



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

**Caracterização imunomodulatória de proteases cisteínicas obtidas do látex  
de *Calotropis procera* em culturas de macrófagos**

Lethicia Souza Tavares

**RECIFE – PE  
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

T231c Tavares, Lethicia Souza.  
Caracterização imunomodulatória de proteases cisteínicas  
obtidas do látex de *Calotropis procera* em culturas de macrófagos  
/ Lethicia Souza Tavares. – 2017.  
63 f. : il.

Orientador: José Vitor Moreira Lima Filho.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação Biociência Animal,  
Recife, BR-PE, 2017.

Inclui anexo(s) e referências.

1. Plantas laticíferas 2. LP<sub>PII</sub> 3. *Salmonella* Typhimurium  
I. Lima Filho, José Vitor Moreira, orient. II. Título.

CDD 574.5



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

**Caracterização imunomodulatória de proteases cisteínicas obtidas do látex  
de *Calotropis procera* em culturas de macrófagos**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Biocência Animal da Universidade  
Federal Rural de Pernambuco como  
pré-requisito para o título de Mestre  
em Biocência Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Vitor  
Moreira Lima Filho

**Recife – PE**

**2017**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

---

**Lethicia Souza Tavares**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho  
Dept<sup>o</sup> de Biologia – UFRPE  
(Orientador)

---

Profa. Dra. Tatiana Souza Porto  
UAG – UFRPE  
(Examinadora Titular)

---

Profa. Dra. Jaqueline Bianque de Oliveira  
Dept<sup>o</sup> de Biologia – UFRPE  
(Examinadora Titular)

---

Prof. Dr. Rafael de Freitas e Silva  
UPE  
(Examinador Titular)

Dedico...

**À minha mãe Claudineide Belarmino  
e ao meu marido Tiago Bittencourt,**  
por todo o amor, apoio e incentivo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Professor Dr. José Vitor Moreira Lima Filho, por toda a confiança dedicada a mim e oportunidade de crescimento científico e pessoal. Agradeço por os todos conselhos oferecidos e paciência. Pela orientação.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), segunda morada durante tantos anos, por toda a infraestrutura e suporte técnico-científico disponibilizado para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Márcio Viana Ramos, Universidade Federal do Ceará (UFCE), pela disponibilização das Frações Proteicas utilizadas neste trabalho.

Ao Dr. Pietro Mastroeni, do Depto. de Medicina Veterinária da Universidade de Cambridge, por ter gentilmente cedido a cepa virulenta de *S. Typhimurium* C5 utilizadas nos experimentos desta dissertação.

À Maria Helena, responsável pelo biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA- UFPE), por terem cedido os animais para a realização deste trabalho e por toda disponibilidade.

À Cynthia Vasconcelos, responsável técnica do biotério do Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco LANAGRO/PE, por disponibilizar parte dos animais utilizados nessa pesquisa e por toda atenção.

À equipe do Laboratório de Bacterioses da UFRPE, especialmente ao Professor José Wilton Júnior, por todo o suporte dado durante às fases experimentais deste projeto.

A todos do Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA/UFRPE por todo o auxílio e suporte dado quando necessário.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Biociência Animal, pelos ensinamentos, sugestões e contribuições para o meu trabalho e crescimento acadêmico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro por meio de bolsa de mestrado, fundamental para que este trabalho pudesse ser realizado.

Às colegas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (UFRPE). À Ana Clarissa, Laísia Andrade, Rayza Alves e Renata Vaz pela inestimável ajuda. À Jacqueline Albuquerque, por toda disponibilidade e ensinamentos que tanto contribuíram para o meu crescimento científico. À Taciana Ralph por todos os ensinamentos, conselhos; por toda a ajuda e atenção dedicada a mim, contribuições estas que trouxeram mais leveza à esta caminhada.

Aos professores da banca examinadora, tanto de qualificação como de defesa, pela disponibilização de tempo e contribuição científica.

Às amigas Tatiane Priscila e Rafaela Cristina, por todo o apoio. Por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu marido, Tiago Bittencourt, pela parceria, apoio, compreensão e por não ter medido esforços para me auxiliar em todos os momentos necessários.

À minha mãe, Claudineide Belarmino, por todo o suporte oferecido, do qual, sem ele, não conseguiria ter chegado até aqui. Por sempre acreditar em mim.

A todos, meu muito obrigada!

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Látex de <i>Hevea brasilienses</i> .....  | 16 |
| <b>Figura2:</b> Látex de <i>Chelidonium majus</i> .....  | 16 |
| <b>Figura 3:</b> Planta, flor e fruto de <i>Calotropis procera</i> .....   | 19 |
| <b>Figura 4:</b> Látex de <i>Calotropis procera</i> .....  | 19 |
| <b>Figura 5:</b> Cascata de sinalização após ativação de TLR-4 por LPS.....  | 27 |
| <b>Figura 6:</b> Fluxograma metodológico.....  | 29 |
| <b>Figura 7:</b> Macrófagos aderidos em placa de cultivo celular, visualizados por meio de microscópio invertido.....  | 31 |
| <b>Figura 8:</b> Quantificação de população intracelular de <i>S. Typhimurium</i> em macrófagos teste preventivo. Macrófagos foram tratados com LP <sub>P11</sub> (1µg/mL ou 10µg/mL) ou LP <sub>P11</sub> /IAA (10µg/mL), seguido de infecção de <i>S. Typhimurium</i> C5. Os dados representam média de três medições. Nível de significância $p < 0,05$ de acordo com o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.....   | 40 |
| <b>Figura 9:</b> Ensaio com macrófagos infectados. (A) Quantificação de população intracelular de <i>S. Typhimurium</i> em macrófagos teste curativo. Macrófagos foram infectados por <i>S. Typhimurium</i> C5, seguido de tratamento por LP <sub>P11</sub> 1ug/mL ou LP <sub>P11</sub> 10ug/mL ou LP <sub>P11</sub> /IAA10ug/mL durante 24 horas. (B) Viabilidade celular de macrófagos infectados por <i>S. Typhimurium</i> , durante 4h, seguido de tratamento com LP <sub>P11</sub> (1ug/mL ou 10ug/mL) ou LP <sub>P11</sub> /IAA (10ug/mL) por 24 horas. Os dados representam a média de três medições..... | 41 |



**Figura 10:** Expressão gênica de citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6 em ensaio com macrófagos peritoneais tratados durante 24 horas com LP<sub>PII</sub> (1 $\mu$ g/mL ou 10 $\mu$ g/mL) ou LP/IAA (10 $\mu$ g/mL). Os dados representam a média de três medições.....42

**Figura 11:** Ensaio curativo com macrófagos estimulados com LPS. Expressão gênica de citocinas IL-1  $\beta$ , TNF e IL-6 em cultura de macrófagos peritoneais estimulados com LPS 5  $\mu$ g/mL por um período de 4 horas seguido de tratamento com LP<sub>PII</sub> 1  $\mu$ g/mL ou LP<sub>PII</sub> 10  $\mu$ g/mL ou LP<sub>IAA</sub> 10  $\mu$ g/mL por um período de 24 horas. Os dados representam média de três medições.....43

**Figura 12:** (A) Expressão gênica de TLR-4 em cultura de macrófagos tratados com LP<sub>PII</sub> (1  $\mu$ g/mL ou 10  $\mu$ g/mL) ou LP<sub>IAA</sub> (10  $\mu$ g/mL) por 24 horas. (B) Ensaio curativo com macrófagos estimulados com LPS. Expressão gênica de TLR-4 em cultura de macrófagos tratados com LPS 5  $\mu$ g/mL por um período de 4 horas. Após tempo estimado, as células foram tratadas com LP<sub>PII</sub> 1 ( $\mu$ g/mL ou LP<sub>PII</sub> 10  $\mu$ g/mL) e LP<sub>IAA</sub> (10  $\mu$ g/mL) por 24 horas. Os dados representam média de três medições.....45

**Figura 13:** Ensaio preventivo com macrófagos estimulados com LPS. Expressão gênica de IL-6 em macrófagos tratados com LP<sub>PII</sub> (1  $\mu$ g/mL ou 10  $\mu$ g/mL) ou LP<sub>IAA</sub> (10  $\mu$ g/mL) por 24 horas, seguido de tratamento com LPS 5  $\mu$ L/mL durante 4 horas. Os dados representam média de três medições.....46

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Primers específicos utilizados para a realização de amplificação de cDNA por meio de RT PCR ..... | 36 |
|---|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BHI** - Brain Heart Infusion

**CD14** - Grupamento de diferenciação 14

**cDNA** – DNA complementar

**DF** – Fração dialisável

**GAPDH** - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

**IL-1  $\beta$**  – Interleucina 1 beta

**IL-6** – Interleucina 6

**iNOS** – Óxido nítrico sintase

**IRF-3** -Fator de resposta de interferon-3

**LANAGRO** - Laboratório Nacional Agropecuário

**LBP** - Proteína de ligação a lipopolissacarídeo

**LIKA** – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

**LP** – Proteínas do látex

**LP<sub>IAA</sub>** – Proteínas do látex inativadas por iodoacetamida

**LP<sub>PI</sub>** – Proteínas do látex subfração PI

**LP<sub>PII</sub>** – Proteínas do látex subfração PII

**LP<sub>PIII</sub>** - Proteínas do látex subfração PIII

**LPS** – Lipopolissacarídeo

**M $\emptyset$**  - Macrófagos

**Mal** - Myd88 semelhante à adaptadora

**MD2** - Proteína Mielóide Diferenciada 2

**mRNA** – RNA mensageiro

**MYD88** – Fator de diferenciação mielóide 88

**NF- $\kappa$ B** - Fator nuclear kappa B

**NTS** – *Salmonella* não tifóide

**PAMP** – Padrão molecular associado a patógenos

**PBS** – Tampão fosfato salino

**RES** – Sistema retículoendotelial

**RNA** – Ácido ribonucleico

**TAK1** - Fator de crescimento transformante beta de cinase

**TIRAP**- Proteína adaptadora contendo domínio TIR

**TLR-4** - Toll Like Receptor 4

**TLRs** - Toll Like Receptors

**TNF** – Fator de necrose tumoral

**TRAF-6** - Fator associado ao receptor de TNF

**TRAM** - Molécula adaptadora relacionada com a TRIF

**UAG** – Unidade Acadêmica de Garanhuns

**UFC** – Unidades formadoras de colônias

**UFCE** – Universidade Federal do Ceará

**UFPE** – Universidade Federal de Pernambuco

**UFRPE** – Universidade Federal Rural de Pernambuco

**UPE** – Universidade de Pernambuco

## RESUMO

*Calotropis procera*, planta medicinal conhecida popularmente em Pernambuco como algodão-de-seda. É uma planta laticífera que pertence à família Apocynaceae, sendo encontrada com facilidade no nordeste brasileiro. Dados da literatura corrente mostram que proteínas obtidas de seu látex possuem ação anti-inflamatória. Diante disso, neste trabalho, uma fração proteica obtida por cromatografia de troca iônica, chamada LP<sub>PII</sub>, rica em proteases cisteínicas, foi avaliada quanto à sua atividade imunomodulatória em culturas de macrófagos peritoneais infectadas por *Salmonella enterica* Sor. Typhimurium. Os macrófagos foram obtidos a partir da lavagem peritoneal de camundongos Swiss com meio de cultura RPMI contendo antibióticos penicilina e estreptomicina. As células do fluido obtido foram ajustadas a  $1 \times 10^6$  cél/mL e incubadas em estufa a 37°C e CO<sub>2</sub> 5%, em placas de cultura de células, e os macrófagos aderentes utilizados nos ensaios. Os ensaios de quantificação bacteriana se deram de forma preventiva, onde os macrófagos foram tratados com LP<sub>PII</sub> (1 µg/mL ou 10 µg/mL) ou LP<sub>PII+IAA</sub> (10 µg/mL) (inativada com iodoacetamida) seguido de infecção com *S. Typhimurium* ( $1 \times 10^8$  UFC/mL), e de forma curativa, onde primeiro se deu infecção dos macrófagos por *S. Typhimurium* ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) seguido de tratamento com LP<sub>PII</sub> (1 µg/mL ou 10 µg/mL) ou LP<sub>PII+IAA</sub> (10 µg/mL). O ensaio de viabilidade celular foi realizado de forma curativa com macrófagos infectados com *S. Typhimurium* ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Para ensaios de expressão gênica de citocinas IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, iNOS e TLR-4, os macrófagos receberam apenas tratamento com LP<sub>PII</sub> (1 µg/mL ou 10 µg/mL) ou LP<sub>+IAA</sub> (10 µg/mL), ou houve estímulo de LPS bacteriano, seguidos de tratamentos de forma curativa ou preventiva com LP<sub>PII</sub> (1 µg/mL ou 10 µg/mL) ou LP<sub>+IAA</sub> (10 µg/mL). Os resultados mostram que macrófagos infectados com uma cepa de *S. Typhimurium* C5 e tratados com LP<sub>PII</sub> de forma preventiva ou curativa, reduziram o número de bactérias viáveis no ambiente intracelular. Neste caso, macrófagos tratados de forma preventiva com LP<sub>PII</sub> 10 µg/mL, demonstraram diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na quantidade de bactérias intracelulares quando comparados ao controle, macrófagos sem tratamento com LP<sub>PII</sub>. Na forma curativa, observou-se diminuição significativa de *S. Typhimurium* intracelular em macrófagos tratados com LP<sub>PII</sub> 1 µg/mL, quando comparados ao controle, células sem tratamento com LP<sub>PII</sub>. Por outro lado, os grupos tratados com LP<sub>PII+IAA</sub> tiveram um maior número de bactérias intracelulares, sugerindo a ação das

proteases cisteínicas no efeito antimicrobiano observado. O tratamento curativo com LP<sub>PII</sub> também aumentou a viabilidade dos macrófagos infectados em relação aos grupos controles sem tratamento. Deste modo, grupos tratados com LP<sub>PII</sub>1µg/mL obtiveram viabilidade 14,74% maior que o grupo controle sem tratamento, enquanto que macrófagos tratados com LP<sub>PII</sub>10µg/mL obtiveram 24,11%. Grupos de macrófagos estimulados com LPS e, a seguir, tratados com LP<sub>PII</sub>, tiveram redução na expressão gênica das citocinas inflamatórias TNF, IL1-β e IL-6, além de receptor do tipo Toll-4. Tomados esses resultados em conjunto, observamos que LP<sub>PII</sub> obtida do látex de *C. procera* apresenta biomoléculas com atividade imunomodulatória benéfica ao controle de infecções por *S. Typhimurium*.

**Palavras-Chave:** Plantas laticíferas, LP<sub>PII</sub>, *Salmonella Typhimurium*

## ABSTRACT

*Calotropis procera*, is a medicinal plant known in Pernambuco as “silk-cotton”. Is laticífer plant belonging to the family Apocynaceae broadly found in the Brazilian Northeast. Current literature data show that proteins obtained from its latex harbour anti-inflammatory action. In the present study, a protein fraction obtained by ion-exchange chromatography named LP<sub>PII</sub>, which is rich in cysteine proteases, had its immunomodulatory activity evaluated in cultures of peritoneal macrophages infected by *Salmonella enterica* Sor. Typhimurium. Macrophages were obtained from the peritoneal cavity of Swiss mice using RPMI culture medium containing antibiotics. The cells obtained were adjusted to  $1 \times 10^6$  cell/mL and incubated at 37° C and 5% CO<sub>2</sub>, in cell culture plates, and the adherent macrophages used in the assays. The bacterial quantification assays were performed in a preventive manner, where the macrophages were treated with LP<sub>PII</sub> (1 µg/ mL or 10 µg/ mL) or LP<sub>PII+IAA</sub> (10 µg / mL) (inactivated with iodoacetamide) followed by infection with *S. Typhimurium* ( $1 \times 10^8$  CFU / mL), and in a curative manner, where macrophages were first infected with *S. typhimurium* ( $1 \times 10^8$  CFU / mL) followed by treatment with LP<sub>PII</sub> (1 µg/ mL or 10 µg/ mL) or LP<sub>PII+IAA</sub> (10 µg/ ml). The cell viability assay was performed curatively with macrophages infected with *S. Typhimurium* ( $1 \times 10^8$  CFU / ml). For IL1 $\beta$ , TNF, IL-6, iNOS and TLR-4 cytokine gene expression assays, macrophages were only treated with LP<sub>PII</sub> (1 µg/ mL or 10 µg/ mL) or LP<sub>+IAA</sub> (10 µg / mL), or bacterial LPS stimulation, followed by curative or preventative treatments with LP<sub>PII</sub> (1 µg/ mL or 10 µg/ mL) or LP<sub>+IAA</sub> (10 µg/ mL). The results show that macrophages infected with a *S. Typhimurium* C5 and treated with LP<sub>PII</sub> in a preventative or curative manner, reduced the number of viable bacteria in the intracellular environment. In this case, macrophages treated preventively with LP<sub>PII</sub> 10 µg/ mL, showed a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the amount of intracellular bacteria when compared to the control, macrophages without LP<sub>PII</sub> treatment. In the curative form, significant decrease of intracellular *S. Typhimurium* was observed in LP<sub>PII</sub>1µg/ mL-treated macrophages compared to control cells, without LP<sub>PII</sub> treatment. On the other hand, the groups treated with LP<sub>PII+IAA</sub> had a greater number of intracellular bacteria, suggesting the action of cysteine proteases on the observed antimicrobial effect. Curative treatment with LP<sub>PII</sub> also increased the viability of infected macrophages relative to the untreated control groups. Thus, groups treated with LP<sub>PII</sub>1µg/ mL

obtained viability 14.74% greater than the control group without treatment, whereas macrophages treated with LP<sub>PII</sub> 10µg/ mL obtained 24.11%. Groups of macrophages stimulated with LPS and then treated with LP<sub>PII</sub> had a reduction in the gene expression of the inflammatory cytokines TNF, IL1-β and IL-6, in addition to Toll-like receptor 4. Taken together, we found that LP<sub>PII</sub> obtained from latex of *C. procera* presents biomolecules with immunomodulatory activity beneficial to the control of *S. Typhimurium* infections.

