purina, Paulina, SP, Brasil). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

## Desing experimental

Os ratos foram separados em quatro grupos (n = 6) como a seguir: os grupos experimentais foram administrados por via intraperitoneal com 0,2 ml de P1G10, em concentrações de 1 mg/kg, 5 mg/kg ou 10 mg/kg (em PBS estéril, pH 7,2) , enquanto que o grupo de controle recebeu 0,2 ml de PBS. Após 24 horas, todos os animais foram desafiados por via intraperitoneal com uma solução contendo  $10^7$  células de *Salmonella Typhimurium*. A avaliação dos sintomas clínicos e de sobrevivência após a infecção foi monitorizado a cada 24 horas, durante sete dias. Os animais sobreviventes foram submetidos à eutanásia com isoflurano no final do experimento (Lima-Filho et al. 2010;. Villalba, 2010). Considerando os resultados do ensaio de sobrevivência, um outro grupo de camundongos (n = 10) foi administrado com 10 mg / kg de P1G10 e infectados com *S. Typhimurium*, seguindo o protocolo experimental descrito acima. O grupo de controle (n = 10) receberam PBS, de acordo com o

esquema seguido para pares experimentais. Neste caso, os animais foram submetidos a eutanásia após 24h e 72h após a infecção.

#### *Análise histopatológica*

Amostras de tecido de fígado e baço dos animais foram fixadas em formol a 10% e processadas para fixação em bloco de parafina. Os cortes histológicos com espessura de 5µm foram corados com hematoxilina-eosina. As lâminas foram examinadas por um único patologista, que desconhecia as condições experimentais.

#### *Avaliação da depuração bacteriana*

Os baços e os fígados dos animais foram removidos assepticamente e homogeneizados em PBS pH 7,2. As suspensões destes órgãos e amostras de sangue e fluido peritoneal foram submetidas a diluições decimais seriadas. Em seguida, uma alíquota de 0,1 ml de cada diluição foi plaqueada em placas de ágar de MacConkey. As placas foram incubadas numa câmara de crescimento durante 24 h a 37 °C para posterior quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC/ grama de peso do órgão ou ml de sangue ou fluido peritoneal) (Oliveira et al., 2012).

#### *As contagens total e diferencial de leucócitos*

Para a contagem total de leucócitos no sangue e fluido peritoneal, 20 µl foi homogeneizada com 380 µL do reagente de Turk. Uma alíquota desta solução foi retirada e colocada numa câmara de Neubauer, e os leucócitos foram contados sob um microscópio óptico. A contagem diferencial foi feita a partir de esfregaços corados com eosina azul de metileno - Giemsa (Souza e Ferreira, 1985).

### *Análise da expressão gênica de citocinas*

Uma seção do fígado dos animais foi retirada assepticamente e homogeneizada em 0,5ml de TRIzol® Reagent (Invitrogen) para extração do RNA total, seguindo-se o protocolo proposto pelo fabricante. A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro a 260 nm e sua integridade confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% (Oliveira et al, 2012). Para a construção do cDNA e amplificação por PCR em tempo real foi utilizado um *kit* comercial (SIGMA-SYBR-Green Quantitative RT-PCR KIT). Foram analisadas as expressões dos seguintes primers: Beta Actina- Camundongo (Controle interno) (forward 5' ATATCGCTGCGCTGGTCGTC 3', reverse 5' AGGATGGCGTGAGGGAGAGC 3'); Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (forward 5' GATCTCAAAGACAACCAACTAGTG 3', reverse 5' CTCCAGCTGGAAGACTCCTCCCAG 3'); Interleucina -1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (forward 5' AATCTCACAGCAGCACATCAA 3', reverse 5' AGCCATACTTTAGGAAGACA 3') e interleucina -10 (IL-10) (forward 5' CGGGAAGACAATAACTG 3', reverse 5' CATTTCGATAAGGCTTG 3'). A análise dos resultados foi realizada de acordo com Dussault e Pouliot (2006) e para comparação da expressão dos genes de interesse (G.I) entre grupo controles e experimentais foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = [(Ct \text{ G.I controle} - Ct \text{ actina controle}) - (Ct \text{ G.I Experimental} - Ct \text{ actina experimental})]$$

Para aproximação das variações das medições, foi utilizada a fórmula:  $2^{\Delta\Delta Ct}$

### *Quantificação de óxido nítrico no soro dos animais*

A determinação de óxido nítrico foi realizada no soro sanguíneo na forma de nitrito. A conversão de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) foi realizada pela ação da enzima nitrato redutase, utilizando-se um kit comercial (R&D Systems)

### *Influência de P1G10 sobre a migração de leucócitos no modelo de inflamação por peritonite*

Para realização deste teste seguiu-se o protocolo descrito por Alencar et al. (2004). A fração proteica P1G10 de *C. candamarcensis* foi administrado em concentrações de 1mg/kg, 5mg/kg, ou 10mg/kg, por via endovenosa ou intraperitoneal, a camundongos Swiss não infectados. Os grupos controle foram administrados com PBS. Após 30 minutos, a peritonite foi induzida pela administração intraperitoneal de 0,2 ml de uma solução de carragenina (500 mg / animal). Após 6 horas, os animais foram sacrificados sob anestesia com isoflurano. A contagem total e diferencial de leucócitos no sangue e fluido peritoneal foi realizada como descrito anteriormente.

### *Influência de P1G10 sobre a ativação do sistema complemento*

O método que se segue foi adaptado de Samuelsen et al. (2004). Soros de humano ou de carneiro (180 µL) foram adicionados a microplacas de 96 poços. Em seguida, 10 µl de P1G10 foi adicionado aos poços para se obter concentrações finais de 1mg/ml, 5 mg/ml ou 10mg/ml. P1G10 desnaturado pelo calor (10mg/ml - 100 °C durante 30 min) foi também testada. As microplacas foram incubadas a 37 °C durante 5 min, e, em seguida, 10 µl de suspensão de bactérias de *Escherichia coli* (10<sup>6</sup> UFC/ml) foi adicionada aos poços. Poços contendo soro intacto ou desnaturado pelo calor (56 °C/30 min) e *E. coli*, desprovidos de P1G10, foram usados como controles. As placas foram incubadas a 37 ° C, e alíquotas de 20 µL foram retiradas de cada poço depois de 60, 120, 240, 360 e 480 minutos para a quantificação de unidades formadoras de colônias em ágar de MacConkey. Os resultados foram expressos como UFC/mL. Todos os testes foram realizados em duplicata.

### *Análise estatística*

Os resultados serão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Para comparação múltipla dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni ou Student Newman-Keuls. A significância mínima considerada será nível de  $p < 0,05$ . Para análise e processamento dos resultados, foi utilizado o programa Graphpad Prism.



## Resultados

Camundongos Swiss pré-tratados com um único inóculo de P1G10, apresentaram taxas de sobrevivência dose-dependente, enquanto os animais não tratados sucumbiram até o terceiro dia após a infecção por *Salmonella* (Fig. 1). O maior índice de sobrevivência foi observado com a dosagem de 10 mg/kg (60 %), sendo esta dosagem utilizada para realização dos demais experimentos. Após 24 e 72 horas da infecção, o número de bactérias viáveis no baço, no sangue e no fluido peritoneal não diferiu significativamente entre os animais pré-tratados com P1G10 e grupo controle ( $p > 0,05$ ). No entanto, houve uma diminuição no número de bactérias viáveis no fígado dos animais experimentais após 72 h de infecção ( $p < 0,05$ ) (dados não mostrados). P1G10 não apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* contra *S. Typhimurium* na maior concentração testada (1 mg/ml).

O pré-tratamento com P1G10 (10mg/ ml) induziu significante migração de leucócitos para a cavidade peritoneal nos animais infectados em comparação ao grupo controle não tratados após 72 horas da infecção ( $p < 0,05$ ) (Fig. 1b). Não houve alterações no perfil hematológico das populações de leucócitos no sangue destes animais (dados não mostrados). A avaliação histológica do fígado dos animais controle, após 72 horas de infecção, revelaram infiltração inflamatória, formação de trombos, núcleos picnóticos, necrose hepática difusa e intensa vacuolização citoplasmática (Fig. 2a). No mesmo período, o fígado de animais pré-tratados com P1G10 mostrou leve vacuolização dos hepatócitos, sinais discretos de necrose, presença de microabscessos e acúmulo de células mononucleares (Fig. 2b). revelou que no parênquima esplênico houve a presença de processos inflamatórios com áreas de depleção linfóide e necrose com células multinucleadas (Fig. 2c), ao passo que o baço de animais pré-tratados com a proteína apresentavam apenas ligeira inflamação e ausência de células gigantes multinucleadas (Fig. 2d).

A inflamação experimental induzida por carragenina em animais não infectados mostrou que o pré-tratamento com P1G10, efetuado por via endovenosa, reduziu fortemente a infiltração de leucócitos para dentro da cavidade peritoneal ( $p < 0,05$ ) (Fig. 3a). Por outro lado, a migração dos leucócitos foi potencializada quando

a fração proteica foi administrada por via intraperitoneal ( $P < 0,05$ ) (Fig. 3b). Além disso, a fração proteica P1G10, quando testada *in vitro* em concentrações de 5 mg/ml e 10 mg/ml, foi capaz de inibir a cascata do sistema complemento, evitando a lise de células de *E. coli* (Fig. 4). No entanto, quando P1G10 foram desnaturadas pelo calor (100 °C/30 min), o sistema do complemento eliminava as bactérias da forma habitual (Fig. 4).

A observação de transcritos de TNF- $\alpha$  em células do fígado confirmou pequenas reduções de 0,8 e 0,6 vezes nos grupos tratados com P1G10, 24 e 72 h após a infecção, respectivamente (Fig. 5a). A expressão gênica de IL-1 $\beta$  também mostrou uma diminuição relativa de 0,7 e 0,2 vezes no grupo tratado, respectivamente (Fig. 5a). Não havia transcritos de IL-10 em nenhum um dos grupos ou de qualquer alteração significativa da produção de óxido nítrico no soro (Fig. 5b).

## Discussão

No modelo murino, *S. Typhimurium* induz uma síndrome semelhante à febre tifóide humana causada por *S. Typhi* (Médico et al, 1997; Megid et al, 2001; Zhang et al, 2003). Infecções sistêmicas induzidas por *S. Typhimurium* geralmente provocam falência da migração de leucócitos para o foco infeccioso, dentre outras desordens inflamatórias, que levam ao choque séptico e provocam a morte (Benjamim, 2001; Alves et al. 2005). O pré-tratamento com proteínas do látex de *C. candamarcensis* foi capaz de aumentar a sobrevivência de camundongos infectados com *S. Typhimurium*, de maneira dose-dependente. Esta proteção não foi devido à depuração de bactérias no fluido peritoneal, sangue ou baço dos animais. Mas houve uma diminuição significativa na quantidade de bactérias no fígado dos animais experimentais após 72 horas de infecção, o que sugere que P1G10 estimulou a capacidade de eliminação de bactérias neste órgão. Análise do fígado e do baço dos animais controles após 72 horas de infecção, evidenciou a presença de danos histológicos mais intensos que os órgãos dos grupos experimentais neste mesmo período, o que pode ter influenciado o aumento da sobrevivência dos animais pré-tratados com P1G10

No entanto, constatou-se que P1G10 não diminui a viabilidade de células de *S. Typhimurium in vitro* e, por conseguinte, a proteção foi possivelmente devido a um mecanismo imunológico. A fim de elucidar o efeito das proteínas na resposta inflamatória, camundongos não infectados foram administrados com P1G10 e, em seguida, inoculados com carragenina. Quando administrado por via intraperitoneal, P1G10 aumentou o estímulo pró-inflamatório desenvolvido pelo agente flogístico. Por outro lado, um efeito anti-inflamatório foi desencadeado quando P1G10 foi administrado por via endovenosa. Assim, a influência de P1G10 sobre a resposta imunológica varia de acordo com a via de inoculação. Considerando que as proteínas plasmáticas do sistema complemento desempenham importantes papéis durante o processo inflamatório, nós investigamos o papel de P1G10 na inibição da cascata do complemento utilizando um modelo *in vitro*.

Os resultados mostram que a lise de células bacterianas pelo sistema complemento foi prejudicada por P1G10, mas, este efeito foi revertido quando as proteínas foram desnaturadas por tratamento térmico. A ação do sistema complemento durante a infecção resulta na lise das células microbianas e na ativação da resposta inflamatória através de fragmentos peptídicos, tais como a C3a e C5a (Deng et al. 2011). Proteínas do complemento podem causar alterações na permeabilidade vascular, bem como regulação de moléculas de adesão envolvidas no recrutamento de neutrófilos (Gerard e Gerard, 1994; Walport, 2001a; Walport, 2001b). Assim, a atividade anti-complemento de P1G10 foi atribuído à ação de enzimas proteolíticas presentes na fração proteica de *C. candamarcensis*, que possivelmente inativaram proteínas “chaves” da cascata do complemento.

