



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

INGRYDT DE ALCÂNTARA ALMEIDA

**Potencial imunomodulatório da 1,3,7 trimetilxantina em modelos de infecção
experimental por *Listeria monocytogenes***

RECIFE - PE

2021



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

Potencial imunomodulatório da 1,3,7 trimetilxantina em modelos de infecção experimental por *Listeria monocytogenes*

INGRYDT DE ALCÂNTARA ALMEIDA

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

Orientador: José Vitor Moreira Lima Filho

RECIFE - PE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A447p Almeida, Ingridt de Alcântara

Potencial imunomodulatório da 1,3,7 trimetilxantina em modelos de infecção por *Listeria monocytogenes* / Ingridt de Alcântara Almeida. - 2021.

50 f. : il.

Orientador: Jose Vitor Moreira Lima Filho.

Inclui referências e anexo(s).

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2021.

1. Inflamação. 2. Metilxantinas. 3. Listeriose. 4. Citocinas. I. Filho, Jose Vitor Moreira Lima, orient. II.

Título

CDD 636.089

INGRYDT DE ALCÂNTARA ALMEIDA

Potencial imunomodulatório da 1,3,7 trimetilxantina em modelos de infecção experimental por *Listeria monocytogenes*

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

Área de concentração: Biotecnologia na linha de Produtos bioativos.

Data de aprovação: 31 de maio de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho (Orientador)
Departamento de Biologia – UFRPE

Prof. Dr. Cláudio Augusto Gomes da Câmara (Membro titular)
Departamento de Química – UFRPE

Prof.^a Dr.^a. Anna Carolina Soares Almeida (Membro titular)
Departamento de Biologia – UFRPE

Prof.^a Dr.^a. Vânia Lúcia da Silva (Membro titular)
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF

Prof.^a Dr.^a. Jaqueline Bianque de Oliveira (Suplente)
Departamento de Biologia - UFRPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho pelo apoio nos momentos difíceis, compreensão e motivação nesta caminhada desde a graduação;

Aos membros da banca pelo ensinamento e correções, contribuindo para melhora deste trabalho e na minha evolução como pesquisadora; aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA/UFRPE) pela excelência no ensino de seus discente;

À equipe do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMIM): Betty Dorvigny, minha companheira de bancada, sempre me ajudando de todas as formas nesse ano pandêmico. Lethicia Tavares, Renata Vaz e Lucas Nunes que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, dentro e fora do laboratório. A essa equipe, meus amigos, que tornam o LAMIM um ambiente cheio de afeto e união;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo financeiro;

Às técnicas do Laboratório de Bacterioses dos Animais Domésticos da UFRPE, Renata e Gabriela, pelo auxílio e atenção; e ao Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA (GENOMA/UFRPE), em especial a Prof.^a Dr^a Anna Carolina Soares Almeida pela disponibilidade e confiança;

Aos meus pais, que me apoiam desde sempre, me aconselhando e direcionando sempre ao melhor caminho. Vocês são parte desse mérito!

Obrigada a cada um!

RESUMO

Doenças bacterianas são uma das principais causas de mortalidade no mundo e há uma grande preocupação nos serviços de saúde quando se trata de cepas resistentes aos antibióticos, necessitando que a ciência sempre investigue novas alternativas de tratamento. Estudos com a cafeína (1,3,7 trimetilxantina) mostram sua influência em processos fisiológicos, incluindo a modulação do sistema imune, apresentando um potencial anti-inflamatório. Neste estudo, a hipótese de que a cafeína seria capaz de influenciar na resposta inflamatória derivada de processos infecciosos foi avaliada utilizando-se como modelo de infecção bacteriana uma cepa virulenta de *Listeria monocytogenes*. Esta espécie é causadora da listeriose, uma doença transmitida através de alimentos contaminados que acomete seres humanos e animais. Foram realizados testes para determinar se a cafeína teria efeito inibitório sobre o crescimento de *L. monocytogenes in vitro*. Culturas de macrófagos peritoneais (pMΦ) obtidas de camundongos Swiss foram submetidas à infecção com a bactéria e tratamento com cafeína (0,05; 0,5 e 5 µg/mL), utilizando-se dois esquemas: a) tratamento com cafeína seguido de infecção; b) infecção seguida de tratamento com cafeína. A quantificação bacteriana intracelular e viabilidade dos pMΦ foi medida ao fim dos experimentos. Posteriormente, ensaios *in vivo* foram realizados para determinar o potencial anti-inflamatório da cafeína. Neste caso, os animais do grupo experimental foram infectados, via intraperitoneal, com *L. monocytogenes* (0,2 mL; 1×10^7 células/mL) e, após 30 minutos, foram tratados com a cafeína, via endovenosa, nas concentrações de 0,05; 0,5 ou 5 mg/Kg. Como controles, foram utilizados animais infectados e administrados com salina fosfatada (PBS) ou com o anti-inflamatório dexametasona (DEXA). Após 6 horas os animais foram sacrificados, a quantidade de leucócitos no fluido peritoneal e sangue determinada, sendo a bactéria quantificada em diferentes tecidos e órgãos. Um fragmento do baço foi dissecado para análise da expressão gênica das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e da enzima Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS). Os resultados mostraram que a cafeína não apresenta ação antimicrobiana direta contra *L. monocytogenes*, mas foi capaz de aumentar a viabilidade dos macrófagos infectados, apesar de não haver maior eliminação da bactéria no interior dos pMΦ. Nos testes *in vivo*, a administração de cafeína produziu ação anti-inflamatória, reduzindo de forma significativa o recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal e a quantidade de leucócitos circulantes no sangue. Quando comparados ao grupo controle, a expressão gênica das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-6 foi diminuída e a da citocina anti-inflamatória IL-10 foi aumentada. A expressão da enzima iNOS também foi diminuída nos grupos tratados com cafeína, quando comparados ao grupo PBS infectado. Os dados aqui apresentados apontam para o potencial da utilização de cafeína como anti-inflamatório na prevenção de processos inflamatórios graves derivados de infecções bacterianas.