**Key words:** Laticifers plants, LP<sub>PII</sub>, *Salmonella Typhimurium*



## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 13 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 15 |
| 2.1. Plantas laticíferas.....   | 15 |
| 2.1.1 Proteases cisteínicas .....   | 17 |
| 2.2. Calotropis procera.....  | 18 |
| 2.3. <i>Salmonella</i> Typhimurium .....  | 21 |
| 2.4. <i>Salmonella</i> Typhimurium como modelo de infecção experimental.....                      | 23 |
| 2.5. <i>Toll-Like Receptor</i> .....  | 24 |
| 2.5.1 <i>Toll-Like Receptor 4</i> .....   | 25 |
| 3. OBJETIVOS .....  | 28 |
| 3.1 Objetivo Geral.....   | 28 |
| 3.2 Objetivos Específicos .....   | 28 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS.....  | 29 |
| 4.1 Cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium .....  | 29 |
| 4.2 Animais experimentais .....   | 29 |
| 4.3 Obtenção da fração proteica LP <sub>PII</sub> .....   | 30 |
| 4.4 Obtenção de macrófagos peritoneais .....  | 30 |
| 4.5 Ensaio com macrófagos infectados por <i>S. Typhimurium</i> .....                              | 32 |
| 4.5.1 Quantificação de unidades formadoras de colônias em macrófagos peritoneais infectados ..... | 33 |
| 4.5.2 Viabilidade de macrófagos infectados com <i>S. Typhimurium</i> .....                        | 33 |
| 4.6 Ensaio com macrófagos tratados com LP <sub>PII</sub> .....                                    | 34 |
| 4.7 Ensaio com macrófagos estimulados com LPS.....  | 34 |
| 4.8.1 Extração de RNA total.....  | 35 |
| 4.8.2 RT-PCR .....  | 35 |
| 4.9 Análise estatística .....   | 36 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 38 |
| 6. CONCLUSÃO .....  | 47 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 48 |
| ANEXO I.....  | 59 |

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas para fins medicinais é uma prática muito antiga. São caracterizadas pela presença de moléculas bioativas com propriedades terapêuticas, úteis aos seres humanos e animais como forma de tratamento de doenças (HOSTETTMANN e TERREAUX, 2000). A investigação de compostos biologicamente ativos baseadas no conhecimento popular, passou a ser uma alternativa viável para o desenvolvimento de novas drogas pela ciência e indústria farmacêutica (PEI, 2001). Em grande parte do mundo, de 70 a 95% da população confia em medicamentos a base de plantas (WHO, 2011).

Plantas laticíferas são caracterizadas pela presença de laticíferos, estruturas responsáveis pela produção de látex (KONNO, 2011). Muitas plantas laticíferas apresentam atividades farmacológicas, dentre elas a *Calotropis procera* (MEGERESSA *et al.*, 2015). A planta *Calotropis procera*, encontrada em abundância no nordeste brasileiro é utilizada amplamente na medicina popular (CHUNDATTU *et al.*, 2016). Muito sabe-se sobre as potencialidades farmacológicas do látex de *C. procera*, ultrapassando o cunho popular, e sendo reportada em publicações científicas devido à presença de proteínas bioativas, com propriedades bioquímicas de interesse biotecnológico e econômico, dentre elas proteases cisteínicas (DUBEY e JAGANNADHAM, 2002).

Há evidências que as proteínas presentes no látex de *C. procera* estejam envolvidas na sua atividade farmacológica. Ao ser submetido à centrifugação, pode-se observar que o látex é composto de uma fração de com proteínas de alto peso molecular e não dialisável (LP), e outra fração não dialisável e de baixo peso molecular (DF). A fração LP, quando exposta ao método de cromatografia de troca iônica, pode apresentar três subfrações distintas denominadas LP<sub>PI</sub>, LP<sub>PII</sub> e LP<sub>PIII</sub> (ALENCAR *et al.*, 2006. RAMOS *et al.*, 2009), com atividades anti-inflamatória e antimicrobianas (RAMOS *et al.*, 2007, MOHAMED *et al.* 2014).

*Salmonella enterica* Sor. Typhimurium é uma bactéria gram-negativa causadora da salmonelose, doença transmitida principalmente pelo consumo de alimentos e água contaminada, representa um importante risco à saúde de humanos e animais (DOUGAN *et al.*, 2011). Estima-se que, mundialmente, ocorram 93,8 milhões casos de gastroenterite por salmonelas não-tifóides, com

155.000 mortes anuais (MAJOWICZ et al., 2010). Nos Estados Unidos, a *Salmonella* spp. esteve relacionada a 35% dos casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), gerando morte em 28% dos casos (SCALLAN, 2011). No Brasil, *Salmonella* spp. representou 14,4% dos casos de DTA, caracterizado como principal agente etiológico responsável por estes surtos entre os anos de 2000 e 2015 (SINAN/SVS/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Algumas cepas são resistentes a antibióticos, o que gera dificuldade no tratamento da doença. Quando não tratada adequadamente, a *Salmonella* pode invadir a corrente sanguínea e gerar complicações como a sepse. Microrganismos antibiótico-resistentes e a necessidade de tratamentos alternativos contra patógenos emergentes provocam grande preocupação para a comunidade global. Considerando que a capacidade de tratar doenças infecciosas é dependente do desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, as plantas medicinais representam fonte potencial de moléculas bioativas que poderiam ser utilizadas individualmente ou, em conjunto com antibióticos, como adjuvantes terapêuticos.

Nesse contexto, a subfração proteica (LP<sub>PII</sub>) extraída do látex da planta medicinal *C. procera*, rica em proteases cisteínicas, foi utilizada no tratamento preventivo e curativo de infecções *ex vivo* em culturas de macrófagos peritoneais causadas por *S. Typhimurium*, a fim de avaliar as respostas imunológicas e possíveis benefícios, bem como seu potencial biotecnológico .

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Plantas laticíferas

Aproximadamente 10% de todas as espécies de angiospermas são consideradas laticíferas, liberando látex após dano tecidual (METCALF, 1967, FARRELL *et al.*, 1991). Entre as plantas com flores, mais de 20.000 espécies, representadas por 40 famílias são laticíferas, sendo encontradas tanto em plantas dicotiledôneas como em monocotiledôneas (METCALF, 1967, FARRELL *et al.*, 1991, LEWINSOHN, 1991, HUNTER, 1994). Em termos geográficos, 14% das espécies de plantas tropicais são consideradas laticíferas em comparação a 6% das espécies temperadas (LEWINSOHN, 1991).

A produção de látex é encontrada numa grande diversidade de plantas, das quais muitas vezes não há evidência de estreita relação taxonômica, tais como ervas, suculentas, árvores, plantas aquáticas, arbustos e lianas, estendendo-se nos mais variados habitats (METCALF, 1967).

Plantas laticíferas são caracterizadas pela presença de laticíferos, estruturas de canais especializadas na produção, secreção ou acúmulo de fluido denominado de látex, distribuídos nas raízes, hastes, pecíolos e folhas (KONNO, 2011). Em termos estruturais, os laticíferos agrupam-se em duas categorias: laticíferos não articulados e articulados. Os laticíferos não articulados são formados a partir de células únicas que crescem em espaços indeterminados, capazes de crescimento potencialmente ilimitado. Os articulados são formados por células em fileiras, conectadas através de perfurações nas suas paredes celulares, produzindo estruturas semelhantes à rede extensa de células multiconectadas (CUTLER *et al.*, 2011).

É definido como látex, o líquido de aspecto leitoso devido à suspensão de pequenas partículas, que é exsudato de plantas quando sofrem algum dano mecânico; muito embora também possa ser colorido, encontrado na cor avermelhada ou amarelo (Figura 1 e 2) (AGRAWAL e KONNO, 2009). O látex não tem nenhum papel conhecido no metabolismo primário (aquisição e atribuição de recursos) das plantas (HAGEL *et al.*, 2008).

**Figura 1:** Látex de *Hevea brasiliensis*.

Fonte: <https://pt.123rf.com/>



**Figura 2:** Látex de *Chelidonium majus*.

Fonte: <http://www.wikiwand.com>



O látex possui composição química variada, dependendo da espécie em que ocorre; dentre eles borracha, terpeno, alcalóides, cardenólídeos e fenóis. Quanto à sua composição protéica e enzimática, podem ser constituídos de oxidases, considerados como proteínas de defesa anti-herbívoros de plantas; quitinases, enzimas que degradam a quitina, importantes componente do intestino dos insetos; lectinas, proteínas que têm frequentemente atividades tóxicas contra animais incluindo insetos e proteases, que são enzimas que clivam proteínas, e são encontradas em todos os organismos vivos (APPEZZATO-DA-GLÓRIA e CARMELO-GUERREIRO, 2006, AGRAWAL e KONNO 2009; KONNO, 2011).

Nos últimos 20 anos, houve um aumento no número de estudos descritos na literatura sobre os látices de plantas. De maneira geral, tais estudos mostram que a produção de látex é evidenciada como forma de defesa da planta contra patógenos, herbívoros e insetos (FARRELL *et al.*, 1991). Grande parte das espécies laticíferas contém uma diversidade de moléculas biologicamente ativas com efeitos tóxicos e antinutritivos que reduzem a herbivoria e infecção por microrganismos. Quando exposto ao ar, os látices rapidamente coagulam, aumentando a viscosidade, matando insetos predadores e atuando como selante de ferimentos provocados à planta, características que corroboram com o sucesso evolutivo destas plantas em diversos ambientes (AGRAWAL *et al.*, 2008, KONNO, 2011).

Além da relevância ecológica, os látices de plantas apresentam importância econômica em vários setores, como na produção de borracha por plantas da família

Euphorbiaceae, gomas de mascar derivadas de espécies da família Sapotaceae, além de serem fontes de alcalóides, tais como a morfina (AGRAWAL e KONNO 2009).

A diversidade de atividades biológicas associadas aos látices também tem chamado a atenção. Como exemplo, pode-se citar o látex de *Aloe trichosantha*, que possui atividade antibacteriana contra bactérias gram-negativas e antifúngica contra *Candida albicans* (MEGERESSA *et al.*, 2015); o látex de *Euphorbia caducifolia* usado para curar infecções de pele, erupções cutâneas, leucoderma, além de ser utilizado em cortes e feridas e possuir ação antifúngica contra *Aspergillus niger* e *Candida albicans* (GOYAL *et al.*, 2012); látex de *Jatropha molissima* causa inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*; o látex de *Jatropha gossypifolia* possui efeito antimicrobiano em *Salmonella Typhi* (ROCHA e DANTAS, 2009). Considerando os relatos de ações antimicrobianas e anti-inflamatórias, o látex de *Calotropis procera* foi, neste estudo, investigado.

### 2.1.1 Proteases cisteínicas

Sabe-se que os látices são fontes ricas de enzimas, tais como as proteases. São reconhecidos cinco tipos de proteases, nos quais os grupos serina, treonina, cisteína, aspártico ou metaloprotease desempenham papéis na catálise enzimática (PRIOLO *et al.*, 2000). Diversas proteases foram isoladas de plantas, tanto em suas sementes, frutos e látex, sendo a maioria delas pertencentes à classe das proteases cisteínicas (BOLLER, 1986). As proteases cisteínicas são encontradas em diversas plantas laticíferas, como a *Carica papaya* (KONNO *et al.*, 2004), *Ficus virgata* (SGARBIERI *et al.*, 1964), *Calotropis gigantea* (ABRAHAM e JOSHI, 1979) e *Calotropis procera* (DUBEY e JAGANNADHAM, 2002, RAWDKUEN *et al.*, 2011).

As proteases de cisteína degradam a membrana do intestino médio de insetos, basicamente constituídos de proteínas e quitina, sugerindo o papel protetor dessas proteínas para as plantas (PECHAN *et al.*, 2002). Várias outras funções das proteases são encontradas na literatura corrente, tal como a senescência e germinação de sementes e resposta à estresse biótico (MARTÍNEZ *et al.*, 2012), resistência à estresse abiótico (WAGNER *et al.*, 2012) e reconhecimento de patógenos e indução de respostas de defesa por meio de produção de peptídeos antimicrobianos (LIU *et al.*, 2001).

Além de função na fisiologia e desenvolvimento de plantas, comercialmente as proteases podem ser usadas em vários setores da indústria. Na área alimentícia, proteases cisteínicas são usadas em processos que visam o amaciamento de carne por meio de papaína, bromelaína do abacaxi e rizoma de gengibre; já a bromelina é utilizada na produção de cerveja (HEINICKE e GORTNER, 1957, NAVEENA *et al.*, 2004). Algumas proteases cisteínicas também tem demonstrado potencial farmacêutico no tratamento terapêutico de distúrbios digestivos, úlceras dérmicas e gástricas de diferentes origens, modulação imunológica e doenças tumorais (SALAS *et al.*, 2008). Atividades anti-inflamatórias são registradas no látex de *Calotropis procera*, relacionada principalmente à presença de proteases cisteínicas.

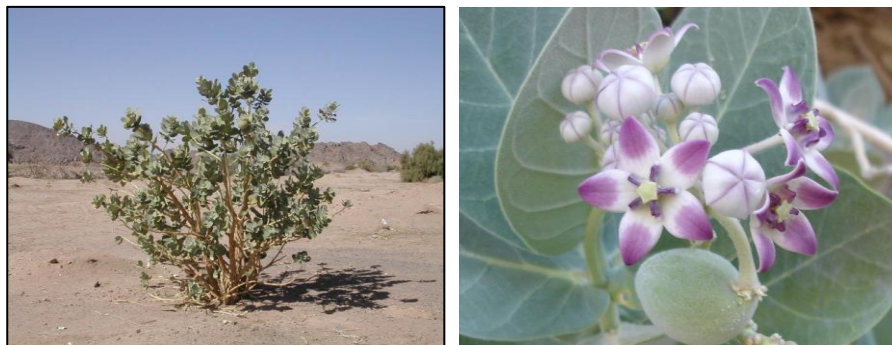
## **2.2. *Calotropis procera***

*Calotropis procera*, pertencente à família Apocynaceae, é uma planta laticífera conhecida popularmente como algodão-de-seda (NETO *et al.*, 2013). O nome científico da espécie vegetal é derivado do grego (“kalos” = belo, “tropis” = barco) e *procera* é a partir das palavras latinas "em favor de" e "cera", referindo-se à aparência cerosa da planta (HASSAN *et al.*, 2015)

Endêmica da África e Ásia, é comum no oriente médio e na América Latina. É uma espécie resistente à seca e tolerante ao estresse salino, que se adapta com facilidade a diversos tipos de solo, com preferência aos arenosos e de drenagem livre. Em regiões áridas e semiáridas, cresce em abundância, com preferência para solos sem fertilizantes químicos, pesticidas ou outras práticas agronômicas (SHARMA *et al.*, 2012).

É uma planta abundante, arbustiva, ereta, altamente ramificada e grande, podendo chegar à altura de 4 a 5 metros (Figura 3). Cresce muitas vezes como planta invasora, ocupando áreas abandonadas ou degradadas física e/ou quimicamente. Apresentam flores mescladas na cor roxa e branca, contendo 5 pétalas em forma de triângulo e frutos redondos e esverdeados, com semente ovóide, medindo por volta de 15 cm de comprimento, revestidos de cera e folhas simples, grossas, não suculentas com presença de látex (Figura 4) (QUAZI *et al.*, 2013).

**Figura 3:** Planta, flor e fruto de *Calotropis procera*. Fonte: <http://www.feedipedia.org>.



**Figura 4:** Látex *C. procera*. Fonte: <https://www.flickr.com>



*C. procera* é bem conhecida por sua grande capacidade de produzir látex, que é exsudato de partes verdes danificadas. O látex contém uma poderosa enzima proteolítica, sugerida como defesa vegetal contra insetos, herbívoros e microrganismos. Segundo Perwez e Mohammad (2009), é mais potente que a papaína e bromelina, podendo coagular leite, digerir carne, gelatina e caseína. No látex de *C. procera* também foram identificadas moléculas como cardenóides ativos, alcalóides, carboidratos, esteróides, terpenos e carbonatos orgânicos (SEIBER *et al.*, 1982, GALLEGOS-OLEA *et al.*, 2002).