Anteriormente, mostramos que as proteínas do látex de *C. procerca* protegem camundongos contra *Salmonella* devido a uma sub-regulação de citocinas como IL-1 $\beta$  e regulação da liberação de óxido nítrico (Lima-Filho et al. 2010;. Oliveira et al. 2012). TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são importantes citocinas na resistência do hospedeiro contra as infecções sistêmicas (Van der Poll e Sauerwein, 1993). No entanto, altos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  são correlacionados com o grau de severidade de infecções sépticas, estando elevado nos casos de óbito (Casey et al, 1993; Gardlund et al, 1995). Além disso, a IL-1 tem como principal fonte de macrófagos estimuladas por TNF- $\alpha$  ou LPS bacteriano, e é responsável por promover o recrutamento de

leucócitos para o local de infecção (Benjamim, 2001). Por outro lado, camundongos deficientes na produção de IL-1 $\beta$  são resistentes ao choque séptico e tratamentos que diminuem a síntese de TNF- $\alpha$  têm sido utilizados para reduzir a mortalidade em lactentes prematuros com infecções sistêmicas (Lauterbach et al, 1994; Li et al. , 1995).

A ausência da expressão de IL-10 mRNA no fígado de animais pré-tratados com P1G10 confirmou que na fase aguda da infecção, ambos os grupos experimentais e controle desenvolveram um forte processo inflamatório. No entanto, embora o pré-tratamento com P1G10 tenha diminuído a expressão gênica de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , não houve nenhuma falha de infiltração de leucócitos para a cavidade peritoneal. Em vez disso, o choque séptico foi adiado, aumentando a sobrevivência após a infecção. Considerando o papel microbicida de óxido nítrico (ON) no meio intracelular, quantificamos a produção de ON no soro após infecção de animais pré-tratados com P1G10. O óxido nítrico é frequentemente libertado após a indução por citocinas da expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) , tais como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . No entanto, os níveis elevados de ON são responsáveis por vários efeitos patológicos durante sepse bacteriana (Benjamim, 2001). Os resultados aqui apresentados mostram que P1G10 não afetou a liberação de óxido nítrico, o que não foi decisivo no aumento da sobrevivência dos animais pré-tratados com P1G10 e infectadas com *Salmonella*.

## **Conclusão**

Neste estudo nós mostramos que as proteínas laticíferas de *C. candamarcensis* aumentam a sobrevivência de camundongos suíços infectados com *Salmonella* Typhimurium. Embora os mecanismos envolvidos nesta proteção não estejam completamente elucidado, a fração proteica P1G10 mostrou ser uma boa fonte de biomoléculas com promissoras propriedades anti-inflamatórias.

## **Agradecimentos**

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação cedeu um bolsa de estudo de mestrado para Maria Taciana Ralph. Dr. José Vitor Lima-Filho recebeu uma bolsa de estudos do Programa de Educação Tutorial - PET / MEC / SESu. Agradecemos também a Dr. Maria Helena Ribeiro pelo fornecimento dos animais utilizados no presente estudo.

## References

- Alencar NMN, Figueiredo IST, Vale MR, Bitencurt FS, Oliveira JS, Ribeiro RA, Ramos MV (2004) Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in three different experimental models: peritonitis, paw edema and hemorrhagic cystitis. *Planta Med* 70: 1144-1149
- Alves-Filho JC, Benjamim C, Tavares-Murta BM, Cunha FQ (2005) Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 223–226
- Baeza G, Correa D, Salas CE (1990) Proteolytic enzymes in *Carica candamarcensis*. *J Sci Food Agr* 51:1–9
- Benjamim, CF (2001) Present understanding of mediators and experimental models of sepsis. *Med* 34:18- 26.
- Casey LC, Balk RA, Bome RC (1993) Plasma cytokine and endotoxin levels correlates with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 119: 771-778
- Deng SE, Jensenius JC, Thiel S (2011) Disease-causing mutations in genes of the complement System. *Am J Hum Genet* 88: 689–705
- Dussault A-A, Pouliot M (2006) Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol Proced Onlinel* 8: 1-10
- Gardlund B, Sjolín J, Nilsson A, Roll M, Wickerts CJ, Wretling B (1995) Plasma levels of cytokines in primary septic shock in humans: correlation with disease severity. *J Infect Dis* 172: 296-301
- Gerard C and Gerard NP (1994) C5a anaphylatoxin and its seven transmembranesegment receptor. *Annu Rev Immuno*12: 775–808
- Gomes MTR, Mello VJ, Rodrigues KC, Bemquerer MP, Lopes MTP, Faça VM, Salas CE (2005) Isolation of two plant proteinases in látex from *Carica candamarcensis* acting as mitogenic for mammalian cells. *Planta Med* 71: 244–248
- Gomes FSL, Spínola CV, Ribeiro HA, Lopes MTP, Cassali GD, Salas CE (2010) Wound healing activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* on experimentally induced burns. *Burns* 36: 277- 283

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (2008). Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. MEDSI, Rio de Janeiro

Lauterbach R, Pawlik D, Kowalczyk D, Ksycíński W, Helwich E, Zembala M (1994) Effect of the immunomodulating agent, pentoxifylline, in the treatment of sepsis in prematurely delivered infants: a placebo-controlled, double-blind trial. Crit Care Med 27(4): 807-814

Leon J (2000) Botânica de Los Cultivos Tropicales. IICA, San Jose

Lima-Filho JVM, Patriota JM, Silva AFB, Pontes-Filho NT, Oliveira RSB, Alencar NMN, Ramos MV (2010) Proteins from Látex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella entérica* serovar Typhimurium. J Ethnopharmacol 129(3): 327–334

Li P, Ye X, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, McDowell J, Paskind M, Rodman L, Salfeld J, Towne E, Tracey D, Wardwell S, Wei FY, Woung W, Kamen R, Sessa DRI (1995) Mice deficient in IL-2beta-converting enzyme are deficient in production of mature IL-1beta and resistant to endotoxic shock. Cell 80: 401- 411

Lorenzi H (2000) Plantas Daninhas do Brasil – terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3ª Ed. Instituto Plantarum, São Paulo

Madic J, Hajsig D, Sostarić B, Curić S, Seol B, Naglić T, Cvetnić Z (1997) An outbreak of abortion in mares associated with *Salmonella abortusequi* infection. Equine Vet J 29: 230–233

Megid J, Assis MZ, Brito CJ, Lara VM (2001) Salmonelose em cães de experimentação. Braz J Vet Res Anim Sci 38: 44–45

Mello VJ, Gomes MTR, Lemos FO (2008) The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. Phytomedicine 15(4): 237–244

Oliveira RSB, Figueiredo IST, Freitas LBN, Pinheiro RSP, Brito GAC, Alencar NMN, Ramos MV, Ralph MT, Lima-Filho JV (2012) Inflammation induced by phytomodulatory proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against *Salmonella* infection in a murine model of typhoid fever. Inflamm Res 61( 7): 689–698

Ramos M V, Viana CA, Silva AFB, Freitas CDT, Figueiredo IST, Oliveira RSB, Alencar NMN, Lima-Filho JVM, Kumar VL (2012) Proteins derived from latex of *C. procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 385:455–463

- Samuelsen O, Haukland HH, Ulvatne H, Vorland LH (2004) Anti-complement effects of lactoferrin-derived peptides. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41(2) 141-148
- Silva CA, Mello VJ, Lopes MTP, Val CG, Gomes MTR, Ferreira RS, Rodrigues KCL, Salas CE (2003) A mitogenic protein fraction in latex from *Carica candamarcensis*. *Planta Med* 69: 926–932
- Souza GEP, Ferreira SH (1985) Blockade by anti-macrophages serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agente and Actions* 17: 97-103
- Teixeira RD, Ribeiro HA, Gomes MT, Lopes MT, Salas CE (2008) The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. *Plant Physiol Biochem* 46: 956-961
- Van der Poll T, Sauerwein HP (1993) Tumor necrosis factor-alpha: its role in the metabolic response to sepsis. *Clin Sci* 84(3): 247-256
- Villalba MIC (2010) Avaliação de parâmetros toxicológicos da fração P1G10, obtida do látex de *Carica candamarcensis*. Dissertation, Universidade Federal de Minas Gerais
- Walport MJ (2001a) Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344: 1058–1066
- Walport MJ (2001b) Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 344: 1140–1144
- Walraevens V, Vandermeers-Piret MC, Vandermeers A, Gourlet P and P. Robberecht (1999) Isolation and primary structure of the CCI papain-like cysteine proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* hook. *Biochem Biophys Res Commun* 380(4): 485–488
- Zhang S, Kingsley RA, Santos RL, Andrews-Polymenis H, Raffatellu M, Figueiredo J, Nunes J, Tsolis RM, Adams LG, Bäumlner AJ (2003) Molecular Pathogenesis of Salmonella enteric Serotype Typhimurium – induce Diarrhea. *Infect Immun* 71: 1–12



## Lista de Figuras

**Fig.1** Sobrevivência de animais pré-tratados com P1G10 e infectados com *Salmonella* Typhimurium. Os grupos experimentais foram tratados com 1 mg / kg (quadrado preto), 5 mg / kg (triângulo preto) ou 10 mg / kg (círculo preto) de P1G10 por via intraperitoneal. O grupo controle recebeu PBS (círculos brancos). (a) Sobrevivência dos animais foi observado durante sete dias após a infecção por *Salmonella*; (b) Contagens totais de leucócitos no fluido peritoneal de animais previamente tratados com P1G10 e infectadas com *Salmonella typhimurium*. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM e a comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. O intervalo de confiança foi determinado com  $p < 0,05$ . \* Diferença significativa entre P1G10 e grupos PBS

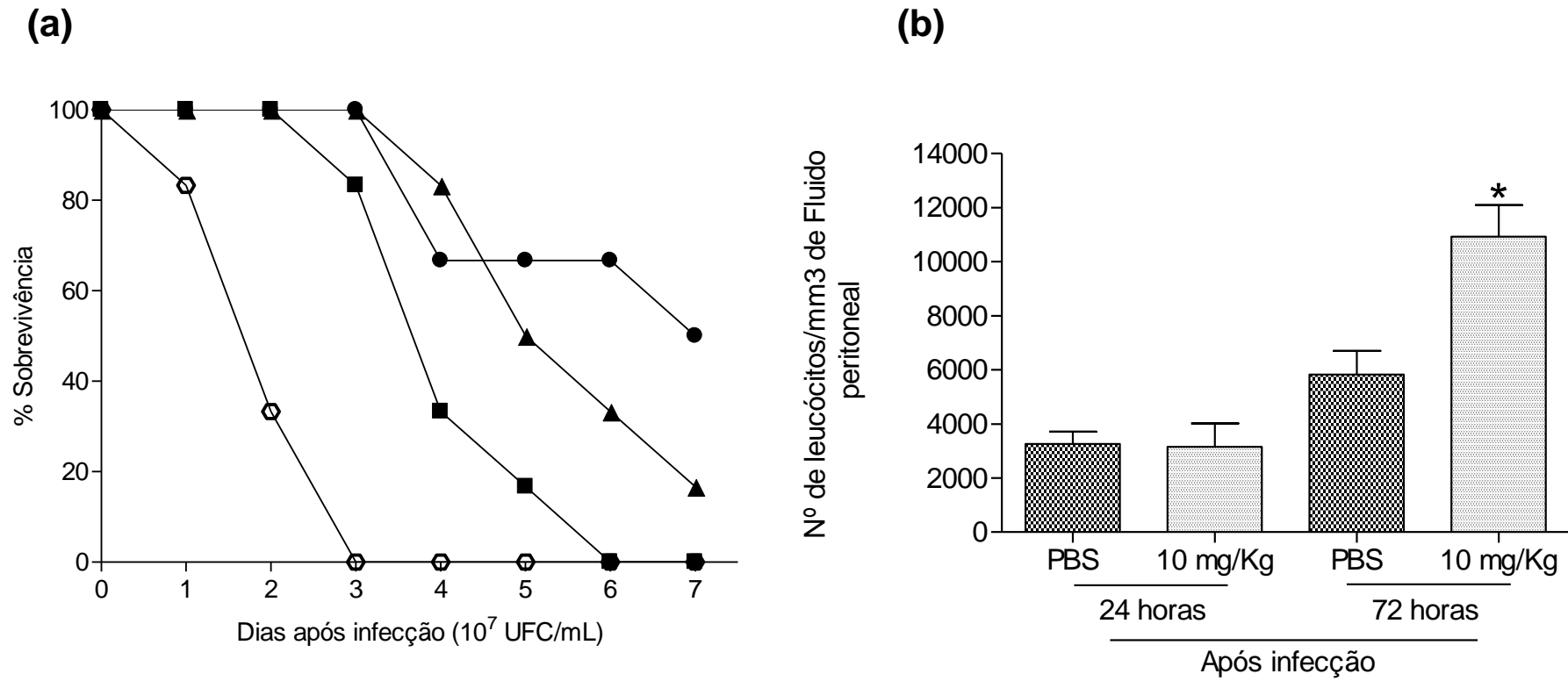
**Fig. 2** Padrão histológico do fígado e do baço de camundongos pré-tratados com P1G10 72 horas após a infecção por *Salmonella* Typhimurium. (a) Fígado de camundongo no grupo PBS, mostrando severa vacuolização, necrose individual de hepatócitos com distribuição difusa (seta fina) e trombose (estrela); (b) Fígado de camundongo no grupo experimental (P1G10, 10 mg /kg) , demonstrando necrose hepática (seta fina) e acúmulo de células mononucleares (seta larga); (c)Baço de camundongo do grupo controle, mostrando depleção linfóide (seta fina) e a presença de células gigantes (seta larga); (d) Baço de camundongos no grupo experimental com aparência preservada da polpa branca e polpa vermelha