ABSTRACT

Bacterial diseases are one of the main causes of mortality in the world and there is a great concern in health services when it comes to antibiotic resistant strains, requiring science to always investigate new treatment alternatives. Studies with caffeine (1,3,7 trimethylxanthine) show its influence on physiological processes, including modulation of the immune system, presenting an anti-inflammatory potential. In this study, the hypothesis that caffeine would be able to influence the inflammatory response derived from infectious processes was evaluated using a virulent strain of *Listeria monocytogenes* as a bacterial infection model. This species causes listeriosis, a disease transmitted through contaminated food that affects humans and animals. Tests were carried out to determine whether caffeine would have an inhibitory effect on the growth of *L. monocytogenes* in vitro. Peritoneal macrophage cultures (pMΦ) obtained from Swiss mice were subjected to infection with the bacteria and treatment with caffeine (0.05, 0.5 and 5 µg/mL), using two schemes: a) treatment with caffeine followed by infection; b) infection followed by caffeine treatment. Intracellular bacterial quantification and pMΦ viability were measured at the end of the experiments. Subsequently, in vivo tests were performed to determine the anti-inflammatory potential of caffeine. In this case, the animals in the experimental group were intraperitoneally infected with *L. monocytogenes* (0.2 mL; 1 x 10⁷ cells/mL) and, after 30 minutes, they were treated with caffeine, intravenously, at concentrations of 0.05; 0.5 or 5 mg/kg. As controls, infected animals and administered with phosphate saline (PBS) or with the anti-inflammatory dexamethasone (DEXA) were used. After 6 hours the animals were sacrificed, the amount of leukocytes in the peritoneal fluid and blood determined, and the bacteria were quantified in different tissues and organs. A fragment of the spleen was dissected for analysis of gene expression of the cytokines TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 and the enzyme Nitric Oxide Synthase inducible (iNOS). The results showed that caffeine does not have a direct antimicrobial action against *L. monocytogenes*, but it was able to increase the viability of infected macrophages, although there is no greater elimination of the bacteria inside the pMΦ. In in vivo tests, the administration of caffeine produced an anti-inflammatory action, significantly reducing the recruitment of leukocytes to the peritoneal cavity and the amount of circulating leukocytes in the blood. When compared to the control group, the gene expression of the inflammatory cytokines IL-1β and IL-6 was decreased and that of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was increased. The expression of the iNOS enzyme was also decreased in the groups treated with caffeine, when compared to the PBS infected group. The data presented here point to the potential of using caffeine as an anti-inflammatory in preventing severe inflammatory processes derived from bacterial infections.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Produção de café e consumo de cafeína no Brasil e no mundo	12
2.2. Metilxantinas: principais características	13
2.3. Cafeína	14
2.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	17
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Animais	21
4.2. Preparação da cafeína.....	21
4.3. Micro-organismo	22
4.4. Preparo do inóculo bacteriano	22
4.5. Teste antimicrobiano direto	22
4.6. Obtenção e cultivo de macrófagos peritoneais	22
4.7. Efeito da cafeína em macrófagos peritoneais infectados com <i>L. monocytogenes</i>	23
4.8. Efeito da cafeína em camundongos Swiss infectados com <i>L. monocytogenes</i>	24
4.8.1. Coleta de amostras	25
4.8.2. Contagem total e diferencial de leucócitos.....	25
4.8.3. Quantificação bacteriana	25
4.8.4. Análise de expressão gênica de citocinas	26
4.9. Análise estatística	27
5. RESULTADOS	28
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÃO	41
8. REFERÊNCIAS	42
ANEXOS	48
ANEXO A – Parecer de aprovação da CEUA - UFRPE	49
ANEXO B – Parecer de aprovação da CEUA - UFRPE	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ramos contendo folhas, flores e frutos em diferentes estágios maturacionais de *Coffea arabica*..... 12
- Figura 2:** Estruturas químicas dos alcalóides purínicos derivados de xantina..... 13
- Figura 3:** Estrutura química da adenosina..... 15
- Figura 4:** Efeito da cafeína sobre o crescimento microbiano de *Listeria monocytogenes* cepa 619. 28
- Figura 5:** Viabilidade de pMØ de camundongos Swiss tratados com cafeína seguido infecção por *L. monocytogenes* (Figura 5A) e infectados por *L. monocytogenes* seguido tratamento com cafeína (Figura 5B). 29
- Figura 6:** Efeito da cafeína na eliminação intracelular de *L. monocytogenes* em culturas de pMØ de camundongos Swiss. Tratamento com cafeína seguido de infecção por *Listeria* (Figura 6A) e infecção por *Listeria* seguido de tratamento com cafeína (Figura 6B)..... 30
- Figura 7:** Ação da cafeína na migração de leucócitos no fluído peritoneal (Figura 7A) e no sangue (Figura 7B) de camundongos Swiss infectados experimentalmente com *Listeria monocytogenes*. 31
- Figura 8:** Quantificação de UFC/poço de *Listeria monocytogenes* após tratamento com cafeína no fluído peritoneal (Figura 8A), sangue (Figura 8B), baço (Figura 8C) e fígado (Figura 8D) de camundongos Swiss. 33
- Figura 9:** Expressão de citocinas e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no baço de camundongos Swiss tratados com cafeína e infectados experimentalmente com *Listeria monocytogenes*. 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Primers utilizados para realização da amplificação de cDNA por meio de RT qPCR..... 26