Esta planta foi usada primeiramente com fim medicinal por *Ved Sushruta*, a cerca de 800-900 a.c. (CHUNDATTU, *et al.*, 2016). Tradicionalmente vista na medicina popular, *C. procera* é alvo estudos que buscam esclarecer as suas propriedades e utilidades para o melhoramento da qualidade de vida humana e animal. Relatórios científicos dos últimos dez anos, mencionaram várias atividades farmacológicas relacionadas à *C. procera* tais como: proteção contra hepatotoxicidade (PADHY *et al.*, 2007, SETTY *et al.*, 2007), resistência a fitopatógenos e insetos (FREITAS *et al.*, 2007), atividades anti-inflamatórias e analgésicas (RAMOS *et al.*, 2007), citotoxicidade *in vitro* contra diferentes linhas celulares de câncer humano (OLIVEIRA *et al.*, 2007), atividade anti-hiperglicêmico



(NETO *et al.*, 2013), antimicrobiana (NENAAH, 2013; ALI *et al.*, 2014; MOHAMED *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2015), propriedades anti-helmínticas (CAVALCANTE *et al.*, 2016; AGRAWAL *et al.*, 2016), antioxidante e antiapoptótico (SAYED *et al.*, 2016), atividade antidiabética (KAZEEM *et al.*, 2016), efeito hipocolesterolêmico (PATIL *et al.*, 2016)

O fluido laticífero de *C. procera* é rico em proteínas e há evidências de que estejam envolvidas com suas propriedades farmacológicas. O látex de *C. procera* é composto de uma fração com proteínas de alto peso molecular e não dialisáveis (LP) e de uma fração rica em peptídeos e dialisável (DF) (ARYA e KUMAR, 2005, ALENCAR *et al.*, 2006). A fração de proteína não dialisável (LP), pode apresentar três subfrações proteicas distintas, denominadas de LP<sub>PI</sub>, LP<sub>PII</sub> E LP<sub>PIII</sub>, separadas por cromatografia de troca iônica (RAMOS *et al.*, 2009). O látex de *C. procera* foi investigado, *in vitro* e *in vivo*, a fim de avaliar seus possíveis efeitos tóxicos, que esteve concentrada na borracha, sendo as frações proteicas livres de efeitos nocivos a animais (RAMOS *et al.*, 2006).

Ações anti-inflamatórias têm sido reportadas para proteínas presentes em LP de *C. procera*. Alencar *et al.* (2004), demonstraram que proteínas do látex foram capazes de melhorar edema da pata de camundongo, induzido por carragenina, demonstrando seu poder anti-inflamatório. Ramos *et al.* (2009) avaliaram o efeito de LP sobre as funções neutrofílicas e a nocicepção em modelos com camundongos, onde os dados revelaram que LP possui propriedades anti-inflamatórias e anti-nociceptivas. Em modelo murino, LP protegeu animais tratados de sucumbirem ao choque séptico devido à infecção letal por *S. Typhimurium*, além de inibir a expressão de IL-1 e diminuir a expressão de IL-12 em macrófagos cultivados e estimulados por LPS (LIMA-FILHO *et al.*, 2010). Segundo Oliveira *et al.* (2012), camundongos que receberam inóculo de LP<sub>PI</sub> antes da infecção por *S. Typhimurium*, tiveram taxa de sobrevivência que alcançou 100%, em relação ao tratado com tampão PBS, acompanhada de alta depuração bacteriana da corrente sanguínea. Ainda a quantificação de bactérias intracelulares em macrófagos tratados com a fração LP<sub>PI</sub> e infectados com *Listeria monocytogenes*, reduziu em 100 vezes as unidades formadoras de colônias bacterianas em relação aos grupos controle, além de aumentar as taxas de sobrevivência de animais infectados em 80% (NASCIMENTO *et al.*, 2016). Em camundongos infectados com *Salmonella*, LP<sub>PII</sub> e

LP<sub>PIII</sub> mostraram possuir atividades semelhantes à plasmina e trombina, sendo responsáveis por manter a homeostase de coagulação (RAMOS *et al.*, 2012).

Tendo em vista as potencialidades anti-inflamatórias do látex de *C. procera*, pesquisas referentes à caracterização de moléculas envolvidas nestes efeitos se fazem fundamentais na busca de princípios ativos que possam suplementar tratamentos convencionais de infecções graves em seres humanos e animais. Particularmente, dados referentes à fração proteica LP<sub>PII</sub>, foco deste trabalho, ainda são incipientes.

### 2.3. *Salmonella* Typhimurium

As bactérias do gênero *Salmonella*, são bacilos gram-negativos, intracelulares facultativos, geralmente móveis por flagelos peritríquios, pertencentes à família Enterobacteriaceae (SILVA, 2007).

Acredita-se que este gênero divergiu de *Escherichia coli* há cerca de 100-150.000.000 anos atrás. É geneticamente diversificado e adaptou para colonizar muitos nichos e diferentes hospedeiros. São encontradas como comensais ou patógenos no intestino de animais tais como mamíferos, répteis, anfíbios, aves e até mesmo insetos (DOUGAN *et al.*, 2011).

O gênero *Salmonella* é composto por duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori* que causam enfermidades em seres humanos e animais. Possui cerca de 2.541 sorotipos conhecidos e divididos de acordo com fatores antigênicos, distribuídas nos mais diversos ambientes (DOUGAN *et al.*, 2011, ZHANG *et al.*, 2015).

Dentre as duas espécies de *Salmonella*, *S. enterica* possui maior importância para o homem e animais de sangue quente, exibindo considerável heterogeneidade antigênica e significativas diferenças no potencial de virulência. Dentro desta espécie estão contidos cerca de 99,5% dos sorotipos comumente isolados. É subdividida em seis subespécies, diferenciadas por características bioquímicas, antigênicas e filogenéticas. A subespécie I de *S. enterica* engloba a maioria dos sorotipos patógenos ao homem, os quais são diferenciados entre si com a escrita não itálica, por exemplo: *S. enterica* subsp. *enterica* Sor. Typhimurium ou apenas *S. Typhimurium* (DOUGAN *et al.*, 2011).

*S. enterica* é a causa globalmente importante de doenças transmitidas por alimentos e água, com manifestações que variam de gastroenterite, bacteremia e infecção sistêmica (MULLER *et al.*, 2009). Estima-se que 93,8 milhões de casos de gastroenterites são registrados anualmente relacionadas às espécies de *Salmonella*, ocasionando 155.000 mortes (MAJOWICZ *et al.*, 2010).

*S. Typhimurium* causa infecções em animais domésticos, podendo ser transmitida aos seres humanos e representam uma séria preocupação para a indústria alimentar (MASTROENI e SHEPPARD, 2004). Ingestão de alimentos de origem animal e seus derivados são as mais importantes vias de transmissão. *S. Typhimurium* foi detectado em carne de aves, ovos, salsicha, leite não pasteurizado, linguiça, carne suína, frutas e verduras (TAITT *et al.*, 2004, MÜRMAN *et al.*, 2007, KOTTWITZ *et al.*, 2010). Alimentos que possuem um alto teor de umidade, proteína e carboidratos, são favoráveis para a transmissão da doença (SHINOHARA *et al.*, 2008).

Os surtos de salmonelose foram relatados pela primeira vez por Gaffky, em 1880, quando os casos de toxinfecções alimentares aumentaram consideravelmente (RODRIGUE *et al.*, 1990). Representam um grande problema de saúde pública mundial, com significativa importância econômica, além da alta endemicidade, alta morbidade e difícil controle. (HOFER *et al.*, 1997).

Levando em consideração que a alimentação de derivados animais é a principal via de transmissão da *Salmonella spp.*, a presença desta bactérias em animais criados com objetivos comerciais, é um fator demasiadamente preocupante, ainda porque animais contaminados por *Salmonella* podem não apresentar sintomas, tornando-se fonte potencial de transmissão da doença para seres humanos (JAY, 2005, SHINOHARA *et al.*, 2008). *Salmonella* é um sério problema alimentar tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. No Brasil, no período entre 2000 e 2012, foram registrados 8.848 surtos de DTA (Doenças Transmitidas por Alimentos), e o principal agente etiológico associado foi a *Salmonella spp.*, tendo participação em 39,39% dos casos (SVS, 2013) Nos Estados Unidos, aproximadamente 30% dos casos notificados de intoxicação alimentar estão relacionados à *Salmonella* (OLSEN, 2000).

Os sintomas clínicos são variados e dependem da resposta individual de cada hospedeiro, inclusive quando infectados pelo mesmo isolado. Os principais fatores que derivam dessas interações patógeno-hospedeiro estão relacionados ao: (a)

sorotipo envolvido com a infecção; (b) espécie de hospedeiro; (c) dose infectante; (d) competência imunológica. Serovares NTS (*Salmonella* não tifoide) normalmente causam gastroenterite, diarreia auto-limitante, com bacteremia secundária principalmente em indivíduos imunocomprometidos (DOUGAN, 2011). A maioria das mortes acontece em regiões onde o acesso a água potável e cuidados de saúde são limitados (MAJOWICZ *et al.*, 2010).

#### **2.4. *Salmonella* Typhimurium como modelo de infecção experimental**

O início da infecção por *S. Typhimurium* ocorre devido à ingestão de alimentos contaminados. Após a ingestão de dose infectante suficiente, uma proporção do inóculo sobrevive a pH baixo, ambiente do estômago, para entrar no intestino delgado, onde a infecção pode ser estabelecida. Fatores que aumentam o pH do estômago tendem a reduzir a dose infectante, no entanto respostas adaptativas de *Salmonella* a estes ambientes de pH diferenciado podem ajudar na sua sobrevivência (MULLER *et al.*, 2009). Além do pH, as bactérias também devem resistir à barreira ciliar, muco espesso, ambiente ácido, peristaltismo, peptídeos antimicrobianos e microbiota endógena intestinal. Acredita-se que duas vias são utilizadas por *S. Typhimurium* para sua disseminação. A primeira é por meio do sistema linfático associado à mucosa (placas de Peyer), na segunda os macrófagos servem como veículos para estes microrganismos, uma vez que bactérias podem sobreviver no ambiente intracelular, sendo a seguir transportadas diretamente para a corrente sanguínea sem passar pelas placas de Peyer (WORLEY *et al.*, 2006). Na corrente sanguínea podem ser absorvidas pelos nódulos linfáticos, atingindo o sistema reticuloendotelial (RES), onde provoca infecção intracelular disseminada em macrófagos não ativados do baço e fígado (RICHTER-DAHLFORS *et al.*, 1997), podendo induzir apoptose e atingir outros órgãos.

A proteção do organismo contra salmonelose envolve a participação de macrófagos, que são ativados em resposta a componentes microbianos e da sinalização de receptores do tipo Toll-like (TLR). Estas células produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF e óxido nítrico. Macrófagos e células dendríticas orquestram as imunidades inatas e adquiridas com fagocitose, secreção de citocinas e apresentação de antígenos (VARELLA e FORTE,

2001, KALUPAHANA *et al.*, 2005, ABBAS, 2008, NG *et al.*, 2011). Muito embora uma série de mecanismos imunes sejam a favor de limitar a propagação da infecção por *Salmonella*, a mesma ainda pode causar infecções sistêmicas (WORLEY *et al.*, 2006).

## **2.5. Toll-Like Receptor**

A defesa do organismo é dada pela resposta imune a partir da identificação de diversos microrganismos, por meio da respostas inata e adaptativa. Assim, microrganismos podem ser reconhecidos e fagocitados por macrófagos, que processam e apresentam antígenos para linfócitos T. O reconhecimento de um microrganismo até a sua apresentação aos linfócitos é parte da resposta imune inata e a sequência de eventos posteriores é classificada como a resposta imune adaptativa (HOFFMANN *et al.*, 2000).

Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), do inglês *pathogen-associated molecular patterns*, são estruturas conservadas dos agentes infecciosos, não encontradas nos seres humanos e animais, sendo reconhecidas por receptores celulares de leucócitos capazes de distinguir entre antígenos próprios e não-próprios (GORDON, 2002).

Diferentes classes de microrganismos possuem PAMPs específicos. Bactérias gram-positivas têm sua parede celular constituída de peptidoglicano, bactérias gram-negativas, também por lipopolissacarídeos (LPS) e glicanos, glicolípidos e proteínas nos fungos, onde todas as substâncias encontradas são necessárias para o desenvolvimento do reconhecimento destes, ativando uma cascata de eventos intracelulares para síntese de citocinas e iniciação da resposta inflamatória e desencadeamento da resposta imune (GAZZINELLI e DENKERS., 2006, ERWIG e GOW, 2016). As PAMPs são estruturas moleculares não-variáveis expressas por diferentes grupos de patógenos e de suma importância para a virulência e/ou sobrevivência do agente (FLOHÉ *et al.*, 2006)

As PAMPs são reconhecidas por receptores do tipo Toll-Like (TLR), proteínas localizadas na superfície das células de defesa do hospedeiro, responsáveis pela geração de sinais dentro das células que levam ao desencadeamento da resposta

imune (ABBAS, 2008). Os TLRs são expressos principalmente em monócitos, macrófagos maduros, células dendríticas, mastócitos e células epiteliais do intestino.

Os TLRs pertencem a um grupo de proteínas transmembrânicas do tipo I, representada por uma porção citoplasmática, semelhante ao receptor de IL-1 (IL-1R), e uma porção extracelular rica em repetições de leucina. Até agora, treze TLRs foram identificados e descritos em mamíferos, doze dos quais estão expressos em ratos e dez em seres humanos, nomeados como TLR1 a TLR13. Os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6 são expressos na superfície celular, onde eles podem ligar padrões moleculares associados a patógenos extracelulares. TLRs 3, 7, 8, 9 e 10 são considerados intracelulares por serem expressos nas membranas endossômica e serem capazes de reconhecer ácidos nucleicos de micróbios que foram fagocitados pelas células (ABBAS, 2008, MC GETTRICK e Le O'NEILL., 2010, ZHAO *et al.*, 2014). Cada um dos 13 Toll-like existentes desencadeiam cascatas de sinalização intracelular específicas ao fazerem o reconhecimento de patógenos (FERRAZ *et al.*, 2011).

Estudos sobre os TLR, aumentam a compreensão dos mecanismos utilizados para a defesa do hospedeiro a partir do reconhecimento de PAMPs de microrganismos, sendo este o ponto chave para o desenvolvimento da imunidade contra antígenos específicos (ARANCIBIA *et al.*, 2007; BOWIE, 2007; WILSON *et al.*, 2008).

### **2.5.1 Toll-Like Receptor 4**

O lipopolissacarídeo (LPS), um glicolípido, é um dos principais componentes da membrana celular das bactérias gram-negativas, tais como *S. Typhimurium*. É conhecido como endotoxina, respondendo em parte pelo potencial de virulência e patogênese desse grupo de organismos (GALLAY *et al.*, 1993). O LPS pode ser liberado da membrana bacteriana durante a multiplicação ou após a fagocitose, ativando as vias de sinalização intracelular das células de defesa (TUIN *et al.*, 2006). As propriedades pró-inflamatórias e imunoestimuladoras do LPS são devidas ao componente lipídio A, que está ancorado na membrana bacteriana, ligado a uma cadeia de polissacarídeo altamente variável, o antígeno O. O lipídio A é a parte evolutivamente mais conservada de LPS responsável pela atividade pró-inflamatória

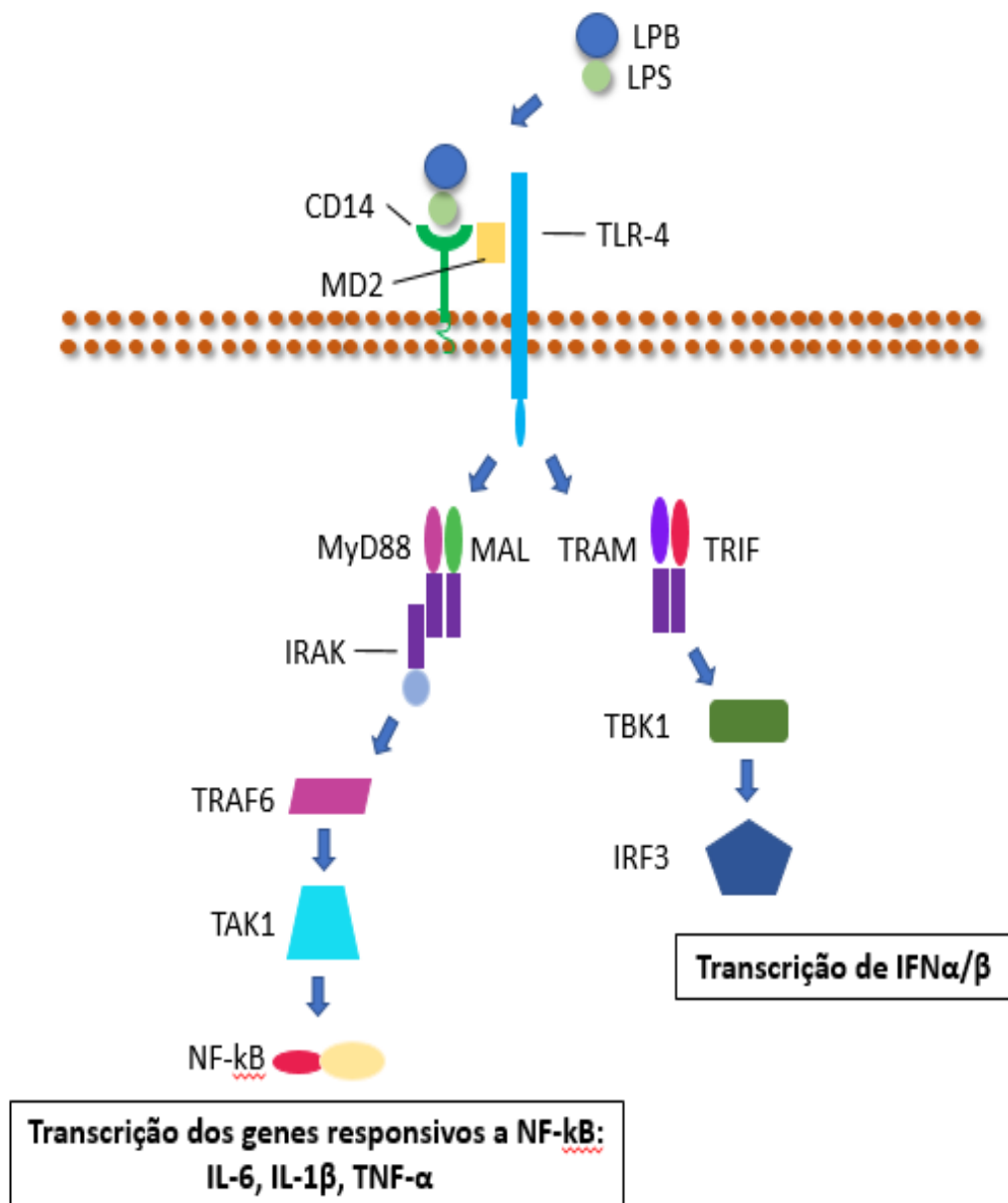
e indução de citocinas sob condições *in vivo* e *in vitro* (BONE *et al.*, 1992; BURRELL, 1994, KAWASAKI *et al.*, 2012, RAZA *et al.*, 2014; TROTTA *et al.*, 2014).