**Fig. 3** Contagens totais de leucócitos no fluido peritoneal de camundongos suíços pré-tratados com P1G10 no modelo de peritonite induzido por carragenina. Os camundongos foram tratados com 1, 5, 10 mg / kg de P1G10, intravenosamente ou intraperitonealmente, e 30 minutos mais tarde receberam 500 mg de carragenina por via intraperitoneal. Os grupos controle receberam PBS. A migração de leucócitos para dentro da cavidade peritoneal de todos os grupos de animais foi avaliada 6 horas após a administração do agente flogístico. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM e comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. O intervalo de confiança foi determinado com  $p < 0,05$ . \* Diferença significativa entre P1G10 e grupos PBS

**Fig.4** Atividade anti-complemento *in vitro* de P1G10. O soro humano (a) ou soro de ovelha (b) foram pré-tratados com P1G10, em concentrações de 1 mg / mL (triângulo preto), 5 mg / mL (quadrado preto), 10 mg / ml (círculos pretos) ou de 10 mg / ml de calor desnatura P1G10 (100 ° C/30 min) (triângulo branco), e depois foram expostos a uma cultura de *Escherichia coli*. Os grupos de controle foram formados por soro ativos (quadrado vazio) ou soro inativado pelo calor (círculo branco) desprovidos de P1G10. O número de unidades formadoras de colônias foi quantificado em horários predeterminados

**Fig. 5** Libertação de óxido nítrico e os resultados comparativos de PCR em tempo real expressos em vezes de aumento, para o TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  nas células do fígado de camundongos pré-tratados com P1G10 e infectadas com *Salmonella typhimurium*. Os grupos experimentais foram tratados com 10 mg / kg de P1G10 enuqnato os grupos controle receberam PBS 24 horas antes do desafio com *Salmonella Typhimurium* ( $10^7$  CFU / mL). (a) Expressão gênica de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  relativas a camundongos do grupo controle. (B) Resultados da produção de óxido nítrico foram expressos como média  $\pm$  EPM e a comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. O intervalo de confiança foi determinado com  $p < 0,05$