Tabela 2: Contagem total e diferencial de leucócitos no fluido peritoneal de camundongos Swiss tratados com cafeína após infecção com *L. monocytogenes*. 31

Tabela 3: Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue de camundongos Swiss tratados com cafeína após infecção com *L. monocytogenes*. 32

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIC - Associação Brasileira da Indústria do Café

AMP - Adenosina Monofosfato

ARs - Receptores de adenosina

cDNA - Ácido Desoxirribonucleico complementar

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

Ct - Cycle threshold

DEXA - Dexametasona

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

IL-10 - Interleucina-10

IL-1 β - Interleucina-1 beta

IL-6 - Interleucina 6

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

LIKA - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

LLO - Listeriolisina O

LPS - Lipopolissacarídeo

MH - Mueller Hinton

MST - Movimento dos Trabalhadores Rurais Sem Terra

PBS - Phosphate buffered saline

PPIA - Peptidil-prolil isomerase A

RNA - Ácido ribonucleico

ROS - Reactive oxygen species

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

RT-qPCR – Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction

SAH - Adenosil homocisteína

SNC - Sistema nervoso central

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

UFJF - Universidade Federal de Juiz de Fora

UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco

1. INTRODUÇÃO

As DTA (Doenças Transmitidas por Alimentos) são causadas pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados por bactérias e suas toxinas, vírus ou parasitas. A OMS (Organização Mundial de Saúde) considera as DTA um problema de saúde pública, causando a morte de 420 mil crianças menores de 5 anos. Nos Estados Unidos, o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) estima que 128 mil pessoas são hospitalizadas e 3.000 morrem de doenças transmitidas por alimentos. Já no Brasil, o Sinan (Sistema de Informações de Agravos de Notificações) registra 700 surtos por ano, com 13 mil doentes e 10 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

As DTA causadas por bactérias dos gêneros *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp., e *Listeria* sp. apresentam grande risco a saúde em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (CHLEBICZ, 2018). Dentre as espécies patogênicas de *Listeria*, destaca-se a *Listeria monocytogenes*, uma bactéria Gram-positiva causadora da listeriose em humanos e animais. A principal porta de entrada da *L. monocytogenes* é pela ingestão de alimentos contaminados, sendo esse patógeno intracelular utilizado a bastante tempo como modelo de estudo da imunidade celular (MCLAUHLIN et al., 2004).