TLR-4 encontra-se na superfície principalmente de macrófagos e linfócitos e são altamente sensíveis na detecção de pequenas quantidades de LPS bacteriano. Esse reconhecimento é culminado a partir da proteína carreadora LBP (Proteína de ligação a lipopolissacarídeo) (figura 5). O complexo LBP-LPS se liga com alta afinidade à proteína chamada de CD14 (Grupamento de diferenciação 14), que pode ser encontrada na forma solúvel na circulação ou ancorada à membrana celular. Após a ligação, LBP é dissociada. O CD14 se associa diretamente ao domínio extracelular do TLR-4. Em seguida uma proteína celular denominada MD2 (Proteína Mielóide Diferenciada 2), se liga dando início ao complexo MD2-CD14-TLR4, considerado a principal forma de reconhecimento de LPS e ativação da cascata de sinalização intracelular (HENESSY *et al.*, 2010). A interação do LPS-TLR4 é constituída por pelo menos duas vias de sinalização. Na primeira, MyD88 (Fator de diferenciação mielóide 88) e Mal/TIRAP (Myd88 semelhante à adaptadora e proteína adaptadora contendo domínio TIR) são recrutados e levam à ativação de NF- $\kappa$ B por meio de IRAK, TRAF-6 e TAK1 (Receptor de interleucina-1 associado a cinase, fator associado ao receptor de TNF e Fator de crescimento transformante beta de cinase 1). Na segunda via TRAM (Molécula adaptadora relacionada com a TRIF) e TRIF levam à ativação do fator de resposta de interferon-3 (IRF-3) por meio de TBK1, iniciando a expressão de genes inflamatórios, dentre elas citocinas pró-inflamatórias (KAWAI *et al.*, 2006; ABBAS, 2008, CARMODY e CHEN, 2007, LU *et al.*, 2008).

A presença de um equilíbrio entre a ativação e inativação dos TLRs, torna-se necessária para evitar uma resposta inflamatória ou imunológica excessiva ou deficiente. A regulação na ativação dos receptores é feita por várias moléculas, que mantém uma linha tênue entre a saúde e a doença (FERRAZ *et al.*, 2011).

Toll Like estão relacionados a várias doenças, tais como cardiovasculares (BOEKHOLDT *et al.*, 2013), lúpus eritematoso sistêmico (URBONAVICIUTE *et al.*, 2011). A ativação desregulada do fator nuclear NF- $\kappa$ B contribui para o desenvolvimento do câncer (KRIEG *et al.*, 2007). TLR4 tem sido relatado por desempenhar um papel durante doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla e doença de Parkinson (TROTTA *et al.*, 2014).

**Figura 5:** Cascata de sinalização após ativação de TLR-4 por LPS.



Novos estudos referentes à interação TLR4-LPS abrem um leque para novas possibilidades terapêuticas e tratamento de infecções bacterianas sistêmicas. A desregulação das respostas do hospedeiro relacionada à alta quantidade de LPS em TLR4 de macrófagos, corriqueiramente, pode levar a uma indução aumentada de citocinas pró-inflamatórias desencadeando um quadro inflamatório sistêmico (ABBAS, 2008; ANGUS et al., 2001; RAETZ e WHITFIELD, 2002). As principais citocinas pró-inflamatórias expressas no hospedeiro incluem o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6), por sua vez provindas de células do sistema imune, como os macrófagos ativados (FRIEDMAN et al., 1998).



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Explorar o mecanismo de ação imunológica associado às atividades imunomodulatórias descritas para o constituinte protéico LP<sub>PII</sub> do látex de *Calotropis procera*, em infecções experimentais *ex vivo* por *Salmonella enterica* Sor. Typhimurium.

#### 3.2 Objetivos Específicos

Estabelecer um modelo de infecção experimental por *Salmonella* Typhimurium (cepa C5) em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss;

Verificar a influência da subfração LP<sub>PII</sub> do látex de *C. procera* no controle de *S. Typhimurium* intracelular em culturas de macrófagos peritoneais infectadas;

Analisar a viabilidade de macrófagos peritoneais infectados por *S. Typhimurium* e tratados com LP<sub>PII</sub>;

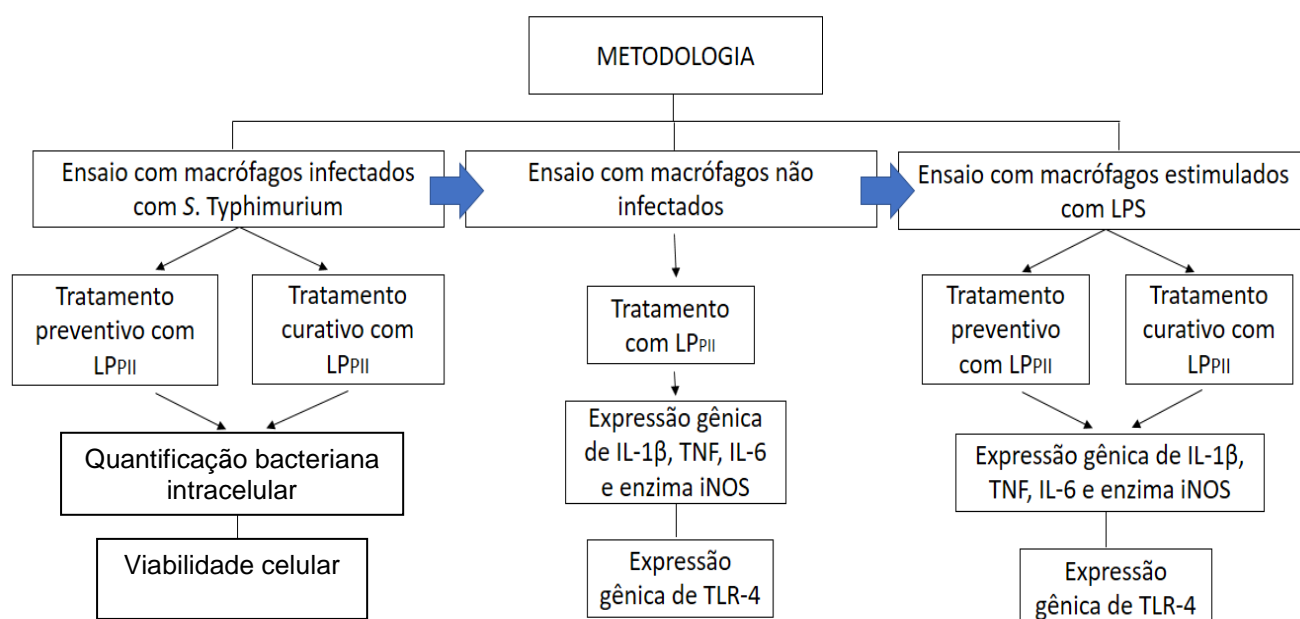
Avaliar a influência de LP<sub>PII</sub> de *C. procera* na expressão gênica de TLR4 e citocinas TNF, IL1- $\beta$ , IL-6 e enzima iNOs em culturas de macrófagos peritoneais;

Determinar a influência de LPS na expressão de citocinas TNF, IL1- $\beta$ , IL-6 e enzima iNOs e TLR4 em culturas de macrófagos peritoneais tratados com a fração proteica LP<sub>PII</sub> de *Calotropis procera*;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia e Imunologia - LAMIM da UFRPE, com exceção das leituras em espectrofotômetro para teste de viabilidade celular, que foram realizadas no Laboratório de Bacterioses da UFRPE. Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram realizados consoante aos procedimentos adotados internacionalmente e foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética e Uso Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco CEUA/UFRPE, com licença nº 055/2016, conforme anexo I.

**Figura 6** : Fluxograma metodológico



### 4.1 Cepas de *Salmonella Typhimurium*

Foram utilizadas cepas virulentas de *S. Typhimurium* C5, gentilmente cedidas pelo Dr. Pietro Mastroeni do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Cambridge. Tais bactérias foram mantidas congeladas a -20°C em glicerol 10%.

### 4.2 Animais experimentais

Camundongos Swiss fêmeas foram obtidos a partir do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), da Universidade Federal de Pernambuco, e pelo Biotério do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Os animais foram mantidos em gaiolas com

livre demanda de água e ração, com iluminação controlada (12h claro/escuro) e sob condições específicas livres de condições patogênicas até o momento dos experimentos.

### **4.3 Obtenção da fração proteica LP<sub>PII</sub>**

A subfração proteica LP<sub>PII</sub> estudada foi cedida pelo professor Dr. Márcio Ramos, da Universidade Federal do Ceará (UFC), obtidas segundo o protocolo descrito por Alencar *et al.*, (2006). O látex foi obtido através da quebra das folhas de *C. procera*, coletado em tubos de plásticos e misturados com água destilada estéril na razão de 1:1 (v:v). Em laboratório, as amostras seguiram para centrifugação em temperatura de 4°C 10.000 g/ 10 min. O precipitado, constituído principalmente por borracha, foi descartado. A solução sobrenadante foi colhida e levada à diálise em água destilada a 8°C durante 60 horas. Após centrifugação, o sobrenadante contendo as proteínas foi obtido. As proteínas solúveis (LP) foram liofilizadas e fracionadas por cromatografia de troca iônica em coluna de carboxi-metil (CM) Celulose para produção de três picos cromatográficos distintos, quando a cromatografia é desenvolvida em tampão acetato pH 5,0, e mantidas à temperatura ambiente até utilização. Os picos correspondem a uma fração não retida, denominada LP<sub>PI</sub> e duas adicionais dentro de um gradiente crescente de NaCl, denominadas LP<sub>PII</sub> e LP<sub>PIII</sub>, respectivamente.

As cromatografias foram realizadas continuamente com o objetivo de produzir quantidades satisfatórias de cada pico, onde foram testados em todos os ensaios de atividades biológicas. A proteína LP<sub>IAA</sub> foi obtida conforme protocolo supracitado, porém a atividade da protease cisteínica foi inativada na presença de iodoacetamida. As proteínas foram armazenadas desidratadas, à temperatura ambiente e em tubos tipo falcon estéreis.

### **4.4 Obtenção de macrófagos peritoneais**

Para a obtenção de macrófagos peritoneais e realização de ensaios *ex vivo*, camundongos fêmeas foram eutanasiados por meio de sedativo inalatório isoflurano. Atestada a morte do animal, este foi preso a partir dos membros em placa de parafina. O abdome do animal foi esterilizado com álcool 70%, e a seguir foi realizado corte em formato de “U” para remoção das estruturas que antecedem o peritônio, como epiderme e músculos, mantendo o peritônio parietal. Com o auxílio de uma

seringa de 20mL, foi injetado 10 mL de meio de cultura RPMI pré-aquecido a 37°C, adicionados antibióticos penicilina (6,77µl) e estreptomicina (10 µl), conforme descrito por Nascimento *et al.*, 2016. Após lavagem da cavidade peritoneal com massagens no abdome por cerca de 30 segundos, o fluido peritoneal foi retirado por meio de pipeta estéril de 1mL, através de pequena incisão realizada no peritoneo. Uma alíquota do fluido peritoneal, aproximadamente 20µL, foi corada com azul de Trypan na proporção 1:1. A quantificação de células do fluido se deu em câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio óptico, sendo a quantidade de células ajustada para conter  $1 \times 10^6$  cél./ mL, com realização de diluição com meio RPMI a 37°C com antibióticos penicilina e estreptomicina, caso necessário. A seguir, 0,2mL de fluido peritoneal na concentração  $1 \times 10^6$  cél./ mL foi semeado em placas para cultura celular de poliestireno de 96 poços, fundo chato, para a realização de testes de quantificação bacteriana e viabilidade celular. Para realização de teste de caracterização de expressão gênica de citocinas, iNOS e TLR, 1mL de fluido peritoneal na concentração  $1 \times 10^6$  cél./mL foi semeado em placas para cultura celular de poliestireno de 24 poços, fundo chato. Desta forma, estas placas de 96 ou 24 poços foram incubadas *overnight* em estufa para cultura celular, nas condições de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Na manhã seguinte, o sobrenadante foi retirado e descartado, restando apenas os macrófagos aderidos no fundo dos poços das placas (Figura 7), que foram submetidos aos experimentos que serão citados adiante.

**Figura 7:** Macrófagos aderidos em placa de cultivo celular, visualizados por meio de microscópio invertido. Fonte: Acervo pessoal.



#### 4.5 Ensaios com macrófagos infectados por *S. Typhimurium*

A fim de realizar infecção dos macrófagos peritoneais, a cepa virulenta de *S. Typhimurium* que estavam mantidas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  em glicerol 10% foram ativadas. Para reativação das bactérias e início dos ensaios com infecção, uma alíquota de *S. Typhimurium* C5 foi incubada em tubo tipo Falcon estéril contendo 5 mL de caldo infusão cérebro coração (BHI) pré-aquecido a  $37^{\circ}\text{C}$  e mantida em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , *overnight*. No dia seguinte pela manhã, 1 mL desta solução bacteriana foi posta em um novo tubo Falcon com BHI pré-aquecido e seguiu para incubação por mais 2 horas. Após esse período, o caldo BHI com bactérias passou por centrifugação a 4.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet bacteriano foi ressuspense em 5 mL de meio RPMI sem antibióticos pré-aquecido a  $37^{\circ}$ , e as culturas foram ajustadas em espectrofotômetro a 630 nm, considerando a densidade óptica de 0.5 correspondente a  $10^8$  UFC/ mL.

A infecção dos macrófagos peritoneais para a realização do teste de quantificação bacteriana e viabilidade celular, se deu de forma curativa e preventiva. Nos ensaios curativos, os macrófagos aderidos, conforme item 4.4, às placas de poliestireno de 96 poços, fundo chato, foram infectados com  $1 \times 10^8$  UFC/mL de *S. Typhimurium* durante o período de 4 horas. Os macrófagos foram mantidos em estufa para cultura celular a  $37^{\circ}\text{C}$  e atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Após as 4 horas, o sobrenadante foi descartado e cada poço contendo os macrófagos foram lavados com 0,2mL de PBS estéril pré-aquecido a  $37^{\circ}$  para remoção de excesso bacteriano. A seguir foi adicionado aos poços 0,2mL de meio RPMI contendo gentamicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), com a finalidade de causar morte das bactérias que ainda ficaram no meio extracelular, durante uma hora em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Passado este tempo, os macrófagos foram novamente lavados com PBS e aos poços foram adicionados  $\text{LP}_{\text{PII}}$  nas concentrações 1 ou 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou  $\text{LP}_{\text{PII}}$  tratada com iodoacetamida ( $\text{LP}_{\text{PII}}+\text{IAA}$ ) na concentração de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ressuspense em RPMI, contendo gentamicina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) com a finalidade de manter os poços íntegros e sem bactérias extracelulares até o fim do experimento. Desta forma, as placas contendo os macrófagos e tratamento com  $\text{LP}_{\text{PII}}$  ou  $\text{LP}_{\text{PII}}+\text{IAA}$  foram incubadas em estufa para cultivo celular durante 24 horas em atmosfera de  $37^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ .

Já nos testes preventivos, os macrófagos foram tratados durante 24 horas com  $\text{LP}_{\text{PII}}$  nas concentrações 1 ou 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e  $\text{LP}_{\text{PII}}+\text{IAA}$  (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ressuspense em

RPMI com antibióticos penicilina e estreptomicina, pré-aquecido a 37°C e incubados em estufa para cultivo celular nas condições de temperatura 37°C e CO<sub>2</sub> 5%. A infecção com 1x10<sup>8</sup>UFC/mL de *S. Typhimurium* foi realizada após as 24 horas do tratamento com LP<sub>PII</sub>, por 4 horas. Para isso, o sobrenadante contendo as proteínas foi descartado, os macrófagos foram lavados com 0,2mL de PBS estéril pré-aquecido a 37°C e após houve a infecção conforme citado. Após as 4 horas, o sobrenadante foi excluído e os macrófagos foram lavados com 0,2mL de PBS pré-aquecido com a finalidade de retirar bactérias que estivessem em meio extracelular..

#### **4.5.1 Quantificação de unidades formadoras de colônias em macrófagos peritoneais infectados**

Em placas de cultura celular de 96 poços, os macrófagos aderidos foram infectados com 1x10<sup>8</sup> UFC/mL *Salmonella* Typhimurium, e tratados de forma preventiva e curativa com LP<sub>PII</sub> nas concentrações 1 ou 10 µg/mL e LP<sub>PII</sub>+IAA (10 µg/mL), conforme descrito no item 4.5, para realização de quantificação bacteriana intracelular. Como grupo controle foram utilizados macrófagos infectados com *S. Typhimurium* sem tratamento com LP<sub>PII</sub>. Como metodologia, tanto nos ensaios curativos como preventivos, o sobrenadante foi retirado dos poços contendo os macrófagos infectados aderidos, e a seguir foi adicionado 0,2mL de Triton X-100 0,5%. O Triton, um detergente, acarretou a lise celular dos macrófagos peritoneais, sendo possível expor as bactérias intracelulares e estas serem submetidas à quantificação. Após adição de Triton, os macrófagos foram incubados em geladeira a 10°C, por 20 minutos. Com a lise celular, o conteúdo dos poços foi submetido a diluições decimais de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-3</sup> em PBS estéril. Alíquotas de cada diluição (15µL), foram semeadas em placas de petri com ágar BHI e incubadas em estufa a 37°C, *overnight*. No dia seguinte pela manhã, houve a contagem de UFC dos poços que cresceram nas placas com BHI, sendo escolhida para a contagem a diluição mais nítida. Protocolo adaptado de Nascimento et al., 2016.

#### **4.5.2 Viabilidade de macrófagos infectados com *S. Typhimurium***

A viabilidade celular foi avaliada conforme adaptação do protocolo descrito por Shum *et al.* (2008). Para realização deste ensaio, foram utilizados macrófagos peritoneais infectados com *S. Typhimurium*, teste curativo, conforme descrito no item

4.5. Após os macrófagos serem infectados com *S. Typhimurium*  $1 \times 10^8$  UFC/mL e tratados com a fração proteica LP<sub>P11</sub> (1 µg/mL ou 10 µg/mL) ou LP<sub>P11</sub>+IAA (10 µg/mL), foi adicionado aos poços contendo os macrófagos infectados aderidos, 40 µL de resazurina (0,15 mg/mL em PBS estéril). Como grupo controle foram utilizados macrófagos infectados sem tratamento com LP<sub>P11</sub>. Os macrófagos então foram incubados durante 4h em estufa de cultivo celular a 37°C e CO<sub>2</sub> 5%. A resazurina é um corante azul, indicador de oxirredução, fracamente fluorescente que é reduzido a resorifina, ficando na cor rosa. A viabilidade de macrófagos foi mensurada por espectrofotômetro com leitura de densidade óptica 570 e 600 nm. Os experimentos de viabilidade foram realizados em triplicada.

#### **4.6 Ensaio com macrófagos tratados com LP<sub>P11</sub>**

Teste realizado para avaliação da expressão gênica de citocinas IL-6 IL1- β, TNF, INOs e TLR-4 em macrófagos que foram tratados com LP<sub>P11</sub> ou LP+IAA. Deste modo, macrófagos obtidos conforme item 4.4, aderidos em placas de cultivo celular de 24 poços, receberam tratamento com LP<sub>P11</sub> (1 µg/mL ou 10 µg/ mL) ou LP+IAA (10 µg/mL). Estes foram incubados em estufa para cultura celular em atmosfera de 37°C e CO<sub>2</sub> 5% durante o período de 24 horas. Após, o sobrenadante foi descartado e as células foram submetidas a extração de RNA, conforme será descrito no item 4.8.1.

#### **4.7 Ensaio com macrófagos estimulados com LPS**

Teste realizado para determinar a resposta de macrófagos na expressão de citocinas, iNOS e TLR-4 quando estimulados por LPS bacteriano. O método descrito por Batista (2017) foi seguido. Macrófagos obtidos conforme item 4.4 foram tratados de forma curativa e preventiva. No teste curativo, macrófagos peritoneais aderidos a placas de cultivo celular de 24 poços, receberam estímulo 5 µL/mL de LPS (Sigma Aldrich) diluído em meio de cultura RPMI pré-aquecido a 37°C com antibióticos penicilina e estreptomicina, e foram incubados em estufa de cultivo celular a 37°C e CO<sub>2</sub> 5%, durante 4 horas. Após, o sobrenadante foi retirado, e as células foram lavadas com PBS estéril pré-aquecido a 37°C para retirada de qualquer possível acúmulo de LPS do poço. A partir de então, se iniciou o tratamento com LP<sub>P11</sub> (1 µg/mL ou 10 µg/mL) ou LP+IAA (10 µg/mL) durante o período de 24 horas para posterior extração de RNA. No teste preventivo, os macrófagos receberam tratamento com

LP<sub>P11</sub> (1µg/mL ou 10µg/mL) ou LP+IAA (10µg/mL), incubados em estufa de cultivo nas condições já citadas durante 24 horas. Após tempo determinado, as células foram lavadas com PBS pré-aquecido a 37°C e expostas a estímulo durante 4 horas com LPS 5 µL/mL de LPS (Sigma Aldrich) diluído em meio de cultura RPMI pré-aquecido a 37°C com antibióticos penicilina e estreptomicina. As células foram incubadas em estufa nas condições supracitadas e após o término do ensaio, o sobrenadante foi descartado e as células foram submetidas a extração de RNA, conforme será descrito no item 4.8.1.

#### 4.8.1 Extração de RNA total

Para avaliar a expressão gênica de IL-1, IL-6, TNF, iNOS e TLR-4 em macrófagos tratados com LP<sub>P11</sub> ou estimulados com LPS e tratados com LP<sub>P11</sub> de forma curativa e preventiva, o RNA destas células foram extraídas para análise da síntese destas proteínas. Desta forma, das placas de 24 poços o sobrenadante foi retirado. Os macrófagos aderidos foram lavados com 1 mL de PBS gelado e estéril. Após, foi adicionado aos poços com macrófagos 400 µL de Trizol (Sigma Aldrich) para lise química. Ainda, uma ponteira estéril foi utilizada para lise mecânica, sendo o conteúdo transferido para novo microtubo tipo eppendorf, contendo 40 µL de clorofórmio. Posteriormente o conteúdo dos tubos foram homogeneizados em vórtex por 15 s. A seguir houve centrifugação a 10.000 g durante 5 minutos. Houve a separação de fase aquosa, e esta foi recolhida e transferida para novo tubo contendo 200µL de isopropanol gelado. Os tubos tiveram conteúdo misturado gentilmente e deixados descansar durante 5 minutos. Logo foram centrifugados a 13.300 g durante 30 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* formado foi lavado com etanol 75% gelado, seguido de centrifugação a 13.300 g por 5 minutos, sendo esta etapa repetida duas vezes. O RNA total obtido em forma de *pellet* foi colocado para secar em temperatura ambiente. Após seco, foi ressuspendido em 20 µL de água ultrapura.

#### 4.8.2 RT-PCR

O RNA total obtido foi utilizado como molde para síntese de uma cadeia de DNA complementar (cDNA), que a esta foi aplicada a técnica de RT PCR. Para isto, foi usado o kit comercial (SIGMA M-MLV Reverse Transcriptase), conforme instruções do fabricante. A amplificação do cDNA por PCR foi realizada com kit comercial (SIGMA-SYBR-Green Quantitative RT-PCR KIT), segundo orientações do



fabricante. A amplificação de transcritos para as citocinas Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), Interleucina 6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral (TNF) e a enzima oxido-nítrico sintase (iNOs) foram analisados segundos primers específicos e o controle interno de amplificação feito com a enzima Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Os iniciadores utilizados nessas reações são descritos na tabela 1.

Tabela 1 Primers específicos utilizados para a realização de amplificação de cDNA por meio de RT PCR.

|              |  |
|--------------|--|
| IL-1 $\beta$ | Forward 5' TGAGCACCTTCTTTTCCTTCA 3';<br>Reverse 5' TTGTCTAATGGGAACGTCACAC 3' |
| IL-6         | Forward 5' TAATTCATATCTTCAACCAAGAGG 3'<br>Reverse 5' TGGTCCTTAGCCACTCCTTC 3' |
| TNF          | Forward 5' CTGTAGCCCACGTCGTAGC 3'<br>Reverse 5' GGTGTCTTTGAGATCCATGC 3'      |
| iNOs         | Forward 5' TGTGGCTACCACATTGAAGAA 3'<br>Reverse 5' TCATGATAACGTTTCTGGCTCTT 3' |
| TLR-4        | Forward 5'CGATTCCATTGCTTCTTG 3'<br>Reverse 5' GCTCAGGTCCAGGTTCTT 3'          |
| GAPDH        | Forward 5' ACCACTTTGGCATCGTGGAG 3'<br>Reverse 5' GGGCCATCCACGGTCTTCTG 3'     |

A condição da reação de PCR foi a seguinte: 42°C/ 30 min, 95°C/ 10 min e 40 ciclos à 95°C/ 30 s, 58°C/ 30 s e 72°C/ 30s (Rotor Gene Q series – Qiagen) em reações com volumes de 20  $\mu$ L. Os resultados foram analisados segundo Dussault e Pouliot (2006) fórmula descritas por Dussault e Pouliot:

$$\Delta\Delta Ct = [(Ct_{GI\text{Controle}} - Ct_{ACT\text{Controle}}) - (Ct_{GI\text{Experimental}} - Ct_{ACT\text{Experimental}})]$$

Na fórmula acima, GI representa os valores de Ct (Cycle Threshold) dos genes de interesse que foram observados nos grupos experimentais (estimulados com LP<sub>PII</sub>), cujos resultados foram expressos em termos de variação relativa aos grupos controles utilizando a fórmula  $2^{\Delta\Delta Ct}$ .

#### 4. 9 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  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. A significância mínima considerada foi nível de  $p < 0,05$ . Análises e gráficos foram realizados no programa GrafPad Prism versão 5.0

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tratamentos preventivos com macrófagos expostos à fração proteica LP<sub>PII</sub> (10µg/mL), mostraram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na quantidade de UFC/poço, em relação à presença de bactérias intracelulares do que em macrófagos sem tratamento (Figura 8). Em relação ao teste curativo, macrófagos infectados tratados com LP<sub>PII</sub> (1 µg/mL) demonstraram uma diminuição significativa na quantidade de UFC/poço em comparação ao grupo controle de macrófagos sem tratamento. Já o grupo LP<sub>PII</sub>+IAA (10µg/mL), onde LP<sub>PII</sub> teve as proteases cisteínica inativadas com iodoacetamida, demonstraram aumento significativo na quantidade de UFC/poço em relação aos grupos LP<sub>PII</sub> (1 µg/mL ou 10 µg/mL) (Figura 9, A). O maior número de bactérias no grupo tratado com LP<sub>PII</sub>+IAA (10µg/mL), indica, portanto, a participação de proteases cisteínicas no efeito antimicrobiano observado. Anteriormente, Nascimento *et al.* (2016), demonstraram ação antimicrobiana intracelular em macrófagos infectados por *Listeria monocytogenes* e tratados com proteínas do látex de *C. procerca*, subfração proteica LP<sub>PI</sub>, em relação ao grupo controle tratado com albumina. Apesar disso, as proteínas do látex não possuem ação antimicrobiana direta contra *Salmonella*, observado por testes de exposição *in vitro* da bactéria a altas doses de LP (LIMA-FILHO *et al.*, 2010. Dados ainda não publicados demonstram que LP<sub>PII</sub> não possuiu atividade antibacteriana direta contra *Salmonella* Typhimurium.

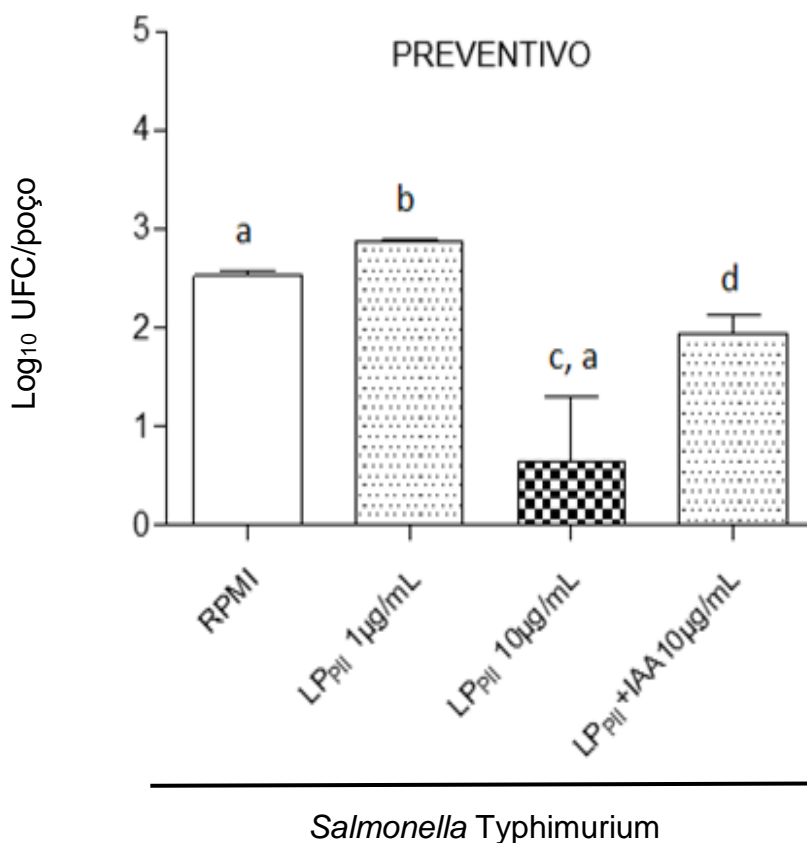
Ao invadirem macrófagos, *S. Typhimurium* se replica e induz a ativação de citotoxinas dentro dessas células. Foi demonstrado que *Salmonella* spp. é capaz de causar morte celular. Esta, induz a apoptose de macrófagos pela ativação da enzima pró-apoptótica caspase-1, resultando na liberação da forma ativa da Interleucina-1 beta, sendo a atividade da caspase-1 é essencial para a citotoxicidade (HERSH *et al.*, 1999). Considerando os resultados obtidos no teste de quantificação bacteriana intracelular, onde grupos de macrófagos infectados tratados com LP<sub>PII</sub> tiveram a quantidade de UFC/poço reduzida em relação ao grupo controle, macrófagos infectados sem tratamento com LP<sub>PII</sub>, um teste curativo de viabilidade celular foi realizado. Observou-se que macrófagos infectados com cepa virulenta C5 de *S. Typhimurium* tratados com frações proteicas LP<sub>PII</sub> ou LP<sub>PII</sub>+IAA, apresentaram maior viabilidade celular que aqueles que não receberam tratamento com a subfração proteica. Por exemplo, o grupo tratado com LP<sub>PII</sub> (1 µg/mL) obteve viabilidade

14,74% maior que o grupo controle sem tratamento, enquanto que macrófagos tratados com LP<sub>P11</sub> (10 µg/mL) alcançaram 24,11%. O tratamento com LP<sub>P11</sub>+IAA (10 µg/mL) também aumentou a viabilidade celular em 21,28% (Figura 9, B). O aumento de viabilidade dos macrófagos infectados pode ter relação à atividade antimicrobiana indireta apresentada por LP<sub>P11</sub>. Além disso, a maior viabilidade celular em macrófagos infectados tratados com LP<sub>P11</sub>, pode estar relacionado a regulação negativa de IL-6, como será exposto adiante, citocina também associada com dano celular. Ainda, não foi observada toxicidade da fração proteica estudada nas concentrações testadas. Segundo Ramos *et al.*, 2006, as frações do látex de *C. procera* não apresentam efeitos tóxicos *in vitro*, elucidando que a toxicidade presente no látex está concentrada na borracha presente, que pode ser facilmente separada das frações proteicas. Contudo, já foi demonstrado que LP diminui a viabilidade de macrófagos peritoneais em concentrações maiores que 100 µg/mL (NASCIMENTO, 2016). Neste estudo, verificamos que baixas concentrações de LP<sub>P11</sub> (1 e 10 µg/mL) não tóxicas, foram suficientes para diminuir as bactérias intracelulares em macrófagos infectados bem produzir aumento na viabilidade destes.