Fig. 1



**Fig. 2**

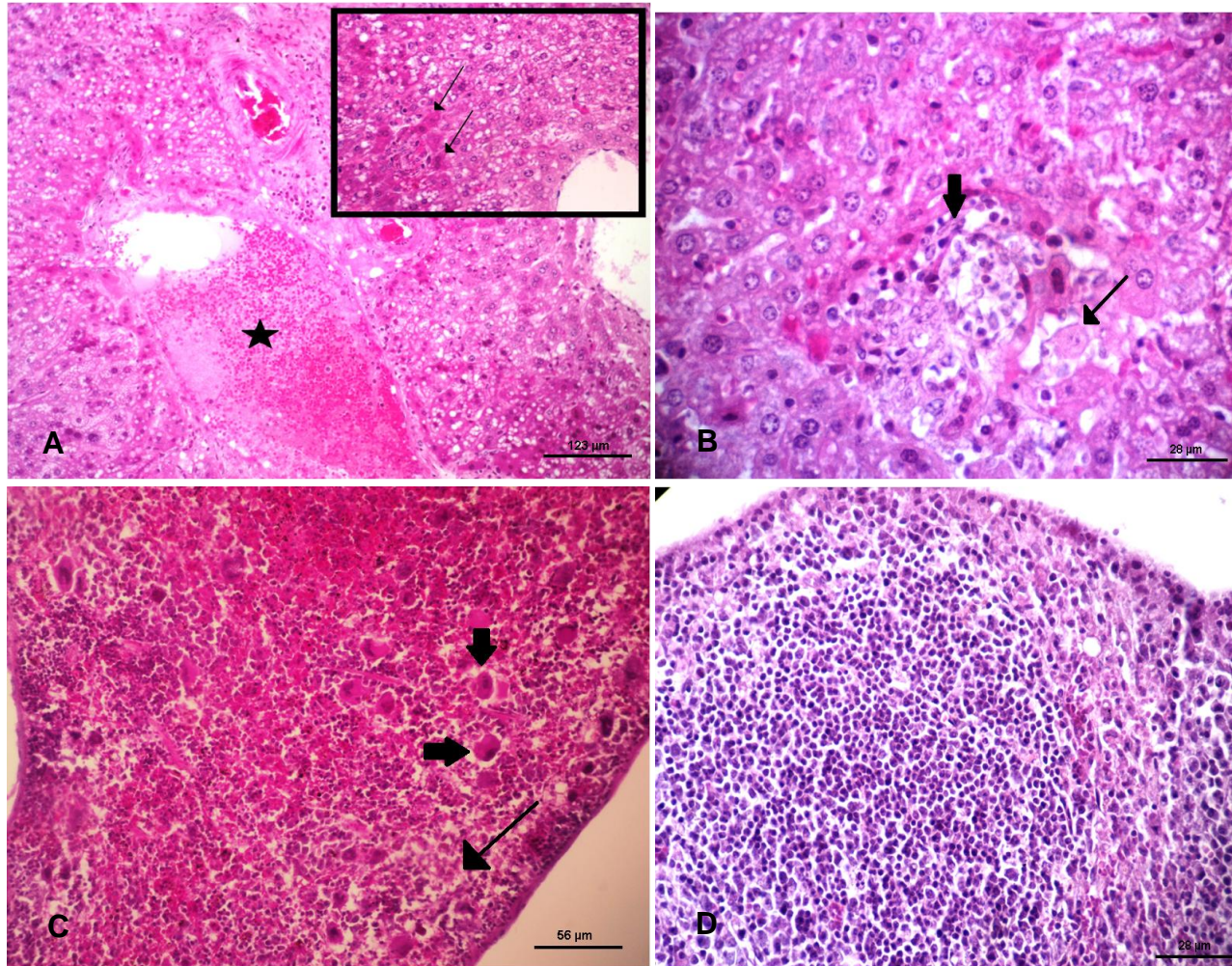


Fig. 3

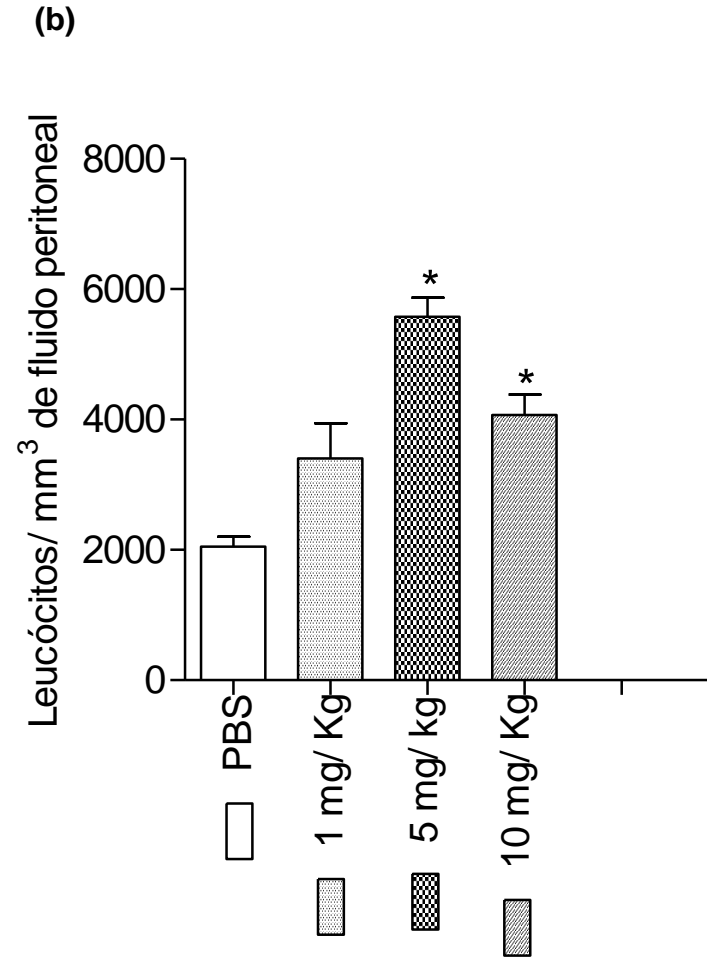
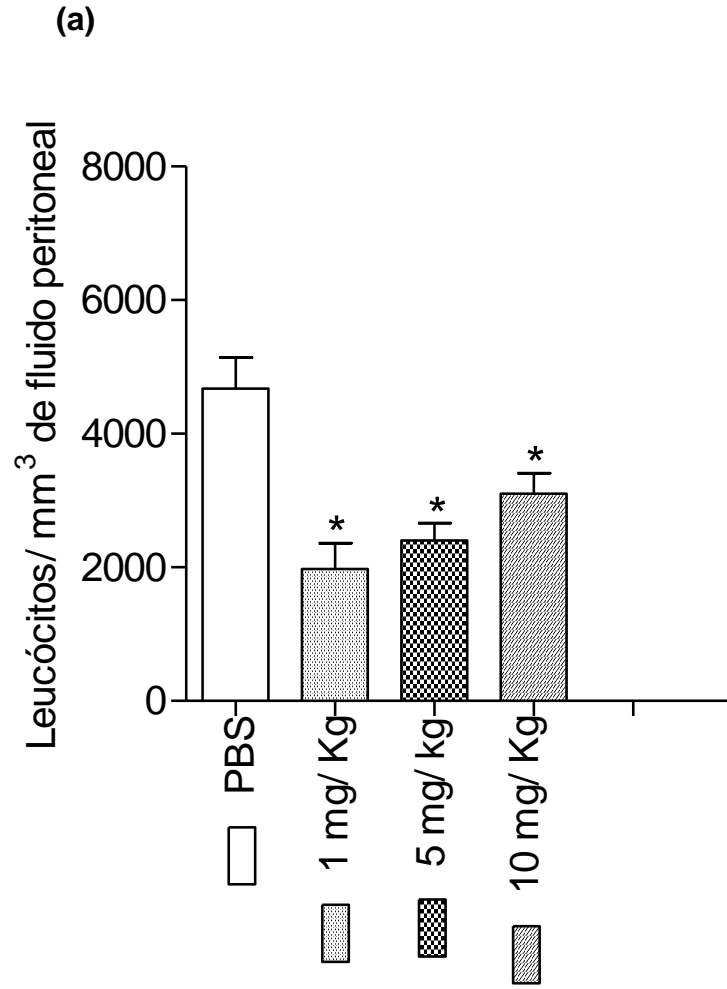
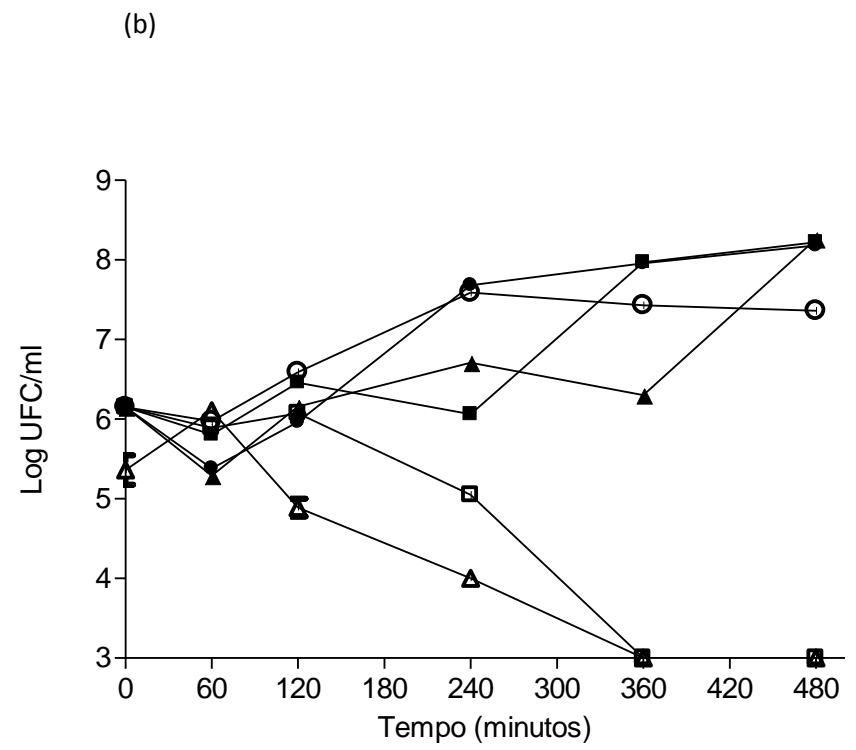
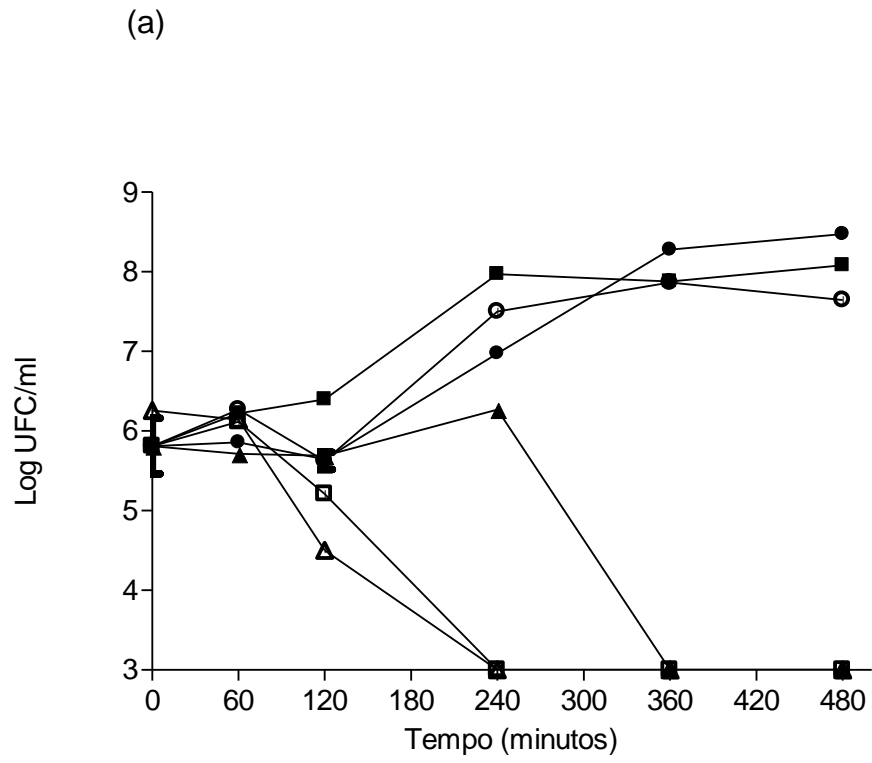
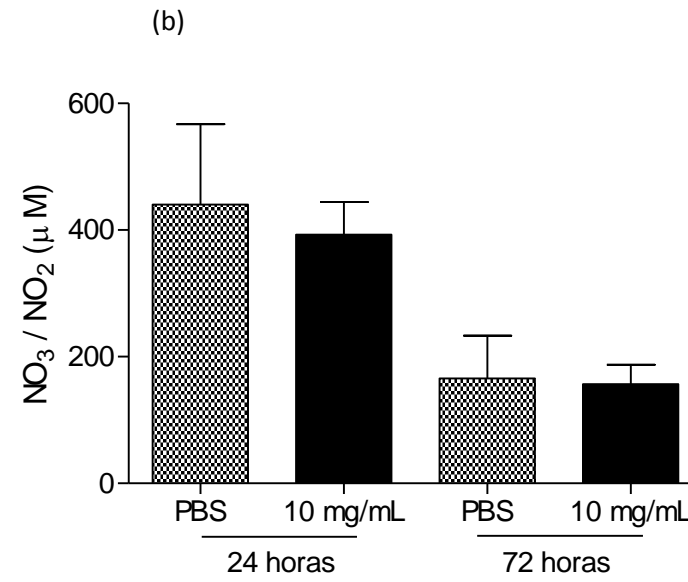
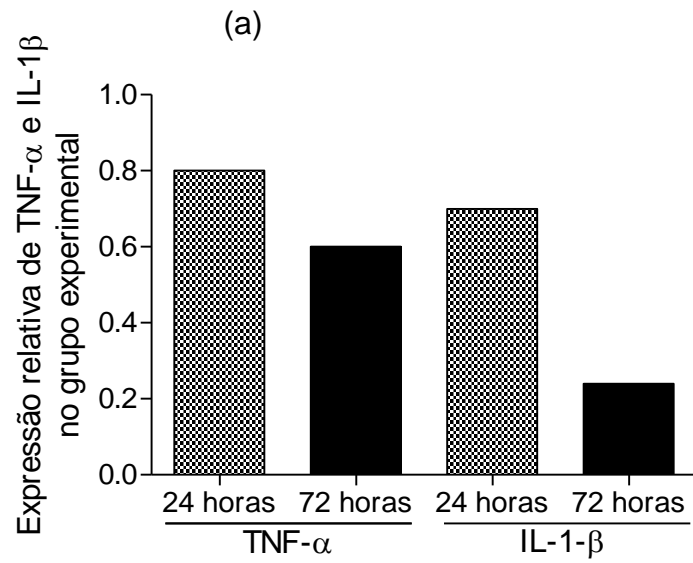


Fig. 4



**Fig. 5**



**Protein fraction P1G10 from latex of *Carica candamarcensis* increases survival of Swiss mice infected with *Salmonella enterica* Ser. Typhimurium**

Maria Taciana Ralph<sup>1</sup>, Ayrles Fernanda Brandão Silva<sup>2</sup>, Dayane Laíse da Silva<sup>1</sup>, Danielle Cristina Oliveira do Nascimento<sup>1</sup>, Diogo Manoel Farias da Silva<sup>3</sup>, Manoel Adrião Gomes Filho<sup>3</sup>, Paulo Roberto Eleutério Souza<sup>1</sup>, Joaquim Evêncio Neto<sup>3</sup>, Carlos Edmundo Salas<sup>4</sup>, José Vitor Lima Filho<sup>1</sup> \*.

1. Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brazil.
2. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brazil
3. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brazil.
4. Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, Brazil.

\* Corresponding author: José Vitor Lima Filho, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Departamento de Biologia, Campus Dois Irmãos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco CEP 52171-900, Brazil.  
E-mail: [jvitor@db.ufrpe.br](mailto:jvitor@db.ufrpe.br), Tel: + 55 31 81 33206312



## **Abstract**

**Purpose:** To investigate the potential of protein fraction P1G10 of *Carica candamarcensis* (Caricaceae) to control the inflammatory response of Swiss mice infected with *Salmonella enterica* Ser. Typhimurium, the murine model of human typhoid fever.

**Methods:** The animals received P1G10 (1, 5 or 10 mg/kg) or PBS, via i.p., 24 hours prior to infection with *S. Typhimurium* ( $10^7$  CFU/ml), also by i.p. Survival and leukocyte cell infiltration into the peritoneal cavity were evaluated during infection. The contents of nitric oxide (NO) in serum and the gene expression of pro-inflammatory cytokines were also investigated. The carrageenan-peritonitis model was conducted with uninfected mice administered with P1G10 (10 mg/Kg), and anti-complement activity was evaluated *in vitro*.

**Results:** The survival of the animals pretreated with P1G10 (10 mg/kg) was 60% seven days after infection, while the PBS group died in one to three days. After infection, the leukocyte cell infiltration into the peritoneal cavity was higher in mice administered with P1G10. The NO contents were similar among mice of all groups, but there was a decrease in the mRNA expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . In uninfected mice, the administration of P1G10 given intravenously reduced the leukocyte cell infiltration into the peritoneal cavity induced by carrageenan. Conversely, its intraperitoneal administration increased inflammation induced by the phlogistic agent. Also, P1G10 was shown to have anti-complement activity, which was attributed to the presence of proteins with proteinasic activity.

**Conclusion:** The protein fraction P1G10 of *C. candamarcensis* is a potentially attractive source of biomolecules with anti-inflammatory properties.

**Keywords:** Inflammation, *Salmonella* Typhimurium, Laticifer proteins.

## Introduction

*Carica candamarcensis* is a plant native to western South America belonging to the family Caricaceae (Leon, 2000; Lorenzi, 2000). Popularly known as mountain papaya, this plant is known for releasing a large amount of latex from the leaves and outer layers of the endocarp after fruit injury (Walraevens et al., 1999). This latex is mainly obtained from immature fruits, which have high levels of carbohydrates, vitamins, minerals and proteins (Baeza et al. 1990). Previously, Silva et al. (2003) separated protein fractions obtained from latex by chromatography in a Sephadex column, called P1G10 and P2G10. The P1G10 fraction is rich in cysteine proteinases with proteolytic activity at least five times higher than *C. papaya* (Baeza et al. 1990; Teixeira et al. 2008). These biological activities have been investigated in different experimental models.

The P1G10 protein fraction has mitogenic activity in cultured fibroblasts and epithelial cells (Gomes et al., 2005) and anti-ulcerogenic action, with effects on gastric healing that are correlated with the angiogenic stimulus (Mello et al., 2008). Moreover, a shortening of epithelialization was also demonstrated in a skin burn injury model when P1G10 was applied at a concentration of 0.1% (Gomes et al. 2010). Thus, the latex of *C. candamarcensis* is a potential source of bioactive compounds with pharmacological properties. However, little is known about its immunomodulatory effect in the course of different stimuli.

Previous data on laticifer proteins from *Calotropis procera* (Asclepiadaceae), which is also rich in cysteine proteinases, have shown they can prevent septic shock caused by *Salmonella enterica* Ser. Typhimurium (Lima-Filho et al., 2010; Oliveira et al., 2012). In addition, these proteins maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities (Ramos et al., 2012). In the present study, we investigated the influence of P1G10 on inflammatory response in Swiss mice experimentally infected with *S. Typhimurium*.

## Methods

All procedures were conducted in accordance with internationally accepted principles on the use of laboratory animals and were approved by the experimental ethics committee of the Pernambuco Federal Rural University (process 23082.012528/2012-14).

### *C. candamarcensis* latex proteins

The latex of *C. candamarcensis* was collected by several incisions on the surface of the green fruit with sharp blade. After collection, the latex was lyophilized and stored in the dark at -20 °C until use. This sample was dissolved and then equilibrated with sodium acetate buffer 1.0 M and applied in a Sephadex G10 column. The samples were screened by determining the absorbance at 280 nm and the amidase activity (Silva et al., 2003). The first peak with amidase activity constituted the fraction P1G10.

## Microorganisms

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium was isolated from a human clinical case sample, maintained by Ezequiel Dias Foundation (FUNED, Belo Horizonte, MG, Brazil), and was kindly provided by Dr. Jacques Robert Nicoli (Federal University of Minas Gerais, Brazil). The bacteria were kept at -18 °C in brain heart infusion (BHI) culture medium containing 50% glycerol. During the experiments, the bacteria were activated by culturing in BHI broth for 24 hours at 37 °C.

## *In vitro* antimicrobial activity

The antimicrobial activity of P1G10 was assessed using the broth dilution method (Koneman et al., 2008). The proteins were dissolved in phosphate buffered saline (PBS) to give final concentrations ranging from 1 mg/ml to 0.0019 mg/ml in Mueller-Hinton broth tubes containing *S. Typhimurium* ( $10^5$  CFU/ml). All assays were performed in duplicate. Control tubes were lacking latex proteins. The minimum inhibitory concentration was estimated as the lowest concentration that inhibited visible growth after incubation for 24 h at 37 °C.