A 1,3,7-trimetilxantina – cafeína – é um alcalóide imperfeito, pertencente à família das metilxantinas, presente no café, chá e chocolate e conhecida por suas propriedades psicoestimulantes. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), o consumo mundial de café em 2019 foi de 168 milhões de sacas de 60 Kg, dos quais 70% são consumidos em países importadores, em particular, na Europa (EMBRAPA, 2021). Já o consumo de chá no mundo alcançou 289 bilhões de litros em 2020 (STATISTA, 2021), enquanto o chocolate possui um consumo per capita anual entre 4,2–9,0 Kg entre os dez maiores países consumidores (FORBES, 2021).

As propriedades imunomoduladoras de metilxantinas, incluindo a Cafeína, têm sido investigadas pois atuam como análogos dos receptores de adenosina (ARs) (MULLER et al., 2011). As adenosinas são nucleosídeos sintetizados a partir da degradação de aminoácidos como metionina, treonina, valina e isoleucina, e também AMP, sendo que adenosinas extracelulares são correlacionadas a funções

citoprotetoras no organismo (HASKÓ e CRONSTEIN, 2004; JACOBSON e GAO, 2006; HASKÓ et al., 2008). Há evidências que muitos dos efeitos da Cafeína são mediados por sua interação como antagonistas de ARs, a partir de uma ligação não seletiva a estes receptores.

A ativação de receptores de adenosina em células do sistema imunológico leva à supressão de citocinas pró-inflamatórias, produzindo aumento na resposta anti-inflamatória (HORRIGAN et al., 2006). Considerando o grande consumo mundial de café, chás e chocolates e trabalhos apontando a ação anti-inflamatória da cafeína, no presente estudo foi investigada a hipótese de que a cafeína pode afetar o processo inflamatório durante infecções causadas por patógenos bacterianos. Assim, uma cepa virulenta isolada de um caso clínico humano de listeriose, *Listeria monocytogenes* 619, foi utilizada como modelo de infecção experimental em culturas celulares de macrófagos e *in vivo*, com camundongos Swiss, de forma a compreender se a cafeína poderia influenciar na resposta imune inflamatória em estágios iniciais da infecção. Os resultados obtidos são discutidos à luz da literatura vigente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção de café e consumo de cafeína no Brasil e no mundo

O café, principal fonte de cafeína consumida pela população mundial, é uma bebida extraída do grão do cafeeiro, planta da família Rubiaceae originária da Etiópia (DURÁN et al., 2017). A primeira descrição do gênero *Coffea* foi feita por Lineu no século XVIII, sendo a *Coffea arabica* (Figura 1) e *Coffea canephora* as principais espécies com importância econômica. Botanicamente, as espécies são classificadas como arbustos lenhosos de pequeno a grande porte, com folhas verde-escuro, tons de amarelo ou cor de bronze (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, 2018).

Figura 1: Ramos contendo folhas, flores e frutos em diferentes estágios maturacionais de *Coffea arabica*



Fonte: <https://seedcorner.com/coffee-arabian-coffea-arabica-nana-seeds/>. Acesso em 14 mar 2021.

O café é um dos produtos primários mais comercializados no mundo, ficando atrás apenas do petróleo (SINDICAFE-MG, 2004). De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o Brasil possui a maior produção e exportação de café mundial, movimentando mais de US\$ 5 bilhões de dólares no ano de 2017. O

plântio ocupa 2 milhões de hectares, estando a produção da espécie arábica concentrada nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Bahia. Fora do Brasil, a produção se destaca na Colômbia e Vietnã (ABIC, 2020).

Em relação ao consumo do café, a população dos Estados Unidos ocupa o primeiro lugar, consumindo anualmente 23 milhões de sacas de 60 kg, o que corresponde a 14% do que é consumido no mundo. Já no Brasil, o consumo se manteve em 21 milhões de sacas, ficando com 13% do consumo mundial e garantindo o segundo lugar no ranking de consumo da bebida (EMBRAPA, 2019).