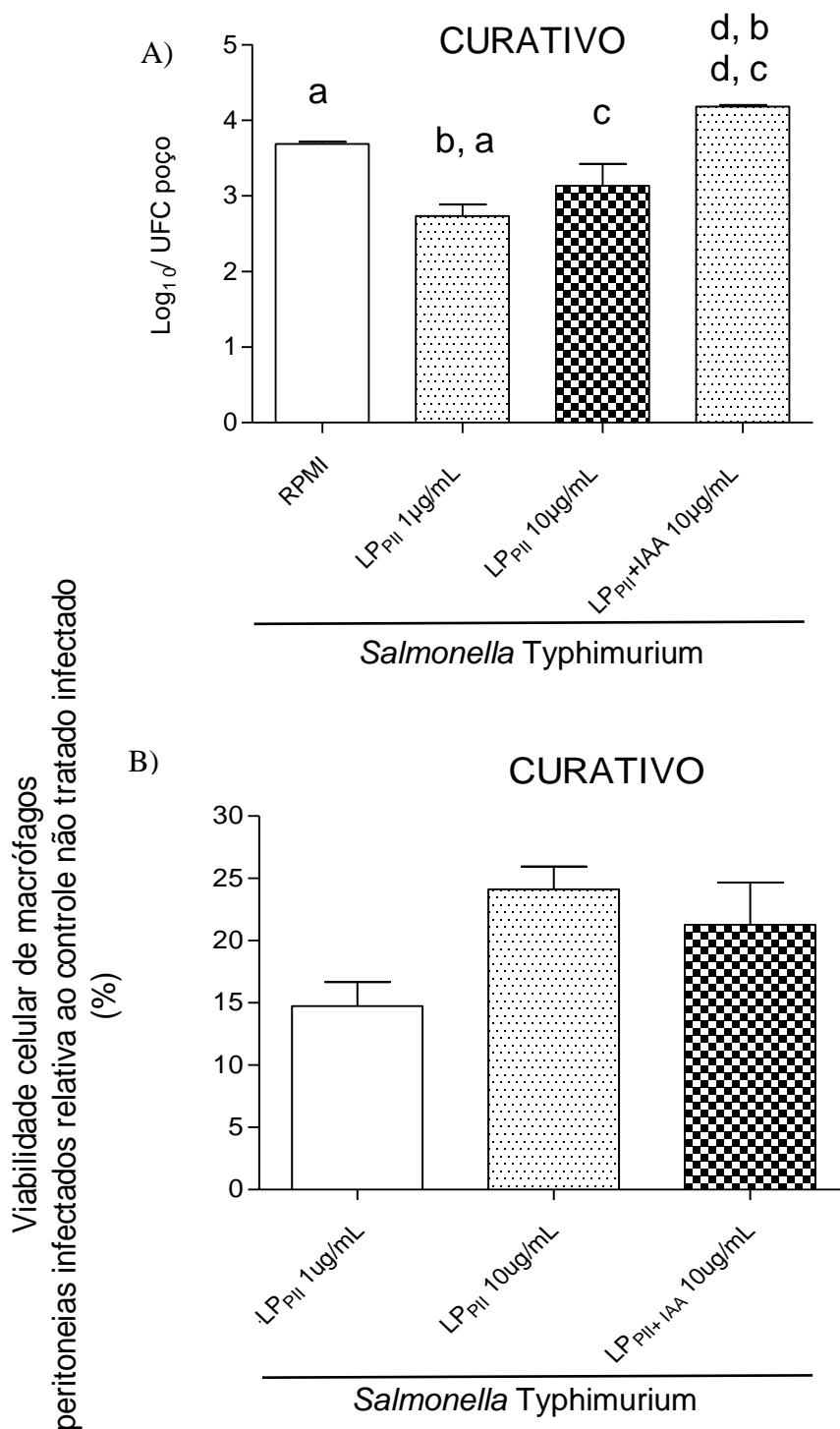
Considerando o tratamento de macrófagos peritoneais com LP<sub>P11</sub> (1 ou 10 µg/mL) ou LP/IAA (10 µg/mL) durante 24 horas, observou-se a influência desta fração proteica na expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias e iNOS (Figura 10). Foi observado que LP/IAA, com proteases cisteínicas inativadas, teve a tendência a induzir a expressão gênica de TNF e IL1-β. De forma mais discreta houve expressão de IL-6 com LP/IAA. Quando comparados com macrófagos tratados com LP<sub>P11</sub> sem a inativação das proteases cisteínicas por iodoacetamida, é possível observar que há uma menor indução na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias em ambas as concentrações, 1µg/mL ou 10µg/mL, indicando o efeito dessas proteases no efeito observado. Macrófagos tratados com LP<sub>P11</sub> (1 ou 10 µg/mL) ou LP/IAA (10 µg/mL) não apresentaram expressão de Inos. Anteriormente, macrófagos tratados com LP tiveram indução na expressão gênica de TNF, IL-6 e IL1-β, não sendo efetiva em estimular iNOS (NASCIMENTO *et al.*, 2016).

O reconhecimento de LPS de *S. Typhimurium* por TLR-4 de macrófagos leva a sua ativação e início produção de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β, IL-6 e TNF (TALBOT *et al.*, 2009). Deste modo, foi realizado teste curativo, no qual macrófagos peritoneais foram inicialmente estimulados por LPS durante o período de 4 horas, seguido tratamento com LP<sub>P11</sub> durante 24 horas. A expressão das

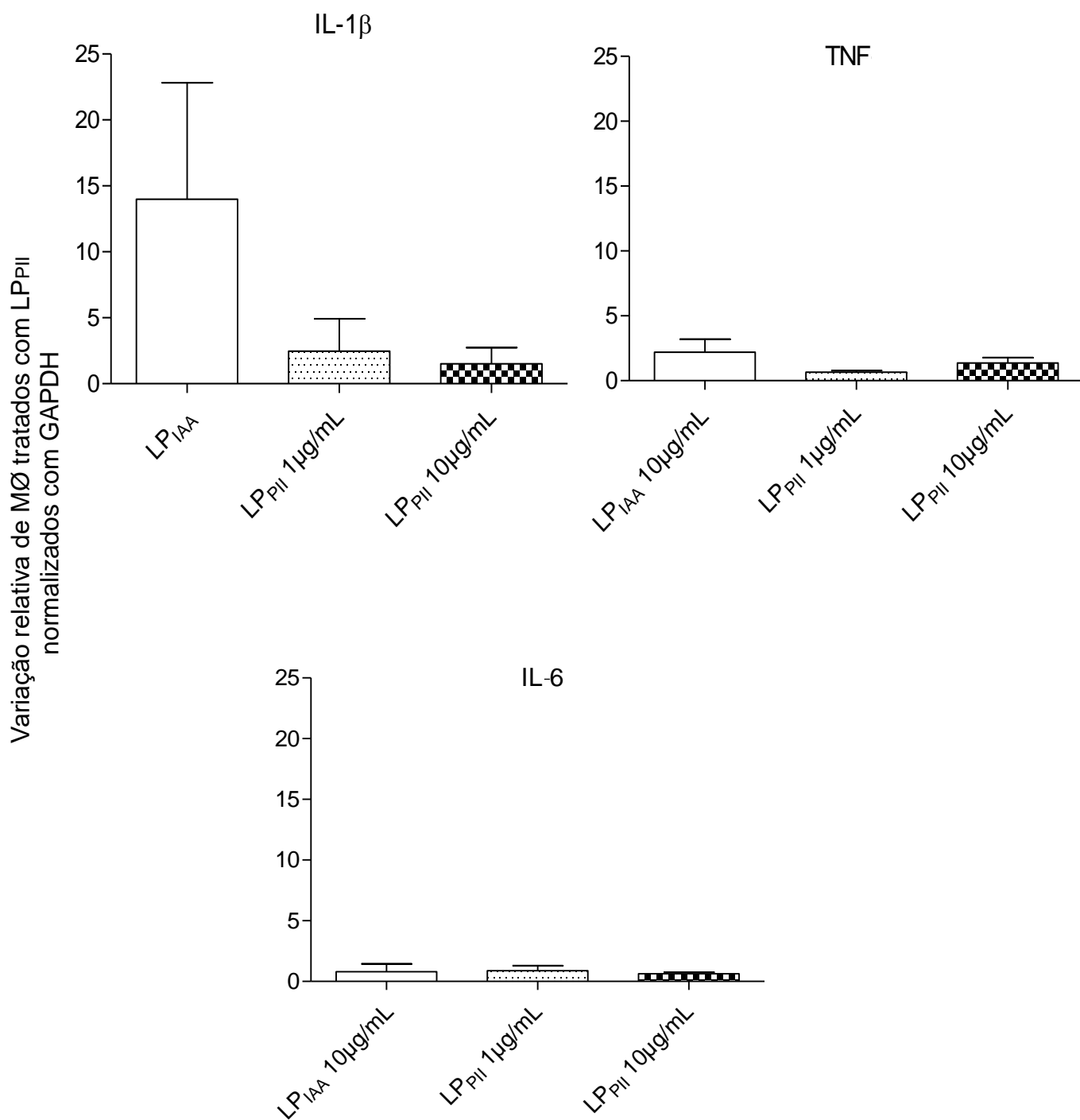
citocinas TNF, IL-  $\beta$  e IL-6 e de INOs foram avaliadas (Figura 11). Foi observado que a fração proteica de LP<sub>P11</sub> foi capaz de diminuir a expressão de TNF, IL-  $\beta$  e IL-6 em relação ao controle LPS. Observa-se que há uma diminuição mais evidente na expressão dessas citocinas na concentração 1  $\mu$ g/mL. iNOS não apresentou expressão.



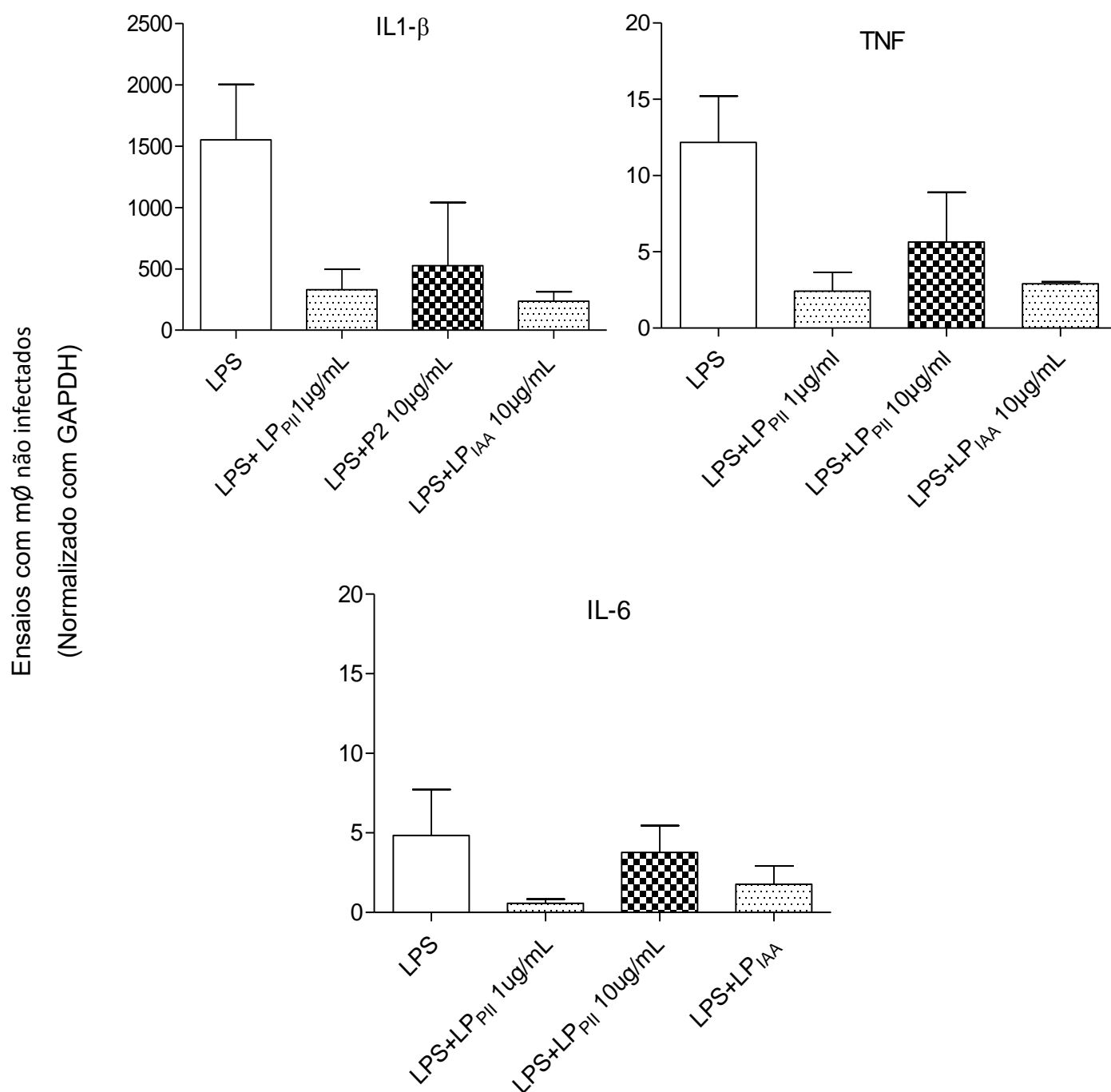
**Figura 8:** Quantificação de população intracelular de *S. Typhimurium* em macrófagos teste preventivo. Macrófagos foram tratados com LP<sub>P11</sub> (1  $\mu$ g/mL ou 10  $\mu$ g/mL) ou LP<sub>P11</sub>/IAA (10  $\mu$ g/mL), seguido de infecção de *S. Typhimurium* C5. Os dados representam média de três medições. Nível de significância  $p < 0,05$  de acordo com o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.



**Figura 9.** Ensaio com macrófagos infectados. (A) Quantificação de população intracelular de *S. Typhimurium* em macrófagos teste curativo. Macrófagos foram infectados por *S. Typhimurium* C5, seguido de tratamento por LP<sub>PII</sub> 1µg/mL ou LP<sub>PII</sub> 10µg/mL ou LP<sub>PII</sub>/IAA 10µg/mL durante 24 horas. (B) Viabilidade celular de macrófagos infectados por *S. Typhimurium*, durante 4h, seguido de tratamento com LP<sub>PII</sub> (1µg/mL ou 10µg/mL) ou LP<sub>PII</sub>/IAA (10µg/mL) por 24 horas. Os dados representam a média de três medições.



**Figura 10:** Expressão gênica de citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6 em ensaio com macrófagos peritoneais tratados durante 24 horas com LP<sub>P11</sub> (1 $\mu$ g/mL ou 10 $\mu$ g/mL) ou LP/IAA (10 $\mu$ g/mL). Os dados representam a média de três medições.

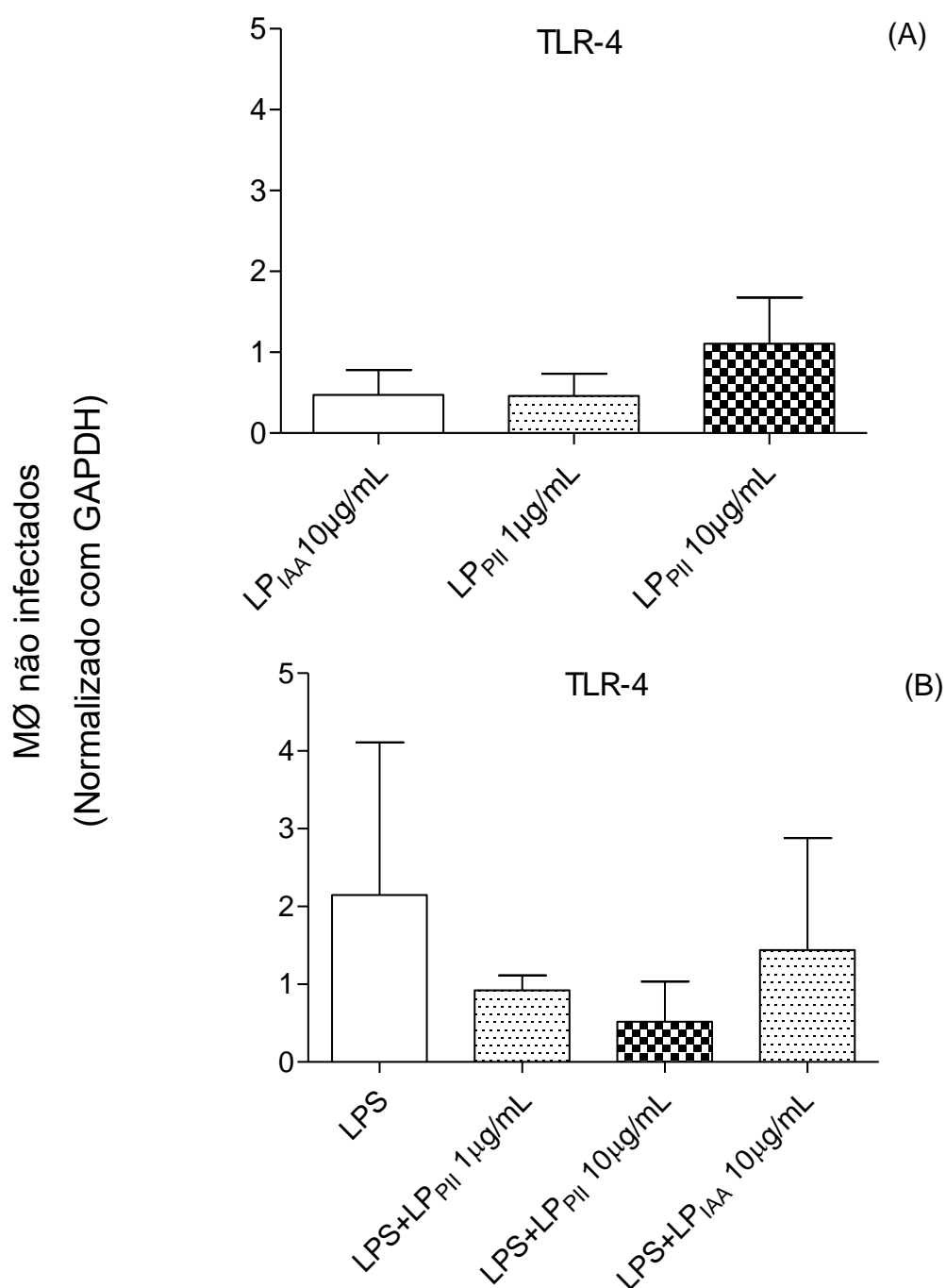


**Figura 11:** Ensaio curativo com macrófagos estimulados com LPS. Expressão gênica de citocinas IL-1  $\beta$ , TNF e IL-6 em cultura de macrófagos peritoneais estimulados com LPS 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por um período de 4 horas seguido de tratamento com LP<sub>PII</sub> 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou LP<sub>PII</sub> 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou LP<sub>IAA</sub> 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por um período de 24 horas. Os dados representam média de três medições.