## Animals

Swiss mice (*Mus musculus*) were obtained from the collection of the Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA) of Federal University of Pernambuco. The mice weighed 30-35 grams and were kept in cages with controlled lighting (12-h light/dark cycles), 25 °C with free access to water and commercial feed (Purina, Paulina, SP, Brazil). The experiments were performed at the Microbiology and Immunology Laboratory of Federal Rural University of Pernambuco.

## Experimental design

The mice were divided into four groups (n = 6) as follows: experimental groups were administered intraperitoneally with 0.2 ml of P1G10 at concentrations of 1 mg/kg, 5 mg/kg or 10 mg/kg (in sterile PBS, pH 7.2), while the control group received 0.2 ml of PBS. After 24 hours, all animals were challenged by the intraperitoneal route with a solution containing  $10^7$  cells of *Salmonella* Typhimurium. The clinical symptoms and survival after infection were monitored every 24 hours for seven days. Surviving animals were subjected to euthanasia with isoflurane at the end of experiment (Lima-Filho et al., 2010; Villalba, 2010). Based on the results of the survival test, another group of mice (n = 10) was administered with 10mg/kg of P1G10 and infected with *S. Typhimurium* following the experimental protocol described above. The control group (n = 10) received PBS, according to the scheme followed for experimental peers. In this case, the animals were submitted to euthanasia 24 h and 72 h after infection.

### *Histopathological analysis*

Tissue samples of spleen and liver of the animals were fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin blocks. Histological sections with 5µm thickness were stained with hematoxylin-eosin. The slides were examined by a single pathologist, who was unaware of the experimental conditions.

### *Evaluation of bacterial clearance*

The spleen and livers were removed aseptically and homogenized in PBS pH 7.2. The suspensions of these organs and samples of blood and peritoneal fluid were submitted to serial decimal dilutions. Then, an aliquot of 0.1 ml of each dilution was plated on MacConkey agar plates. The plates were incubated in a growth chamber for 24 h at 37 °C for later quantification of the colony forming units (CFU/gram of organ or ml of blood or peritoneal fluid) (Oliveira et al., 2012).

### *Total and differential leukocyte cell counts*

For the total leukocyte count in the blood and peritoneal fluid, 20 µl was homogenized with 380 µL of the Turk reagent. An aliquot of this solution was withdrawn and placed in a Neubauer chamber, and leukocytes were counted under an optical microscope. The differential count was made from smears stained with eosin methylene blue - Giemsa (Souza and Ferreira, 1985).

### *Analysis of cytokine gene expression*

A section of each animal's liver was removed aseptically and homogenized in 0.5ml of TRIzol® Reagent (Invitrogen) to extract total RNA, following the protocol suggested by the manufacturer. Quantification of RNA was performed by spectrophotometry at 260 nm and its integrity was confirmed by electrophoresis on 1% agarose gel (Oliveira et al., 2012). The construction of cDNA and amplification by real-time PCR were performed using a commercial kit (Sigma-SYBR-Green Quantitative RT-PCR kit). We analyzed the expressions of the following primers: Beta-Actin Mouse (Internal Control) (forward 5'ATATCGCTGCGCTGGTCGTC 3', reverse 5'AGGATGGCGTGAGGGAGAGC 3'), tumor necrosis factor-α (TNF-α) (forward 5'GATCTCAAA GACAACCAACTAGTG 3', reverse 5' CTCCAGCTGGAAGACTCCTCCCAG 3'), interleukin-1β (IL-1β) (forward 5'AATCTCACAGCAGCACATCAA 3', reverse 5'AGCCCATACTTTAGGAAGACA 3') and interleukin -10 (IL-10) (forward 5'CGGGAAGACAATAACTG 3', reverse 5'CATTTCCGATAAGGCTTG 3'). The results were analyzed according to Dussault and Pouliot (2006) and compared to the expression of genes of interest (G.I) between control and experimental group with the following formula:

$$\Delta\Delta Ct = [(Ct \text{ G.I. Control} - Ct \text{ Actin Control}) - (Ct \text{ G.I. Experimental} - Ct \text{ actin Experimental})]$$

For approximation of the fold variation measurements, we used the formula:  $2^{\Delta\Delta Ct}$

#### *Quantification of nitric oxide in serum of animals*

The determination of nitric oxide in blood serum was carried out in the form of nitrite. The conversion of nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) to nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) was performed by the action of the enzyme nitrate reductase, using a commercial kit (R & D Systems).

#### *PIG10 influence on the inflammation model of peritonitis by carrageenan*

The protocol followed Alencar et al. (2004). The protein fraction P1G10 of *C. candamarcensis* was administered at concentrations of 1 mg/kg, 5 mg/kg, or 10 mg/kg, intravenously or intraperitoneally, to uninfected Swiss mice. The control groups were administered with PBS. After 30 minutes, the peritonitis was induced by intraperitoneal administration of 0.2 ml of a carrageenan solution (500 mg/animal). After 6 h, the animals were euthanized under anesthesia with isoflurane. The total and differential count of leukocytes in the blood and peritoneal fluid was carried out as described previously.

#### *PIG10 influence on the activation of the complement system*

The following method was adapted from Samuelsen et al. (2004). Human or sheep sera (180 µl) were added to 96-well microplates. Then, 10 µl of P1G10 was added to the wells to yield final concentrations of 1 mg/ml, 5 mg/ml or 10 mg/ml. P1G10 denatured by heat (10mg/ml - 100 °C for 30 min) was also tested. The microplates were incubated at 37 °C for 5 min, and then 10 µl of bacterial suspension of *Escherichia coli* (10<sup>6</sup> CFU/ml) was added to the wells. Wells containing intact or heat-denatured serum (56 °C/30 min), and *E. coli* devoid of P1G10 were used as controls. The plates were incubated at 37 °C, and 20 µL aliquots were removed from each well after 60, 120, 240, 360 and 480 minutes for quantification of colony forming units on MacConkey agar. The plates were incubated at 37 °C for 24 h and the results were expressed as CFU/ml. All tests were performed in duplicate.

#### Statistical Analysis

The results are expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M). For comparison of multiple parametric data, we used analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test or the Student-Newman-

Keuls test. The minimum significance level is considered as  $p < 0.05$ . The analysis and processing of the results was performed using the GraphPad Prism program.

## Results

Swiss mice pretreated with single inocula of P1G10 showed higher survival, which was dose-dependent, whereas untreated animals succumbed by the third day after infection by *Salmonella* (Fig. 1a). The highest survival rate was observed with the dose of 10 mg/kg (60%), this being the dose used to perform the other experiments. After 24 and 72 hours of infection, the number of viable bacteria in the spleen, blood and peritoneal fluid did not differ significantly in animals pretreated with P1G10 or the control group ( $p > 0.05$ ). However, there was a decrease in the number of viable bacteria in the liver of experimental animals 72 h after infection ( $p < 0.05$ ) (data not shown). However, an *in vitro* antibacterial assay showed that P1G10 did not inhibit the growth of *S. Typhimurium* at the highest concentration of 1 mg/ml.

Pretreatment with P1G10 (10 mg/ml) induced significant migration of leukocytes into the peritoneal cavity in the infected group compared to the untreated controls after 72 h of infection ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1b). There were no changes in hematological profile of leukocyte populations in the blood of these animals (data not shown). The histological evaluation of the liver of the control animals after 72 h of infection revealed inflammatory infiltration, thrombus formation, pyknotic nuclei, hepatic necrosis and diffuse intense cytoplasmic vacuolization (Fig. 2a). In the same period, the liver of animals pretreated with P1G10 showed mild vacuolization of hepatocytes, mild signs of necrosis, presence of microabscesses and accumulations of mononuclear cells (Fig. 2b). The analysis of the spleen of the control animals 72 h after infection revealed that the presence of splenic parenchyma in areas of inflammation and necrosis in lymphoid depletion with multinucleated cells (Fig. 2c), while the spleen of animals pretreated with protein only had slight inflammation and absence of multinucleated giant cells (Fig. 2d).

The experimental inflammation with carrageenan in uninfected animals showed that pretreatment with P1G10 carried out intravenously sharply reduced the infiltration of leukocytes into the peritoneal cavity ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3a). Conversely, migration of leukocytes was potentiated when the protein fraction was administered intraperitoneally ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3b). Furthermore, the protein fraction P1G10, when tested *in vitro* at concentrations of 5 mg/ml and 10 mg/ml, was able to inhibit the complement system cascade, preventing cell lyses of *E. coli* (Fig. 4). However, when P1G10 were denatured by heat (100 °C/30min), the complement system eliminated the bacteria as usual (Fig. 4).

The observation of TNF- $\alpha$  transcripts in liver cells confirmed small decreases of 0.8 and 0.6 fold in groups treated with P1G10, 24 and 72 h after infection, respectively (Fig. 5a). The gene expression of IL-1 $\beta$  also showed a relative decrease of 0.7 and 0.2 fold in the treated group, respectively (Fig. 5a). There was no IL-10 transcripts in any of the groups or any significant modification of the production of nitric oxide in serum (Fig. 5b).

## Discussion

In the murine model, *S. Typhimurium* induces a syndrome similar to human typhoid fever caused by *S. Typhi* (Medic et al., 1997; Megid et al., 2001; Zhang et al., 2003). Systemic infections caused by *S. Typhimurium* typically cause failure of the migration of leukocytes to the infection site, among other inflammatory disorders, leading to septic shock and death (Benjamim, 2001; Alves et al., 2005). Pretreatment with latex proteins from *C. candamarcensis* was able to increase survival of mice infected with *S. Typhimurium* in a dose-dependent manner. This protection was not due to the clearance of bacteria in the peritoneal fluid, blood or spleen. But there was a significant decrease in the number of bacteria in the liver of experimental animals after 72 h of infection, suggesting that P1G10 stimulated the clearance capacity in that organ. Analysis of the liver and spleen of control animals 72 h after infection showed more severe histological damage to the organs than those of mice in the experimental groups, which may also have influenced the survival.

Nevertheless, we confirmed that P1G10 did not decrease *in vitro* cell viability of *S. Typhimurium* and therefore protection was possibly due to an immune mechanism. In order to clarify the effect of proteins on the inflammatory response, uninfected mice were administered with P1G10 and then inoculated with carrageenan. When administered intraperitoneally, P1G10 augmented the pro-inflammatory stimulus developed by the phlogistic agent. On the other hand, an anti-inflammatory effect was triggered when P1G10 was administered intravenously. Thus, the onset of the immune response varied with the route of inflammatory stimulus. Since plasma proteins of the complement system trigger various inflammatory events, we investigated the role of P1G10 on inhibition of the complement cascade using an *in vitro* model.

The results showed that bacterial cell lysis was impaired by P1G10, but this effect reverted when proteins were denatured by heat treatment. The action of the complement system during infection results in lysis of microbial cells and activation of the inflammatory response through peptide fragments, such as C3a and C5a (Deng et al. 2011). Complement proteins may cause changes in vascular permeability as well as regulation of adhesion molecules involved in recruiting neutrophils (Gerard and Gerard, 1994; Walport, 2001a; Walport, 2001b). Thus, the anti-complement activity of P1G10 was attributed to the action of proteolytic enzymes present in the protein fraction of *C. candamarcensis*, which possibly inactivated key proteins of complement cascade.

Previously, we showed that latex proteins of *C. procera* protected mice against *Salmonella* due to a down-regulation of cytokines such as IL-1 $\beta$  and regulation of the nitric oxide release (Lima-Filho et al., 2010; Oliveira et al. 2012). TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are important on host resistance against systemic infections (Van der Poll and Sauerwein, 1993). But high serum levels of TNF- $\alpha$  increases the severity of septic infections, with higher levels noted in patients who died (Casey et al., 1993; Gardlund et al., 1995). In addition, IL-1 has as main source macrophages stimulated by TNF- $\alpha$  or bacterial LPS, and is responsible for promoting the recruitment of leukocytes to the infection site (Benjamim, 2001). Conversely, mice deficient in the production of IL-1 $\beta$  are resistant to septic shock and treatments that decrease the synthesis of TNF- $\alpha$  have been used to reduce mortality in premature infants with systemic infections (Lauterbach et al., 1994; Li et al., 1995).

The lack in IL-10 mRNA expression in the liver of animals pretreated with P1G10 confirmed that in the acute phase of infection, both experimental and control groups developed a strong inflammatory process. However, although pretreatment with P1G10 decreased TNF- $\alpha$  plus IL-1 $\beta$  gene expression, there was no failure of leukocyte cell infiltration into the peritoneal cavity. Instead, septic shock was delayed, increasing survival after infection. In view of the microbicidal role of nitric oxide (NO) in the intracellular environment, we investigated NO in sera after infection in mice pretreated with P1G10. Nitric oxide is often released after the inducible nitric oxide synthase (iNOS) is triggered by cytokines such as TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . However, high levels of NO are responsible for several pathological effects during bacterial sepsis (Benjamim, 2001). The results reported here show that P1G10 did not affect the nitric oxide release, which was not decisive in increasing survival of pretreated animals infected by *Salmonella*.