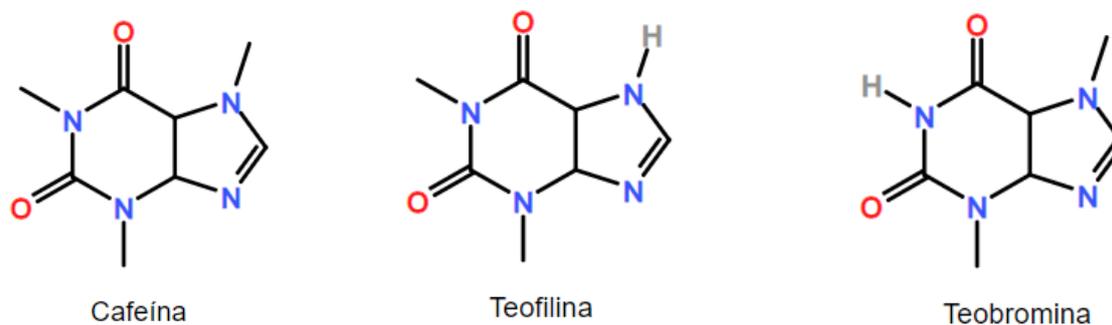
Além do café, a cafeína é encontrada naturalmente em chás e chocolate. A Índia e China são os maiores produtores de *Camellia sinensis*, planta utilizada na preparação do chá verde e chá preto. No Brasil, a produção de *C. sinensis* se concentra em São Paulo (NISHIYAMA et al., 2010). A produção de 70% do cacau (*Theobroma cacao*), fruto utilizado como matéria prima para produção do chocolate, se concentra na Costa do Marfim, Gana e Camarões mas a importação do cacau e exportação do chocolate é realizada por países europeus, como Alemanha, Bélgica e Holanda (GEPEA, 2021). De acordo com o Movimento dos Trabalhadores Rurais Sem Terra (MST), a produção brasileira de cacau ocorre no Norte (Pará) e Nordeste (Bahia) do país (MST, 2020).

2.2. Metilxantinas: principais características

Dentre os vários compostos presentes no grão cru do café, como ácidos, minerais e carboidratos, destacamos as metilxantinas, conhecidas principalmente pelo seu efeito estimulante no SNC (DURÁN et al., 2017).

As metilxantinas são compostos orgânicos presentes em mais de 90 espécies do reino vegetal. Quimicamente, são derivados de metilados de xantina, dando origem às três principais formas encontradas naturalmente (Figura 2): a cafeína (1,3,7 trimetilxantina), a teofilina (1,3 trimetilxantina) e a teobromina (3,7 dimetilxantina) (MONTEIRO et al., 2018). Essas metilxantinas estão presentes em uma gama de produtos alimentícios em todo mundo, dentre eles o café, chás e chocolate, sendo também utilizadas na farmacologia médica humana e veterinária (JANITSCHKE et al., 2020).

Figura 2: Estruturas químicas dos alcalóides purínicos derivados de xantina.



O principal mecanismo de atuação das metilxantinas é a ação no sistema nervoso central (SNC) e podem atuar na regulação do nível de cálcio dentro das células, na inibição da fosfodiesterase e antagonismo dos receptores de adenosina.

2.3. Cafeína

Dentre as metilxantinas, a cafeína destaca-se como psicoestimulante natural consumido por mais de 80% da população mundial, seja na forma de café, chás ou refrigerantes (FRANCO et al., 2013). Com fórmula molecular $C_8H_{10}N_4O_2$, a cafeína, também referida na literatura como trimetilxantina, guaranina ou metilteobromina, quando purificada, se apresenta em forma de pó branco (ARAÚJO et al., 2017).

Em busca na literatura recente, pode-se encontrar a cafeína sendo aplicada em diversos modelos experimentais. Como no trabalho de Lafuente (2020) que utilizou a cafeína como ingrediente ativo para testar a qualidade de um sistema de entrega de medicamentos tópicos para uso farmacêutico e cosméticos, conhecidos como emulgels. Em estudos com lipossomas, que são usados como transportadores de fármacos, Abd (2020) empregou a cafeína para avaliar o potencial de penetração da mesma em camadas mais profundas da pele. Na aplicação em dermocosméticos, a cafeína foi testada *in vitro* e *in vivo* como adjuvante em formulações de filtro solar

tópico por Rosado (2019). Como resultado, as formulações contendo cafeína aumentaram em 25% a proteção anti-UVB (ultravioleta B) no teste *in vivo*. A cafeína também aparece em modelos de inflamação por lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina presente na estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas. Neste modelo, Abbasi (2018) investigou a vitalidade de neutrófilos co-cultivados, após estímulos com LPS e exposição dos neutrófilos a concentrações de cafeína (0,1, 0,5 e 1 mM). Os resultados mostraram o aumento da vitalidade dos neutrófilos independente da dose de cafeína utilizada. Hwang (2016) avaliaram os efeitos anti-inflamatórios da cafeína em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* em inflamação induzida por LPS. O estudo realizado com peixe-zebra concluiu que a cafeína reduziu a expressão da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS) e da Interleucina-6. A cafeína foi utilizada por Deliktaş (2017) para amenizar a citotoxicidade causada pela bilirrubina, que em grandes quantidades, causa neurotoxicidade em neonatos prematuros. O efeito adjuvante da cafeína também é estudado para alívio da dor. Weiser (2018) testou a combinação do analgésico ibuprofeno (400 mg) com a cafeína (100 mg), contra dor dentária moderada a grave após extração de terceiro molar. Os resultados comprovaram a eficácia da combinação no alívio da dor em relação ao tratamento utilizando apenas o ibuprofeno.