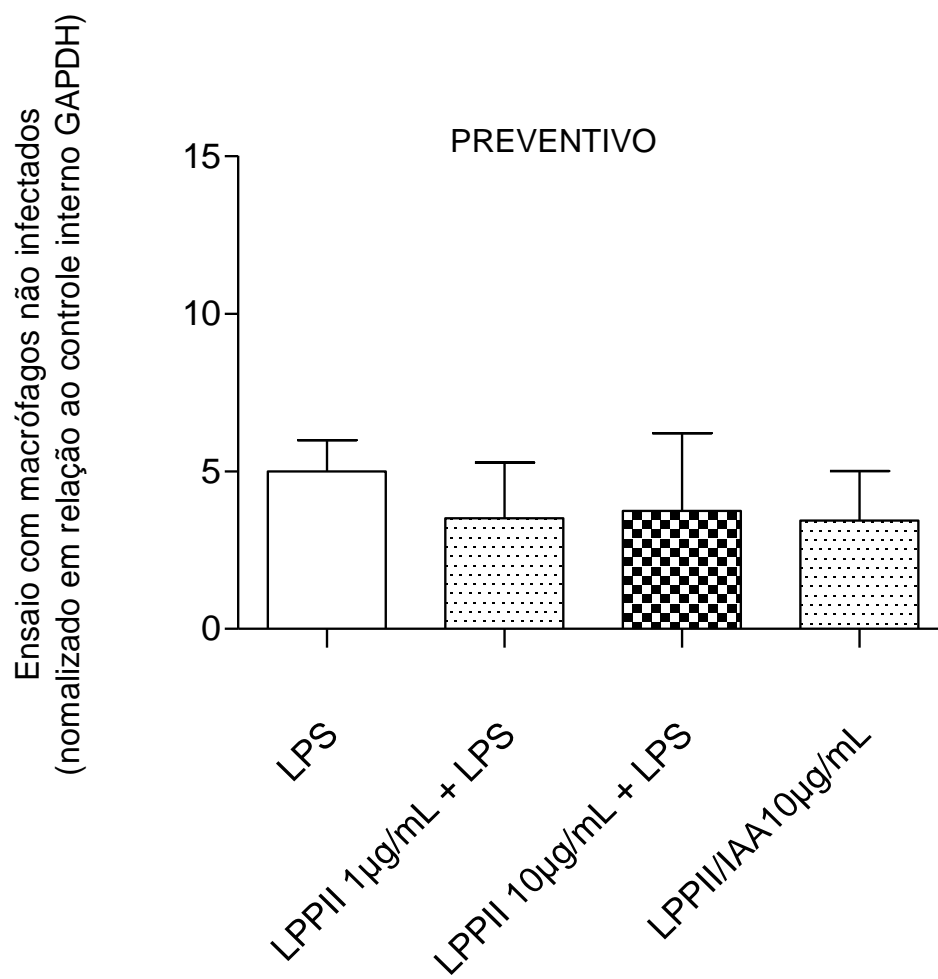


O tratamento de macrófagos apenas com LP<sub>PII</sub> (1µg/mL) ou LP+IAA (10 µg/mL) apresentaram baixa expressão de TLR-4, tendo uma maior expressão em LP<sub>PII</sub> (10 µg/mL) (Figura 12, A). Ainda macrófagos estimulados com LPS mostraram expressão diminuída de TLR-4 quando tratados com as concentrações LP<sub>PII</sub> (1µg/mL ou 10 µg/mL) e quando tratados com LP inativada demonstraram um aumento na expressão deste receptor (Figura 12, B). TLR's são formados por repetições ricas em leucinas flanqueadas por domínios ricos em cisteína (ABBAS, 2008), desta forma, acredita-se que LP<sub>PII</sub>, rica em proteases cisteínicas tenha tido efeito na discreta diminuição de expressão de TLR-4 e, consecutivamente, tendência na diminuição na expressão de citocinas IL-1 β, IL-6 e TNF. Considerando a ausência de expressão de iNOs, tal fato foi atribuído ao estímulo de produção de derivados oxidativos da cadeia respiratória. Contudo, em tratamento preventivo com as proteínas do látex durante 24 horas e estímulo de LPS durante o período de 4 horas, foi observado a expressão apenas de citocina IL-6 (Figura 13), não havendo diferença na expressão desta citocina no grupo e controle. A expressão de outras citocinas, TLR-4 e iNOS não foi observada com os tratamentos. Ainda em estudos referentes às proteínas do látex de *C. procera*, LP diminuiu a liberação de IL-1 e reduziu discretamente a expressão de IL-12 em macrófagos estimulados com LPS (LIMA-FILHO et al., 2010). A fração proteica LP<sub>PI</sub> demonstrou diminuição dos transcritos de mRNA para TNF em macrófagos infectados com *L. monocytogenes* (NASCIMENTO et al., 2016). Neste estudo, a tendência na regulação negativa da expressão de IL-1 β, TNF e IL-6, mediadores inflamatórios, e TLR-4 por LP<sub>PII</sub> corrobora ALENCAR et al. (2004), quanto a demonstração de que a fração LP possui propriedades anti-inflamatórias.

V



**Figura 12:** (A) Expressão gênica de TLR-4 em cultura de macrófagos tratados com LP<sub>P<sub>II</sub></sub> (1 µg/mL ou 10 µg/mL) ou LP<sub>I<sub>AA</sub></sub> (10 µg/mL) por 24 horas. (B) Ensaio curativo com macrófagos estimulados com LPS. Expressão gênica de TLR-4 em cultura de macrófagos tratados com LPS 5 µg/mL por um período de 4 horas. Após tempo estimado, as células foram tratadas com LP<sub>P<sub>II</sub></sub> 1 (µg/mL ou LP<sub>P<sub>II</sub></sub> 10 µg/mL) e LP<sub>I<sub>AA</sub></sub> (10 µg/mL) por 24 horas. Os dados representam média de três medições.



**Figura 13:** Ensaio preventivo com macrófagos estimulados com LPS. Expressão gênica de IL-6 em macrófagos tratados com LP<sub>P11</sub> (1 µg/mL ou 10 µg/mL) ou LP<sub>IAA</sub> (10 µg/mL) por 24 horas, seguido de tratamento com LPS 5 µL/mL durante 4 horas. Os dados representam média de três medições.

## 6. CONCLUSÃO

As plantas laticíferas apresentam moléculas bioativas que têm sido isoladas e purificadas, sendo que aquelas de natureza proteica apresentam a vantagem de poderem ser clonadas e expressas em sistemas heterólogos. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com LP<sub>PII</sub> foi benéfico ao diminuir a quantidade de bactérias intracelulares em macrófagos infectados por *S. Typhimurium*, tanto em testes curativos como preventivos, além de aumento de viabilidade de macrófagos infectados em testes curativos. Também, macrófagos estimulados com LPS bacteriano e tratados com LP<sub>PII</sub> demonstraram tendência em diminuir a expressão de TLR-4 e, consecutivamente TNF, IL-1  $\beta$  e IL-6. A análise de todos os resultados mostra que LP<sub>PII</sub> de *C. procera* possui moléculas bioativas promissoras na modulação da resposta imune.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMANN, A.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 6. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ABRAHAM, K.I. e JOSHI, P.N. Studies on proteinases from *Calotropis gigantean* latex. Purification and some properties of two proteinases containing carbohydrates. *Biochim. Biophys. Acta*, 568: 111-119, 1979.

AGRAWAL, A. A. e KONNO, K. Latex: A Model for Understanding Mechanisms, Ecology, and Evolution of Plant Defense Against Herbivory. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 40:311–31, 2009.

AGRAWAL, A.A.; LAJEUNESSE, M.J.; FISHBEIN. Evolution of latex and its constituent defensive chemistry in milkweeds (*Asclepias*): a phylogenetic test of plant defense escalation. *Entomologia experimentalis et applicata*. 128:126-138, 2008.

AGRAWAL, R.; KAUR, K.; SURI, M.; BAGAI, U. Anthelmintic potential of *Calotropis procera*, *Azadirachta indica* and *Punica granatum* against *Gastrothylax indicus*. *Journal of Parasitic Diseases*. 40:1230-1238, 2016.

ALBERTI, C. et al. Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 168:77-84, 2003.

ALENCAR, N. M. N. et al. 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, 2004.

ALENCAR, N. M. N. et al. Pro-and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. *Inflammation Research*, 55:559–564, 2006.

ALI, A.; ANSARI, A.; QADER, S.A. MUMTAZ, M.; SAIED, S.; MAHBOOB, T. Antibacterial potential of *Calotropis procera* (flower) extract against various pathogens. *Pak J Pharm Sci*. 27:1565-1569, 2014.

ANGUS, D.C., et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care, *Crit. Care Med*. 29, 1303–1310, 2001.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, CARMELO-GUERREIRO, M. *Anatomia vegetal*. 2.ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006.

ARANCIBIA, S.A, et al. Toll-like Receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res.* 40: 97-112, 2007.

ARYA, S. e KUMAR, V.L. Anti-inflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. *Mediators of Inflammation*, 4: 228–232, 2005.

BOEKHOLDT, S.M., et al. Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events. *Circulation*.107: 2416 2421, 2003.

BOLLER, T. Roles of proteolytic enzymes in interaction of plant and other organisms. In: Dalling, M.J. (Ed.), *Plant Proteolytic Enzymes*. CRC Press, Boca Raton, 67–96, 1986.

BONE, R.C.; BALK, R.A.; CERRA, F.B.; DELLINGER, R.P.; FEIN, A.M.; KNAUS, W.A.; SIBBALD, W.J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*.101:1644–1655, 1992.

BOWIE, A.G. 2007. Translational mini-review series on Toll-like receptors: recent advances in understanding the role of Toll-like receptors in anti-viral immunity. *Clin Exp Immunol.* 147: 217-26, 2007.

BURRELL R. Human responses to bacterial endotoxin. *Circ Shock*. 43:137–153, 1994.

BUSHMAN B. S., et al. Identification and comparison of natural rubber from two *Lactuca* species. *Phytochemistry*. 67: 2590–2596, 2006

CARMODY, R.J.; CHEN, Y.H. Nuclear Factor-kB: Activation and regulation during Toll-like receptor signaling. *Cellular & Molecular Immunology*. 4, 31-41, 2007.

CAVALCANTE, G.S. et al. Chemical composition and in vitro activity of *Calotropis procera* (Ait.) latex on *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 226, 22-25, 2016.

CHAUDHARY, P.; RAMOS, M.; VASCONCELOS, M.; KUMAR, V. Protective effect of high molecular weight protein sub-fraction of *Calotropis procera* Latex in Monoarthritic Rats. *Pharmacognosy Magazine*, 12:147, 2016.

CHUNDATTU, J. S; AGRAWAL, V.K.; GANESH, N. Phytochemical investigation of *Calotropis procera*. *Arabian Journal of Chemistry*, 9:230-234, 2016.

CUTLER, D.F; BORTA, T; STEVENSON, D.W. Anatomia vegetal: uma abordagem aplicada. Porto Alegre: Artmed, 2011.

DOUGAN, G.; JOHN, V.; PALMER, S.; MASTROENI. Immunity to salmonellosis. *Immun Rev.* 240, 196-210, 2011.

DUBEY, V. K. e JAGANNADHAM, M.V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. *Phytochemistry*. 62: 1057-1071, 2002.

DUSSAULT A-A; POULIOT M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol Proced Online*. 8: 1-1, 2006.

DUSSOURD, D. E.; EISNER, T. Vein-cutting behavior: insect counterploy to the latex defensive of plantas. *Science*. 237: 898-901, 1987.

ERWIG, L. P. e GOW, N, A. R. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nature Reviews Microbiology*. :14,163–176, 2016.

FARRELL, B. D.; DUSSOURD, D. E.; MITTER, C. Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? *American Naturalist*. 138: 8881-900, 1991.

FEASEY, N.N.; DOUGAN, G.; KINGSLEY, R.A.; HEYDERMAN, R.S.; GORDON M.A. Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *The Lancet*. 379: 2489–99, 2012.

FERRAZ, E.G.; SILVEIRA, B.B.B.; SARMENTO, V.A.; SANTOS, J.N. Toll-Like Receptors: regulation of the immune responses. *RGO - Rev Gaucha Odontol*. 59, 483-490, 2011.

FLOHÉ, S.B.; AGRAWAL, H.; SCHMITZ, D.; GERTZ, M.; FLOHÉ, S.; SCHADE, F.U. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. *J Leukoc Biol*. 79, 473-481, 2006

FORSYTHE, P.; INMAN, M.D.; BIENENSTOCK, J. Oral treatment with live *Lactobacillus reuteri* inhibits the allergic airway response in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 561–569, 2007.

FREITAS, C.D.; OLIVEIRA, J.S.; MIRANDA, M.R.; MACEDO, N.M.; SALES, M.P.; VILLAS BOAS, L.A.; RAMOS, M.V. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45, 781-789, 2007.

FRIEDMAN, G.; SILVA, E.; VINCENT, J.L. “Has the mortality of septic shock changed with time?” *Critical Care Medicine*. 26:2078–2086, 1998.

GALLAY, P; HEUMANN, D.; LE ROY, D, BARRAS, C; GLAUSER, M.P. Lipopolysaccharide-binding protein as a major plasma protein responsible for endotoxemic shock. *Proc natl acad sci U S A*, 90:9935–9938, 1993.

GALLEGOS-OLEA, R. S.; OLIVEIRA, A. V.; SILVEIRA, L.M.S.; SILVEIRA, E.R. Organic carbonate from *Calotropis procera* leaves. *Fitoterapia*. 73: 263-265, 2002.

GAZZINELLI, R.T.; DENKERS, E.Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 895-906, 2006.

GORDON, S. Pattern recognition receptor: doubling up for the innate immune response. *Cell.* 111: 927-930, 2002.

GOYAL, M.; SASMAL, D.; NAGORI, B.P. GCMS analysis and antimicrobial action of latex of *Euphorbia caducifolia*. *J Intercult Ethnopharmacol*, 1: 119-123, 2012.

GRAHAM, S.M. Nontyphoidal salmonellosis in Africa. *Curr Opin Infect Dis*, 23: 409–414, 2010.

HAGEL, J.M.; YEUNG, E.C.; FACCHINI, P.J. Got milk? The secret life of laticifers. *Trends in Plant Science*, 13: 631-639, 2008.

HASSAN, L.M.; GALAL, T. M.; EMAD, A.F; MAHA, M.EL-M. The biology of *Calotropis procera* (Aiton) W.T. *TREES* 29:311–320, 2015.

HEINICKE, R.M.; GORTNER, W.A. Stem Bromelain: A New Protease Preparation from Pineapple Plants. *Economic Botany*, 11:225-234, 1957,

HERSH, D., et al. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 2396–2401, 1999.

HERSH, D.; MONACK, D.M. et al. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Immunology*. 128:472-483, 2009.

HOFER, E. et al. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. *Pesq. vet. bras.* 7: 55-62, 1997.

HOFFMANN, K. F.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol*, 164: 6406-6416, 2000.

HOSTETTMANN, K. E TERREAUX, C. Search for new lead compounds from higher plants. *Chimia*, 54: 652-657, 2000.

HUNTER, J. R. Reconsidering the functions of latex. *Trees*. 9, pp 1-5, 1994.

JAY, M.J. Gastroenterites de origem alimentar causadas por *Salmonella* e *Shigela*. *Microbiologia de Alimentos*. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 543-57, 2005.

K, LIZUKA; T, AISHIMA. Tenderization of beef with pineapple juice monitored by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometric analysis. *J Food Sci*, 64:973–977, 1999.