## **Conclusion**

In this study we showed that laticifer proteins of *C. candamarcensis* increased the survival of Swiss mice infected with *Salmonella* Typhimurium. Although the mechanisms involved on this protection are not completely elucidated, the protein fraction P1G10 was shown to be a good source of biomolecules with prospective anti-inflammatory properties.

## **Acknowledgements**

This study was funded by the Brazilian National Research Council (CNPq). The Office to Improve University Personnel (CAPES) of the Ministry of Education granted a master's scholarship to Maria Taciana Ralph. Dr. José Vitor Lima-Filho received a scholarship from Tutorial Education Program - PET/MEC/SESu. We also thank Dr. Maria Helena Ribeiro for supplying the animals used in the present study.



## References

- Alencar NMN, Figueiredo IST, Vale MR, Bitencurt FS, Oliveira JS, Ribeiro RA, Ramos MV (2004) Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in three different experimental models: peritonitis, paw edema and hemorrhagic cystitis. *Planta Med* 70: 1144-1149
- Alves-Filho JC, Benjamim C, Tavares-Murta BM, Cunha FQ (2005) Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. *Meml Inst Oswaldo Cruz* 100: 223–226
- Baeza G, Correa D, Salas CE (1990) Proteolytic enzymes in *Carica candamarcensis*. *J Sci Food Agr* 51:1–9
- Benjamim, CF (2001) Present understanding of mediators and experimental models of sepsis. *Med* 34:18- 26.
- Casey LC, Balk RA, Bome RC (1993) Plasma cytokine and endotoxin levels correlates with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 119: 771-778
- Deng SE, Jensenius JC, Thiel S (2011) Disease-causing mutations in genes of the complement System. *Am J Hum Genet* 88: 689–705
- Dussault A-A, Pouliot M (2006) Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol Proced Onlinel* 8: 1-10
- Gardlund B, Sjolín J, Nilsson A, Roll M, Wickerts CJ, Wretling B (1995) Plasma levels of cytokines in primary septic shock in humans: correlation with disease severity. *J Infect Dis* 172: 296-301
- Gerard C and Gerard NP (1994) C5a anaphylatoxin and its seven transmembranesegment receptor. *Annu Rev Immuno*12: 775–808
- Gomes MTR, Mello VJ, Rodrigues KC, Bemquerer MP, Lopes MTP, Faça VM, Salas CE (2005) Isolation of two plant proteinases in látex from *Carica candamarcensis* acting as mitogenic for mammalian cells. *Planta Med* 71: 244–248
- Gomes FSL, Spínola CV, Ribeiro HA, Lopes MTP, Cassali GD, Salas CE (2010) Wound healing activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* on experimentally induced burns. *Burns* 36: 277- 283
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (2008). *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. MEDSI, Rio de Janeiro
- Lauterbach R, Pawlik D, Kowalczyk D, Ksycínski W, Helwich E, Zembala M (1994) Effect of the immunomodulating agent, pentoxifylline, in the treatment of sepsis in prematurely delivered infants: a placebo-controlled, double-blind trial. *Crit Care Med* 27(4): 807-814
- Leon J (2000) *Botánica de Los Cultivos Tropicales*. IICA, San Jose
- Lima-Filho JVM, Patriota JM, Silva AFB, Pontes-Filho NT, Oliveira RSB, Alencar NMN, Ramos MV (2010) Proteins from Látex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Ethnopharmacol* 129(3): 327–334

- Li P, Ye X, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, McDowell J, Paskind M, Rodman L, Salfeld J, Towne E, Tracey D, Wardwell S, Wei FY, Woung W, Kamen R, Sessa DRI (1995) Mice deficient in IL-2beta-converting enzyme are deficient in production of mature IL-1beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* 80: 401-411
- Lorenzi H (2000) Plantas Daninhas do Brasil – terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3ª Ed. Instituto Plantarum, São Paulo
- Madic J, Hajsig D, Sostarić B, Curić S, Seol B, Naglić T, Cvetnić Z (1997) An outbreak of abortion in mares associated with *Salmonella abortusequi* infection. *Equine Vet J* 29: 230–233
- Megid J, Assis MZ, Brito CJ, Lara VM (2001) Salmonelose em cães de experimentação. *Braz J Vet Res Anim Sci* 38: 44–45
- Mello VJ, Gomes MTR, Lemos FO (2008) The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. *Phytomedicine* 15(4): 237–244
- Oliveira RSB, Figueiredo IST, Freitas LBN, Pinheiro RSP, Brito GAC, Alencar NMN, Ramos MV, Ralph MT, Lima-Filho JV (2012) Inflammation induced by phytochemical proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against *Salmonella* infection in a murine model of typhoid fever. *Inflamm Res* 61( 7): 689–698
- Ramos M V, Viana CA, Silva AFB, Freitas CDT, Figueiredo IST, Oliveira RSB, Alencar NMN, Lima-Filho JVM, Kumar VL (2012) Proteins derived from latex of *C. procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 385:455–463
- Samuelsen O, Haukland HH, Ulvatne H, Vorland LH (2004) Anti-complement effects of lactoferrin-derived peptides. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41(2) 141-148
- Silva CA, Mello VJ, Lopes MTP, Val CG, Gomes MTR, Ferreira RS, Rodrigues KCL, Salas CE (2003) A mitogenic protein fraction in latex from *Carica candamarcensis*. *Planta Med* 69: 926–932
- Souza GEP, Ferreira SH (1985) Blockade by anti-macrophages serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agents and Actions* 17: 97-103
- Teixeira RD, Ribeiro HA, Gomes MT, Lopes MT, Salas CE (2008) The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. *Plant Physiol Biochem* 46: 956-961
- Van der Poll T, Sauerwein HP (1993) Tumor necrosis factor-alpha: its role in the metabolic response to sepsis. *Clin Sci* 84(3): 247-256
- Villalba MIC (2010) Avaliação de parâmetros toxicológicos da fração P1G10, obtida do látex de *Carica candamarcensis*. Dissertation, Universidade Federal de Minas Gerais
- Walport MJ (2001a) Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344: 1058–1066
- Walport MJ (2001b) Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 344: 1140–1144

Walraevens V, Vandermeers-Piret MC, Vandermeers A, Gourlet P and P. Robberecht (1999) Isolation and primary structure of the CCI papain-like cysteine proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* hook. Biochem Bioph Res Commun 380(4): 485–488

Zhang S, Kingsley RA, Santos RL, Andrews-Polymenis H, Raffatellu M, Figueiredo J, Nunes J, Tsohis RM, Adams LG, Bäumlér AJ (2003) Molecular Pathogenesis of Salmonella enteric Serotype Typhimurium – induce Diarrhea. Infect Immun 71: 1–12

## Figure Legends

**Fig.1** Survival of animals pretreated with P1G10 and infected with *Salmonella* Typhimurium. Experimental groups were treated with 1 mg/kg (black square), 5 mg/kg (black triangle) or 10 mg/kg (black circle) of P1G10 intraperitoneally. The control groups received PBS (white circles). (a) The survival of the animals was observed for seven days after *Salmonella* infection; (b) Total leukocyte cell counts in the peritoneal fluid of animals pretreated with P1G10 and infected with *Salmonella* Typhimurium. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM and data comparison was by analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test. The confidence interval was determined with  $p < 0.05$ . \* Significant difference between P1G10 and PBS groups.

**Fig. 2** Histologic pattern of the liver and spleen of mice pretreated with P1G10 72 hours after infection by *Salmonella* Typhimurium. (a) Liver of mice in the PBS group, showing severe vacuolation, necrosis of individual hepatocytes with diffuse distribution (thin arrow) and thrombosis (star); (b) Liver of mice in the experimental group (P1G10, 10 mg/Kg), demonstrating hepatic necrosis (thin arrow) and accumulation of mononuclear cells (large arrow); (c) Spleens of mice in the control group, showing lymphoid depletion (thin arrow) and the presence of giant cells (large arrow); (d) Spleens of mice in the experimental group with preserved appearance of the white pulp and red pulp.

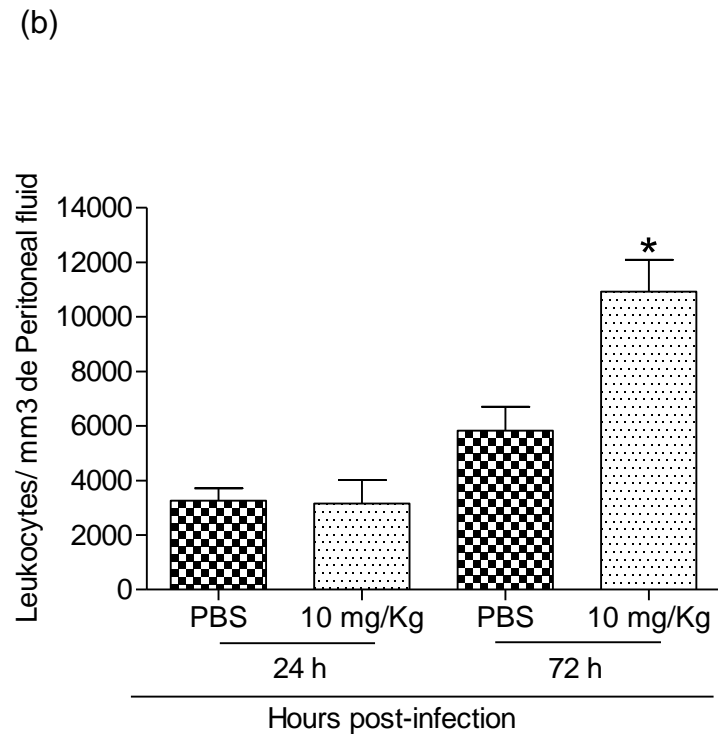
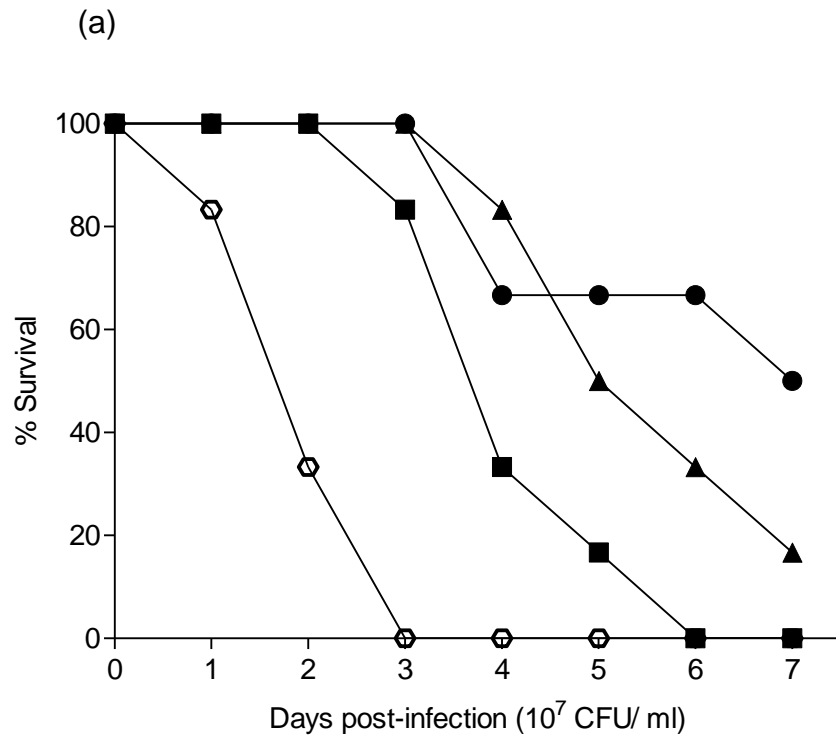
**Fig. 3** Total leukocyte cell counts in the peritoneal fluid of Swiss mice pretreated with P1G10 in carrageenan-induced peritonitis model. The mice were treated with 1, 5, 10 mg/kg of P1G10, intravenously or intraperitoneally, and 30 min later received 500  $\mu$ g of carrageenin through i.p. route. The control groups received PBS. The migration of leukocytes into the peritoneal cavity of all animal groups was evaluated 6 hours after administration of the flogistic agent. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM and data comparison was by analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test. The confidence interval was determined with  $p < 0.05$ . \* Significant difference between P1G10 and PBS groups.