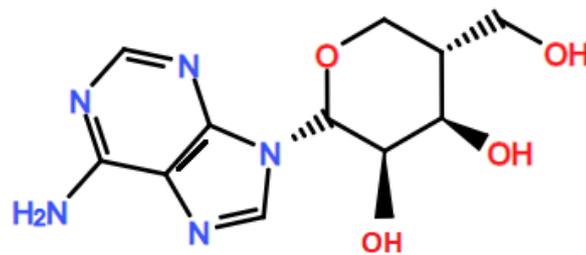
De forma geral, após ingestão de cafeína em concentração baixas a moderadas (50-300 mg), é notado uma melhora no desempenho cognitivo (aumento no estado de alerta, da capacidade de concentração) e psicomotor (diminuição da sonolência e cansaço) de quem a consome (ALVES et al., 2009). A literatura também menciona a cafeína atuando como fonte de antioxidantes, em estudos anticâncer, antibacteremias e antiinflamação (NUGRAHINI et al., 2019). Além de agir diretamente no SNC e possuir ação no metabolismo de alguns sistemas como endócrino, cardiovascular, gastrointestinal e imunológico, (SHUSHTARI et al., 2017), a cafeína atua como antagonista não seletivo dos receptores de adenosina (ARs), um neuromodulador o SNC com função de estímulo neuronal e regulação das sinapses (CRUZ et al., 2018).

A adenosina (Figura 3) é um nucleosídeo de purina que atua como regulador fisiológico de várias funções celulares e age através de quatro receptores acoplados à proteína G, presente na membrana das células, sendo estes os receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (BOREA et al., 2018). Apenas os receptores A₁ e A_{2A} possuem relação com

a cafeína. Os receptores compartilham a mesma forma estrutural, tendo o receptor A_1 entre 30-40 aminoácidos e o receptor A_{2A} 122 aminoácidos em seus domínios do terminal C (BALLESTEROS-YÁÑEZ et al., 2018). A variação nos níveis de adenosina determina a interação com os ARs. Em menores níveis, há maior interação da adenosina com o receptor A_1 . A interação com o receptor A_{2A} ocorre com maiores níveis de adenosina, ocasionando processos fisiológicos distintos.

No ambiente intracelular, a adenosina é formada a partir da hidrólise de adenosina monofosfato (AMP) e S-adenosil-homocisteína (SAH), sendo a adenosina extracelular capturada para dentro da célula por transportadores de nucleosídeos, sendo essa captação determinada por diferenças de concentração na membrana celular (BOREA et al., 2018). O efeito antagonista da cafeína no receptor A_1 provoca diurese e taquicardia, já no receptor A_{2A} estudos mostram o antagonismo como benéfico em animais com condições inflamatórias e isquêmicas (JACOBSON et al., 2020).

Figura 3: Estrutura química da adenosina.



Adenosina

No sistema imunológico, a adenosina é importante durante a resposta celular e no controle da inflamação. Nas células da imunidade inata, como os macrófagos, a ativação do ARs A_{2A} pode restringir a produção de mediadores inflamatórios como as citocinas TNF, IL-6 e a enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS). Por outro lado, esta ativação do ARs A_{2A} , pode promover atividade da citocina anti-inflamatória IL-10. Nos neutrófilos, um subtipo de leucócito presente em abundância na corrente

sanguínea e principal célula na defesa primária, a adenosina é responsável por funções bactericidas pelo aumento da fagocitose na ativação de ARs A₁ (ANTONIOLI et al., 2019).

O uso abusivo de antibióticos é um desafio para o sistema de saúde em vários países. Este uso indiscriminado está selecionando bactérias resistentes aos fármacos tradicionais, dificultando o tratamento de infecções (MACHADO et al., 2020). Esta resistência pode induzir mutações espontâneas ou recombinações, que podem ser transferidas horizontalmente entre células bacterianas da mesma espécie ou de espécies diferentes (TORRES-BARCELÓ, 2018). A combinação de omeprazol e cafeína isolados ou juntamente com gentamicina e ciprofloxacina, foi testado contra cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* por Bazzaz (2019). Ao final do experimento, notou-se que a cafeína reduziu a resistência de *S. aureus* e *E. coli* aos medicamentos utilizados.