KALUPAHANA, R. S., et al. Activation of murine dendritic cells and macrophages induced by *Salmonella entérica* serovar Typhimurium. *Immunology*. 115: 462-472, 2005.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*. 13, 816 825, 2006.

KAWASAKI, K.; TERAMOTO, M.; TATSUI, R.; AMAMOTO, S. Lipid A 3-O deacylation by *Salmonella* outer membrane enzyme LpxR modulates the ability of lipid A to stimulate Toll-like receptor 4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 428:343–347, 2012.

KAZEEM, M.I.; MAYAKI, A.M.; OGUNGDE, B.F.; OJEKALE, A.B. In-vitro Studies on *Calotropis procera* Leaf Extracts as Inhibitors of Key Enzymes Linked to Diabetes Mellitus. *IJPR*, 15:37:44, 2016.

KEKWICK, R.G. O. Latex and laticifers. *Encyclopedia of life Science*, Nature Publishing Group, 1-6, 2001.

KEMBHAVI, A.A. The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assay. *Arch. Biochem. Biophys.*, 303: 208–213, 1993.

KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry*. 72: 1510-1530, 2011.

KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y.; HATTORI, M.; KOHNO, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in látex. *Plant J.*, 37:370-8, 2004.

KOTTWITZ, L. B. M. et al. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. *Health Sciences*. 32: 9-15, 2010.

KRIEG, A.M. Development of TLR-9 agonists for cancer therapy. *J Clin Invest*. 117: 1184-1194, 2007.

LEWINSOHN, T.M. The geographical distribution of plant latex. *Chemoecology*. 2: 64–68, 1991.

LIBBY, S.J.; BREHM, M.A.; GREINER, D.L., et al. Humanized nonobese diabetic-scid IL2rgammanull mice are susceptible to lethal *Salmonella* Typhi infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107:15589–15594, 2010.

LIMA-FILHO, J. V. PATRIOTA, J. M., SILVA, A.F.B., FILHO, N. T., OLIVEIRA, R. S. B., ALENCAR, N.M.N., RAMOS, M.V. Proteins from látex of *Calotropis procera*

prevent septic shock due to lethal infection y *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium. Journal of Ethnofarmacology, 129: 327-334, 2010.

LIU,,Y.; DAMMANN, C.; BHATTACHARYYA, E.M.K. The GmMMP2 matrix metalloproteinase gene is activated in response to pathogenic infections in soybean. Plant Physiol. 127: 1788-1797, 2001.

LU, Y.C.; YEH, W.C.; OHASHI, P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytocine. 42, 145-151, 2008.

MAJOWICZ, S.E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F.J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S.J.; JONES, T.F.;FAZIL, A.; HOEKSTRA, R.M. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. Clin Infect Dis. 50, 882-889, 2010

MARSHALL JC, VINCENT JL, GUYATT G, et al. Outcome measures for clinical research in sepsis: a report of the 2nd Cambridge Colloquium of the International Sepsis Forum. Crit Care Med, 33:1708-1716, 2005.

MARTÍNEZ, M.; CAMBRA, I.; GONZÁLEZ-MELENDI, P.; SANTAMARÍA, M.E.; DÍAZ, I. C1A Cysteine-proteases and their inhibitors in plants. Physiol Plant, 145: 85–94, 2012.

MASTROENI, P.; SHEPPARD, M. *Salmonella* infections in the mouse model: host resistance factors and *in vivo* dynamics of bacterial spread and distribution in the tissue. Microbes and Infection. 6:398-405, 2004.

MC GETTRICK, A.F.; O'NEILL, L.A.J. Localisation and trafficking of Toll like receptors: an important mode of regulation. Curr Opin Immunol. 22, 20-7, 2010.

MEGERESSA, M. *et al.* Structural elucidation of some antimicrobial constituents from the leaf latex of *Aloe trigonantha* L.C. Leach. BMC Complement Altern Med. 15, 270, 2015.

MEGRESSA, M.; BISRAT, D.; MAZUMDER, A.; ASRES, K. Structural elucidation of some antimicrobial constituents from the leaf latex of *Aloe trigonantha*. L.C. Leach. BMC Complement Altern Med, 15:270.

METCALFE, C.R. Distribution of latex in the plant kingdow. Economic Botany, 21: 115-127, 1967.

MOHAMED, N.H.; ISMAIL, M.A.; MAGEED, W.A.; SHOREIT, A.A.M. Antimicrobial activity of latex silver nanoparticles using *Calotropis procera*. Asian Pac J Trop Biomed. 4:876-883, 2014

MULLER, C.; BANG, I., VELAYUDHAN, J.; KARLINSEY, J.; PAPENFORT, K.; VOGEL, J.; FANG, F. Acid stress activation of the  $\sigma^E$  stress response in *Salmonella entérica* serovar Typhimurium. Mol Microbiol. 71:1228-1238, 2009.

MURMANN, M. C. et al. Curvas de crescimento e destruição térmica de sorovares de *Salmonella* sp. isolados de lingüiça frescal de carne suína. *Acta Scientiae Veterinariae*. 35: 309-313, 2007.

NASCIMENTO, D.C, RALPH, M.T., BATISTA, J.E., SILVA, D.M., GOMES-FILHO, M.A., ALENCAR, N.M., LEAL, N.C., RAMOS, M.V.; LIMA-FILHO, J.V. Latex protein extracts from *Calotropis procera* with immunomodulatory properties protect against experimental infections with *Listeria monocytogenes*. *Phytomedicine*.15:7, 745-53, 2016.

NASCIMENTO, T.L.; OKI, Y.; LIMA, D.M.M.; ALMEIDA-CORTEZ, J.S.; FERNANDES, G.W.; SOUZA-MOTTA, C.M. Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. *Fungal Ecology*. 14, 79-86, 2015.

NAVEENA, B.M.; MENDIRATTA, S.K.; ANJANEYULU, A.S.R. Tenderization de carne de búfalo usando proteases de plantas de *Cucumis trigounus Roxb* (Kachri) e *Zingiber officinale* roscoe. *Meat Sci*, 68:363-369, 2004.

NENAAH, G. Antimicrobial activity of *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae) and isolation of four flavonoid glycosides as the active constituents. *World J Microbiol Biotechnol*. 29:1255–1262, 2013.

NETO, M.C.L.; VASCONCELOS, C.F.B.; THIJAN, V.N. SILVA, J.H.C. FERREIRA, F. OLIVEIRA, A,F,M. Evaluation of antihyperglycaemic activity of *Calotropis procera* leaves extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Revista brasileira de farmacognosia*. 23: 913-919, 2013.

NG, S. C. et al. Relationship between human intestinal dendritic cells, gut microbiota, and disease activity in Crohn's disease. *Inflamm*. 17,2027–2037, 2011.

OHL, M.E., MILLER, S.I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med*, 52:259–274, 2001.

OLIVEIRA, J.S.; FREITAS,C.D.T.;MORAES,M.O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; RAMOS, M.V. In vitro cytotoxicity against diferente human câncer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. *Toxicology in vitro*, 21:1563-1573, 2007.

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*. 61: 689–98, 2012

OLSEN, S.J.; MACKINON, L.C.; GOULDING, J.S.; BEAN, N.H.; SLUTSKER, L. Surveillance for foodborne disease outbreak. *Morb. Mortal*. 49:1-51, 2000.

PADHY, B.M.; SRIVASTAVA, A.; KUMARA, V.L. *Calotropis procera* latex affords protection against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 113, 498–502, 2007.

PATIL, S.P.; PATIL, M.P.; PATIL, R.H. *In vitro* anti-hypercholesterolemic activity of *Calotropis procera* (Aiton) using human erythrocytes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 5:104-110, 2016.

PECHAN, T.; COHEN, A.; WILLIAMS, W.P.; LUTH, D.S. Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillars. *Proc.Natl.Acad.Sci*. 99:13319–23, 2002.

PEI, S. Ethnobotanical Approaches of Traditional Medicine Studies: Some Experiences From Asia. *Journal Pharmacology Biology*. 39: 74-79, 2001.

PERWEZ, A. E MOHAMMAD, A. Phytochemicalin vestigation of *Calotropis procera* roots. *Indian Journal of Chemistry*, 48:443- 446, 2009.

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

PRIOLO, S.M VALLE, M.C ARRIBERE, L LOPEZ, N CAFFINI. Isolation and characterization of cysteine protease from latex of Araujia hortorum Fruits. *J. Protein Chem.*, 19:39–49, 2000.

QUAZI, S.; MATHUR, K., ARORA, S. *Calotropis procera*: an overview of its phytochemistry and pharmacology. *Indian Journal of Drugs*. 1:63-69, 2013.

RAETZ, C.R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins, *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635–700, 2000.

RAMOS, M. V.; AGUIAR, C. A.; XAVIER, A. A. S.; LIMA, M. W.; BANDEIRA, G. P.; ETCHELLS, J. P.; NOGUEIRA, N. A. P.; ALENCAR, M. N. N. Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested upon *in vitro* enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material. *Fitoterapia*. 77:251–256, 2006.

RAMOS, M.V. *et al.* Proteins derived from latex of *C. procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 385: 455–463, 2012.

RAMOS, M.V.; OLIVEIRA, J.S.; FIGUEIREDO, J.G.; FIGUEIREDO, I, S, T.; KUMAR, V. L.; BITENCOURT, F. S.; CUNHA, F.Q.; OLIVEIRA, R, S. B.; BOMFIM, L. R. LIMA-FILHO, J.V.; ALENCAR, N. M.N. 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*. 125: 138-392, 2009.

RAMOS, M.V.; AGUIAR, V.C.; MELO, V.M.; MESQUITA, R.O.; SILVESTRE, P.P.; OLIVEIRA, J.S.; OLIVEIRA, R.S.; MACEDO, N.M.; ALENCAR, N.M. Immunological and allergenic responses induced by latex fractions of *Calotropis procera* (Ait.). *Journal of Ethnopharmacology*. 111, 115–122, 2007.

RAWDKUEN, S.; JAIMAKREU, M.; BENJAKUL, S. Physicochemical properties and tenderness of meat samples using proteolytic extract from *Calotropis procera* látex. *Food Chemistry*, 136:909–916, 2013.

RAWDKUEN, S.; PINTATHONG, P.; CHAIWUT, P.; BENJAKUL. The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two-phase systems and its hydrolytic pattern on muscle proteins. *Food and Bioprocess Processing*, 89:73-80, 2011.

RAZA, H.; JOHN, A.; SHAFARIN, J. NAC Attenuates LPS-Induced Toxicity in Aspirin-Sensitized Mouse Macrophages via Suppression of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction *Journal.pone*. 68:1005-13, 2014.

RICHTER-DAHLFORS,; A. BUCHAN, A.M.J.; FINLAY, B.B. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella* Typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J. Exp. Med.*, 186:569–58, 1997.

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 micro-organismos patogênicos. *Holos*, 4, 2009

RODRIGUE, D.C.; TAUXE, R.V.; ROWE, B. International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic *Epidemiol. Infect.* 105, 21-27, 1990.

ROY, S.; SEHGAL, B.M.; PADHY, KUMAR, V.L. Antioxidant and protective effect of latex of *Calotropis procera* against alloxan-induced diabetes in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 102, 470–473, 2005.

SALAS, C. E. *et al.* Plant cysteine proteinases: Evaluation of the pharmacological activity. *Phytochemistry*. 69: 2263-2269, 2008.

SAYED, A. E, H.; MOHAMED, N,H.; ISMAIL, M.A.; ABDEL-MAGEED, W.M.; SHOREIT, A.A.M. Antioxidant and antiapoptotic activities of *Calotropis procera* latex on Catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to toxic 4-nonylphenol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128:189-194, 2016.

SCALLAN, E; HOEKSTRA, R.M.; ÂNGULO, F.J.; Tauxe, R.V.; Widdowson, M.A.; ROY, S.L.; *et al.* Foodborne illness acquired in the United States- major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17: 7-15, 2011.

SCHWAN, W.R., HUANG, X.Z., HU, L., KOPECKO, D.J. Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* serovars within human and murine macrophages. *Microbiology*, 96:2396-2401, 1991.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2000-2013. Boletim Eletrônico Epidemiológico ano 2013. 2013. p. 9-13. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/>. Acesso em 13 nov. 2015.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde. Doenças transmitidas por alimentos. Disponível em <http://portalquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta----o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>. Acesso em 22 fev. 2017.

SEIBER, J. N.; NELSON, C.J.; MARK LEE, S. Cardenolides in the latex leaves of seven *Asclepias* species and *Calotropis procera*. *Phytochemistry*. 21: 2343-2348, 1982.

SETTY, S.R.; QUERESHIL, A.A.; SWAMY, V.; PATIL, T.; PRAKASH, T.; PRABHU, K.; GOUDA, A.V. Hepatoprotective activity of *Calotropis procera* flowers against paracetamol-induced hepatic injury in rats. *Fitoterapia*. 78, 451-4, 2007.

SGARBIERI, V.C.; GUPTE, S. M.; KRAMER, D.E. AND WHITAKER, J.R. Ficus enzymes: Separation of proteolytic enzymes of *Ficus glabrata* and *Ficus carica*. *J. Chem.*, 239: 2170-2177, 1964.

SHARMA, R.; THAKUR, G.S, SANODIYA, B.S.; SAVITA, A.; PANDEY, M, SHARMA, A.; BISEN, P.S. Therapeutic potential of *Calotropis procera*: a giant milkweed. *J Pharm Bio Sci*, 4:42-57, 2012.

SHINOHARA, N. K. S., *et al.* *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *SciELO*. 13: 1675-1683, 2008.

SHUM, D. et al. A high density assay format for the detection of novel cytotoxic agents in large chemical libraries. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 6: 931-945, 2008.

SILVA E. Sepsis, a problem with the size of Brazil. *RBTI*. 18: 2006.

SOJKA, W. J.; WRAY, C.; SHREEVE, J.; BENSON, A.J. Incidence of *Salmonella* infection in animals in England and Wales 1968--1974. *J Hyg*. 78: 43-56, 1977.

TAITT, C. R.; SHUBIN, Y. S.; ANGEL, R.; LIGLER, F. S. Detection of *Salmonella enterica* serovar typhimurium by using a rapid, array-based immunosensor. *Appl Environ Microbiol*. 70:152-158, 2004.

TALBOT, S., et al. Toll-like receptor 4 signalling through MyD88 is essential to control *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection, but not for the initiation of bacterial clearance. *Immunology*. 128:472-483, 2009

TROTTA, T.; PORRO, C.; CALVELLO, R.; PANARO, M.A. Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain. *Journal of Neuroimmunology*, 268: 1-12, 2014.

TUIN, A.; VLAG, A.H.V.D.; Voenen-Weemaes A.M.M.A.V.; Meijer, D.K.F.; Poelstra K. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 290, 377-385, 2006.

URBONAVICIUTE, V.; STARKE, C.; GRAEF, D.; MROZ, M.; KIRSCHNING, C; SCHETT, G.; E VOLL, R. Involvement of toll-like receptor 2 in pristane-induced lupus. *Ann Rheum Dis*, 70: A37-A38, 2011.

VARELLA, P. e FORTE, W.C.N. Citokines: a review. *Rev. bras. alerg.imunopatol*. 24:146-154, 2001.

WAGNER, R.; AIGNER, H.; FUNK, C. FtsH proteases located in the plant chloroplast. *Physiol Plant*. 145: 203–214, 2012.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). The world medicines situation: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva, 2011.

WILSON, R.P.; RAFFATELLU. M.; CHESSA, D.; WINTER, S.E.; TÜKEL, C.; BÄUMLER, A.J. The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. *Cell Microbiol*. 10, 876–890, 2008.

WORLEY, M. J.; NIEMAN, G. S.; GEDDES K.; HEFFRON, F. *Salmonella* Typhimurium disseminates within its host by manipulating the motility of infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103: 17915-17920, 2006.

ZHANG, S., et al. *Salmonella* Serotype Determination Utilizing High-Throughput Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol*. 53: 1685-1692, 2015.

ZHAO, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, Q.; WANG, F.; ZHANG, D. Toll-like receptors and prostate cancer. *Front. Immunol*. 5:352, 2014.

## ANEXO I



Universidade Federal Rural de Pernambuco

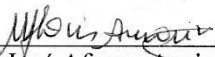
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,  
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

**Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino**

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

|  |  |
|--|--|
| Número da licença                            | 055/2016   |
| Número do processo                           | 23082.007938/2016  |
| Data de emissão da licença                   | 06 de Junho de 2016  |
| Título do Projeto                            | Caracterização da expressão gênica de receptores do tipo TLR-4 em macrófagos tratados com proteases cisteínicas de <i>Calotropis procera</i> . |
| Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)      | Pesquisa   |
| Responsável pela execução do projeto         | José Vitor Moreira Lima Filho  |
| Colaboradores                                | Lethicia Souza Tavares; Maria Taciana Ralph; Jacqueline Ellen Camelo Batista; Fabrício Bezerra Sá.   |
| Tipo de animal e quantidade total autorizada | Camundongo heterogênico; total 20 animais (fêmeas).  |

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim  
(Coordenadora da CEUA-UFRPE)



Prof.<sup>a</sup> Dra. Marleyne Amorim  
Coordenadora CEUA