**Fig. 4** *In vitro* anti-complement activity of P1G10. Human serum (a) or sheep serum (b) were pretreated with P1G10 at concentrations of 1 mg/ml (black triangle), 5 mg/ml (black square), 10 mg/ml (black circle) or 10 mg/ml of heat-denaturized P1G10 (100  $^{\circ}$ C/30min) (empty triangle), and then exposed to a culture of *Escherichia coli*. The control groups were formed by active serum (empty square) or heat-inactivated serum (white circle) devoid of P1G10. The number of colony forming units was quantified at predetermined times.

**Fig. 5** Nitric oxide release and comparative real-time PCR results expressed in fold increase, for TNF- $\alpha$  and IL1- $\beta$  in liver cells of mice pretreated with P1G10 and infected with *Salmonella* Typhimurium. Experimental groups were treated with 10 mg/kg of P1G10 whereas control groups received PBS 24 h before challenge with *Salmonella* Typhimurium ( $10^7$  CFU/ml). (a) The gene expression of TNF- $\alpha$  and IL1- $\beta$  relative to control mice is shown. (b) Results of nitric oxide production were expressed as mean  $\pm$  SEM and data comparison was by analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni

i test. The confidence interval was determined with  $p < 0.05$ .

Fig. 1



**Fig. 2**

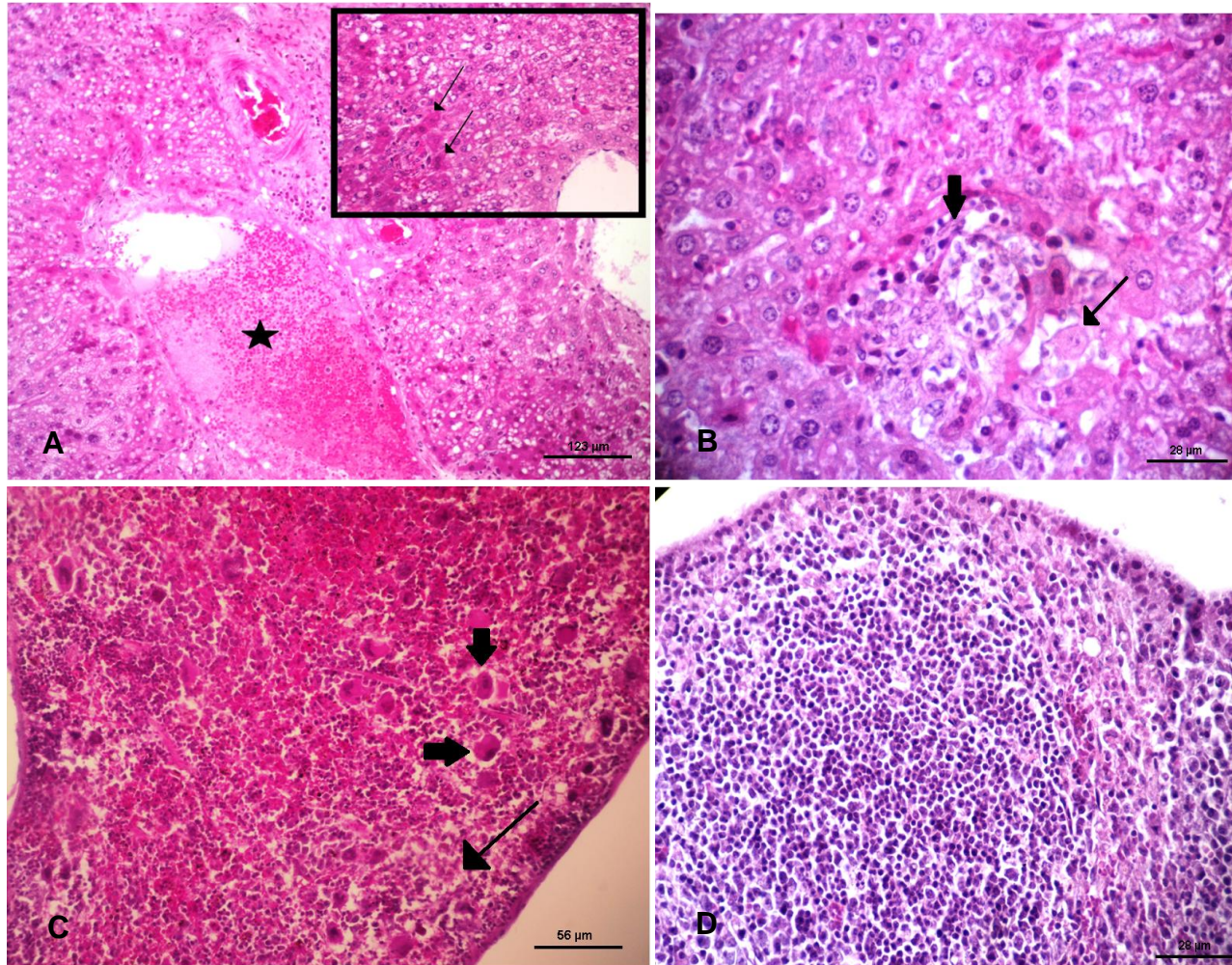
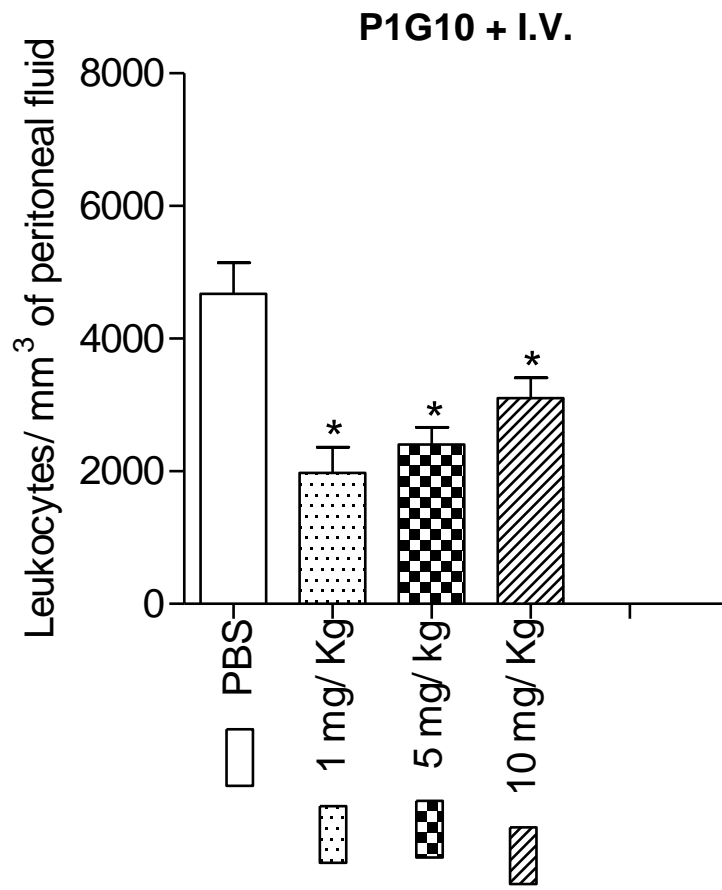
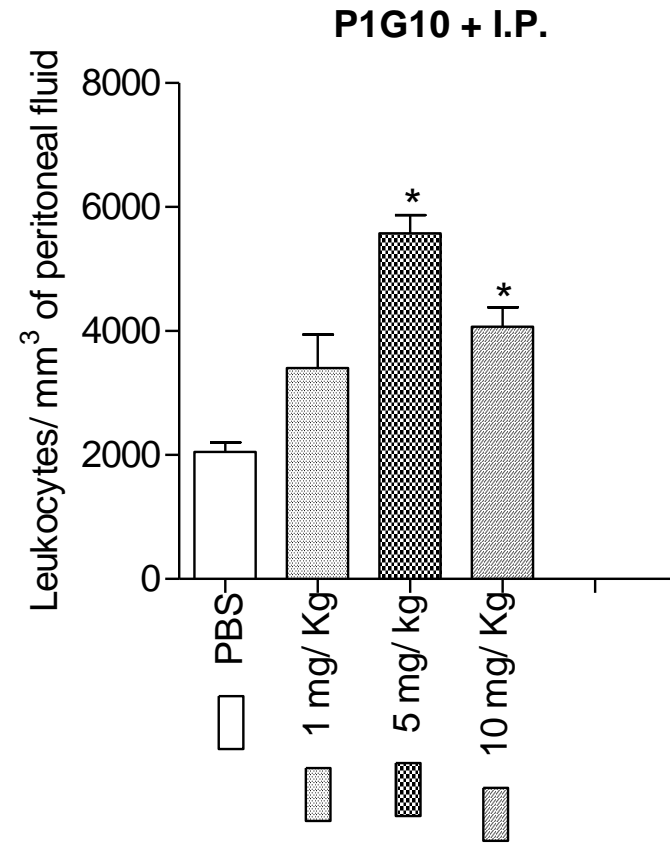


Fig. 3

(a)

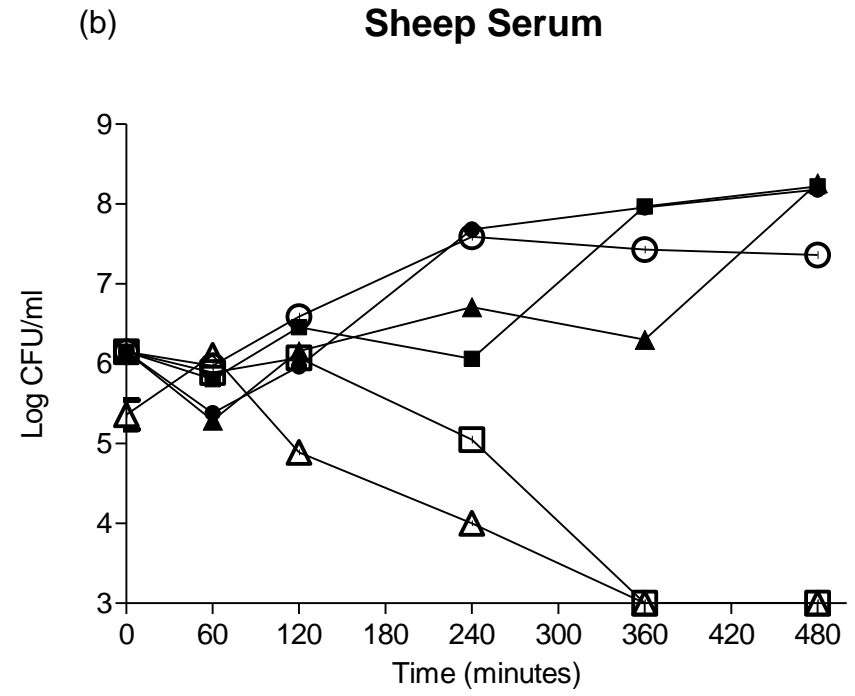
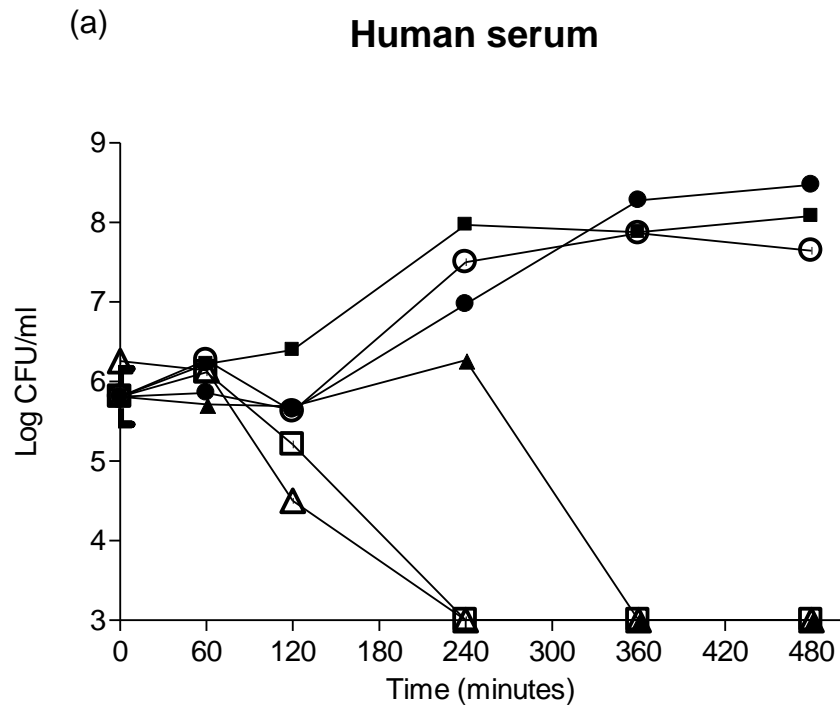