2.4. *Listeria monocytogenes*

As bactérias do gênero *Listeria* fazem parte da família Listeriaceae, possuindo mais de 20 espécies classificadas. Dentre as diversas espécies, somente duas são consideradas altamente patogênicas: *Listeria monocytogenes*, causadora de doenças em humanos e animais, e *L. ivanovii*, acometendo principalmente ruminantes.

O primeiro registro de *L. monocytogenes* foi um isolado do fígado necrótico de um coelho em 1910 por Hülphers, sendo batizada de *Bacillus hepatis*. Ao longo dos anos, outros pesquisadores encontraram a mesma bactéria e nomes diferentes foram dados, mas somente em 1940 que o nome atual foi reconhecido (MATLE et al., 2020). *Listeria monocytogenes* é classificada como bacilo Gram-positivo, anaeróbia facultativa e não formadora de esporos (FARBER et al., 1991). Possui alta tolerância a variação de temperatura e pH, tendo crescimento ideal entre 30°C a 37°C mas podendo se desenvolver entre 4°C a 45°C e suportar faixas de pH entre 4,5 e 9,6. Sobrevive em alta concentração de sal, possuindo fatores de virulência geralmente organizados em ilhas de patogenicidade (DHAMA et al., 2015).

Listeria monocytogenes e *L. ivanovii* são causadoras da listeriose, doença de caráter zoonótico adquirida principalmente pela ingestão de alimentos contaminados

(MATLE et al., 2020). Os alimentos mais comumente contaminados incluem laticínios, peixes defumados e produtos industrializados/refrigerados prontos para ingestão malcozidos ou reaquecidos. Por suportar altas variações de temperatura e pH, *Listeria* também pode proliferar no ambiente, contaminando vegetais e a silagem, contaminando animais de produção (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

A gravidade da doença vai depender da quantidade do inóculo bacteriano ingerido e o estado imunitário do hospedeiro. A listeriose pode se manifestar de três formas: doença associada a gastroenterite, apresentando dor de cabeça, febre, náuseas, vômito, dor abdominal e diarreia aquosa; a forma sistêmica, caracterizada por febre, dor de cabeça, septicemia, meningite, encefalite, abscesso hepático, sendo fatal para o acometido; e ainda a listeriose neonatal e abortiva, causando complicações no terceiro trimestre de gravidez, como parto de feto prematuro infectado ou natimorto (BHUNIA, 2018). Em indivíduos imunocompetentes, os sintomas de gastroenterites são espontaneamente resolvidos pelo sistema imune do hospedeiro (LECUIT, 2020).

Devido à eficiência no diagnóstico e notificação, surtos de listeriose são mais relatados em países desenvolvidos, quando comparados aos países em desenvolvimento. Estima-se, nos Estados Unidos, que a prevalência de mortes por listeriose chega a 500 mortes por ano. Já entre 2009 e 2013, na União Europeia, houve confirmação de 1.645 casos resultando em 270 mortes (ABATCHA et al., 2020).

Para tratamento da listeriose são utilizados antibióticos beta-lactâmicos (penicilina), que atuam inibindo a etapa final de biossíntese da parede celular, podendo ser combinados com gentamicina. Pelo fato da *L. monocytogenes* apresentar resistência intrínseca a alguns antibióticos comumente utilizados para outras espécies de *Listeria*, o uso de cefotaxima, cefepima, fosfomicina e oxacilina não é indicado (OLAIMAT et al., 2018).

Ao penetrar o corpo do hospedeiro, *L. monocytogenes* deve resistir à acidez estomacal. Para sobreviver neste ambiente hostil e chegar ao intestino, os mecanismos de resposta de tolerância aos ácidos (ATR), arginina desiminase (ADI) e sistema glutamato descarboxilase (GAD) são utilizados pela bactéria (MATLE et al., 2020). Estudos mostram que o ambiente ácido do estômago é responsável por

eliminar grande parte da carga bacteriana ingerida e que o uso frequente de fármacos que inibam a produção de ácidos estomacais se mostra como fator de risco ao desenvolvimento da listeriose (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

No intestino, *L. monocytogenes* invade as vilosidades do epitélio intestinal e, utilizando proteínas de superfície, como a internalina, adere e penetra em células fagocitárias e não fagocitárias do hospedeiro (MATLE et al., 2020). Para escapar do fagossomo produzido pelas células do hospedeiro, *L. monocytogenes* utiliza fatores de virulência, como a listeriolisina O (LLO), uma exotoxina que ataca a membrana do fagossomo produzindo poros, impedindo a digestão da célula bacteriana (RODRÍGUEZ-AUAD et al., 2018). Quando livre no citosol, a bactéria utiliza a proteína de superfície indutora de montagem de actina (actA), fazendo uso do citoesqueleto da célula hospedeira para garantir sua mobilidade e disseminação dentro e entre as células adjacentes (RAMÍREZ et al., 2020).