(b)



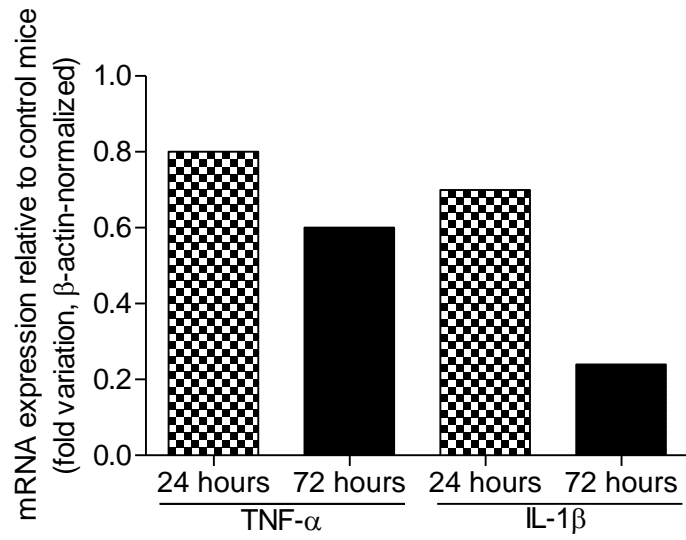


**Fig. 4**

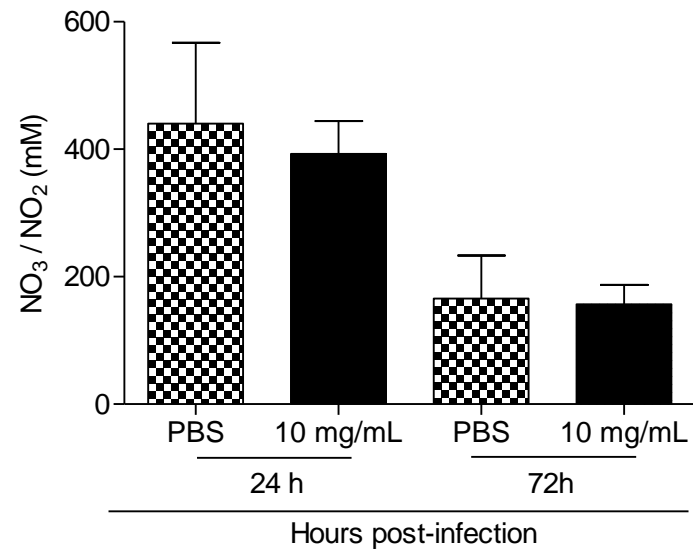


**Fig. 5**

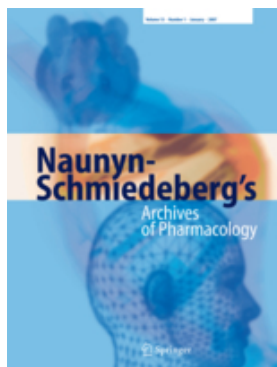
(a)



(b)







## Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology

Managing editor: M.C. Michel

ISSN: 0028-1298 (print version)

ISSN: 1432-1912 (electronic version)

Journal no. 210

### Instructions for Authors

## Instructions for Authors

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology will consider manuscripts in all fields of pharmacology for publication as full papers or Rapid communications. The publication must make a significant contribution to pharmacological knowledge. The proceedings of meetings of the Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie are published separately as supplements.

The journal publishes invited reviews, original articles and short communications.

When submitting a contribution that is part of a Special Issue please include the following footnote on the title page of your submission:

"This article is published as part of the Special issue on [title of Special Issue]."

### EDITORIAL PROCEDURE

The Managing Editor assigns each manuscript to one of the editors or to a guest editor. The editor selects the referees, corresponds with the authors and makes the final decision as to whether the manuscript is accepted. Rapid communications are generally edited by the Managing Editor in order to keep the publication delay to a minimum. When a manuscript is returned for revision, it should be resubmitted within four months; otherwise it may be regarded as a new manuscript. When a revised manuscript is submitted, the original version should also be returned.

To avoid unnecessary delays, manuscripts should be prepared in accordance with journal requirements.

### MANUSCRIPT SUBMISSION

#### Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before;

that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

#### Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

#### Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

#### TITLE PAGE

##### Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

##### Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusions

##### Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

#### TEXT

##### Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- ⌘ Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- ⌘ Use italics for emphasis.
- ⌘ Use the automatic page numbering function to number the pages.
- ⌘ Do not use field functions.
- ⌘ Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- ⌘ Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- ⌘ Use the equation editor or MathType for equations.

- ⌘ Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

#### SPECIFIC REMARKS

##### ⌘ Introduction

The Introduction should state the purpose of the investigation and give a short review of the pertinent research.

##### ⌘ Methods

The methods section should follow the Introduction and should provide enough information to ensure the reproducibility of the experimental work. This includes that the full chemical name must be given for all compounds identified by code name only. Similarly, the sequence of primers used in molecular biology experiments etc. should be reported.

##### ⌘ Results

The Results section should describe the outcome of the study. Data should be presented as concisely as possible, if appropriate in the form of tables or figures, although very large tables should be avoided. In short papers, there may sometimes be advantages in combining the Results section and the Discussion (Results and discussion).

##### ⌘ Discussion

The Discussion should be an interpretation of the results and their significance with reference to work by other authors.

##### ⌘ Rapid communications

Manuscripts submitted as Rapid communications should be brief and contain complete series of experiments with results of unusual interest. A Rapid communication should normally not exceed 2–3 printed pages, including not more

than two displayed items (figures, tables). The review process is accelerated. Only minor revision is normally allowed. Papers appear in the next available issue after acceptance. Authors are asked to explain in the letter that accompanies the manuscript why the data merit publication in this form. The editors reserve the right to decide whether a manuscript is suitable to be published as a Rapid communication.

#### SCIENTIFIC STYLE

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

Manuscripts submitted to the journal are expected to adhere to internationally accepted nomenclature

- for receptors:

[www.guidetopharmacology.org](http://www.guidetopharmacology.org)

- and enzymes:

International Union of Biochemistry and Molecular Biology

#### REFERENCES

##### Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

##### Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

##### ⌘ Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

##### ⌘ Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

##### ⌘ Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- ⌘ Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- ⌘ Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- ⌘ Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

[www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php](http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php)

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 3 kB)

## TABLES

- ⌘ All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- ⌘ Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- ⌘ For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- ⌘ Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- ⌘ Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

## ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

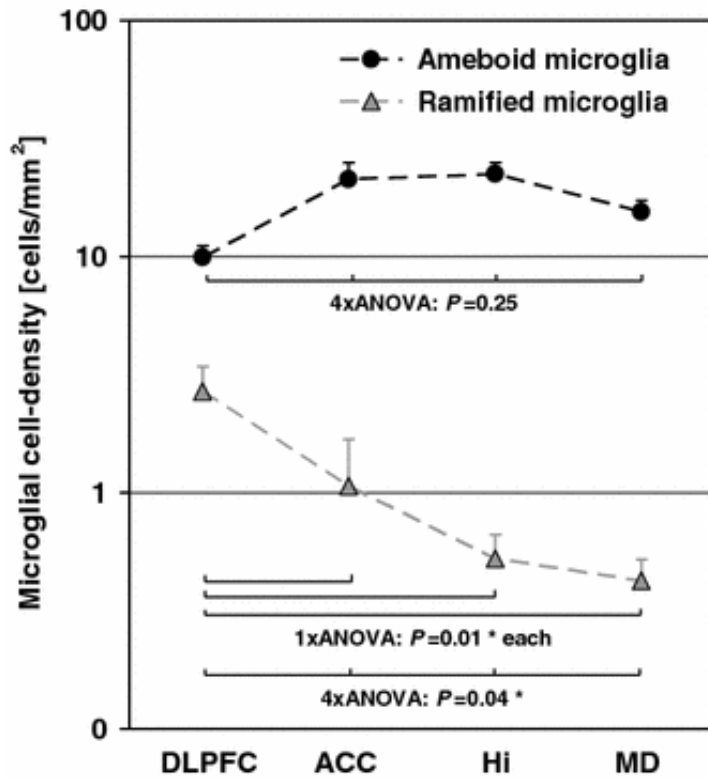
For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

### Electronic Figure Submission

- ⌘ Supply all figures electronically.
- ⌘ Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- ⌘ For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- ⌘ Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- ⌘ Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

### Line Art

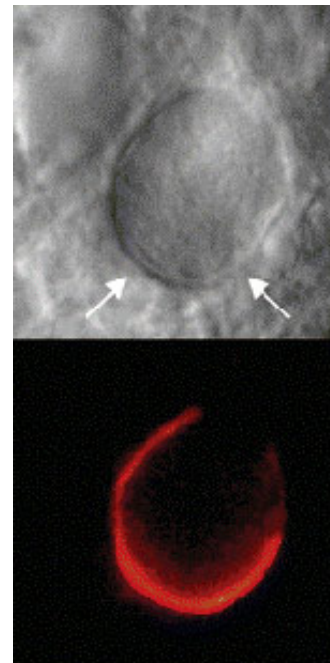




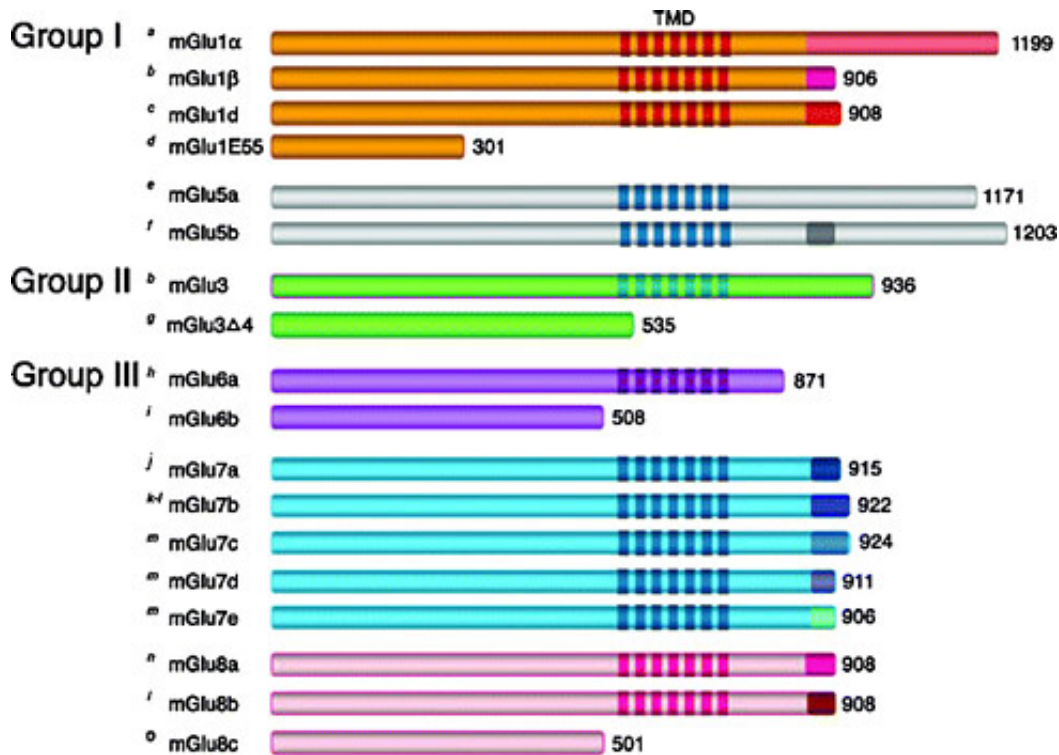
- ⚡ Definition: Black and white graphic with no shading.
- ⚡ Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- ⚡ All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- ⚡ Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- ⚡ Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

#### Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



#### Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

#### Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

#### Figure Lettering

- ⌘ To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- ⌘ Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- ⌘ Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- ⌘ Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- ⌘ Do not include titles or captions within your illustrations.

#### Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

### Figure Captions

- ⌘ Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- ⌘ Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- ⌘ No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- ⌘ Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- ⌘ Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

### ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

### Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during

downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. "ESM\_3.mpg", "ESM\_4.pdf".

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

## INTEGRITY OF RESEARCH AND REPORTING

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their

inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

#### Conflict of interest

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

#### DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in.

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

#### For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

理文编辑

#### For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

エダンズ グループ ジャパン

#### For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및

신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

Edanz Editing Global

#### AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

### Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

#### Springer Open Choice

### Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

### Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

### Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

### Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

### Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.