A imunidade inata, composta pelas barreiras físicas, químicas e células efectoras como: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células natural Killer (NK), é a primeira resposta ativada contra patógenos, incluindo *L. monocytogenes* (CRUVINEL et al., 2010).

Em resposta ao patógeno, a secreção de IL-6 recruta as primeiras células para o local de infecção, os neutrófilos; podendo utilizar proteínas de endereçamento nas células patogênicas que se encontram no meio extracelular ou secreção de nitrogênio reativo após engolfamento para eliminação do micro-organismo (ZENEWICZ et al., 2007). Esses neutrófilos quando infectados, liberam IL-12, fazendo com que as células NK aumentem a produção de IFN- γ , ativando macrófagos e células dendríticas (RUBY et al., 2012). As células dendríticas, por sua vez, como a projeção da membrana, capturam e apresentam antígenos aos linfócitos T, estabelecendo conexão com a imunidade adaptativa (ABBAS, 2008). Os macrófagos, quando infectados e ativados, secretam citocinas estimulando células NK a produzirem IFN- γ , agindo nos macrófagos para secretar TNF- α e óxido nítrico (NO), eliminando a bactéria do meio intracelular (SERBINA et al., 2003).

Levando em consideração a ampla resistência da *L. monocytogenes* a variações ambientais, mecanismos de defesa do hospedeiro e fármacos, estudos com novas abordagens terapêuticas são necessários.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinar o potencial da 1,3,7-trimetilxantina (caféina) como agente regulador de processos inflamatórios durante infecções experimentais causadas por *L. monocytogenes*.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar se há ação antimicrobiana direta da caféina contra *L. monocytogenes in vitro*
- Determinar o efeito da caféina sobre a viabilidade celular de culturas de macrófagos peritoneais infectadas *ex vivo* por *L. monocytogenes*
- Determinar a influência da caféina na depuração bacteriana intracelular em culturas de macrófagos peritoneais infectadas *ex vivo* por *L. monocytogenes*
- Determinar a influência da caféina no recrutamento de leucócitos após infecção intraperitoneal de camundongos Swiss com *L. monocytogenes*
- Determinar a influência da caféina na depuração bacteriana no fluido peritoneal, sangue, baço e fígado de camundongos Swiss infectados por *L. monocytogenes*
- Determinar a influência da caféina na expressão gênica das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 e da enzima iNOS no baço de camundongos Swiss infectados por *L. monocytogenes*

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os ensaios envolvendo animais foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA n°8883080121/ CEUA n°223006421). A cafeína (1,3,7-Trimetilxantina) comercial foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich com composição química ($C_8H_{10}N_4O_2$; 194,19 g/mol).

4.1. Animais

Foram utilizados 28 camundongos Swiss (*Mus musculus*), fêmeas, pesando entre 30 e 40 gramas, adquiridas do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA - UFPE) da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos no biotério Jacques Robert Nicoli localizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMIM-UFRPE), em gaiolas de plástico com dimensão de (49 x 34 x 16 cm), não ultrapassando 10 animais por gaiola, com fornecimento livre de água e ração purina, iluminação em ciclos de 12 horas claro/escuro e ar refrigerado. Todos os animais experimentais foram sacrificados por superdose inalatória de isoflurano e após coleta de material, foram acondicionados em temperatura negativa para posterior recolhimento por empresa contratada pela UFRPE.

4.2. Preparação da cafeína

Para utilização nos ensaios experimentais *ex vivo* e *in vivo*, as soluções de cafeína foram preparadas em tampão fosfato-salino estéril e em meio de crescimento celular Roswell Park Memorial Institute (RPMI) respectivamente, nas concentrações de 0,05 µg/ml, 0,5 µg/ml e 5 µg/ml ou 0,05 mg/kg, 0,5 mg/kg e 5 mg/kg. As concentrações de cafeína foram escolhidas a partir de testes anteriores de citotoxicidade celular realizados por nosso grupo de pesquisa.

4.3. Micro-organismo

A cepa 619 patogênica de *L. monocytogenes* utilizada nos experimentos foi isolada de um caso clínico humano, cedida pela pesquisadora Dr^a. Nilma Cintra Leal do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife -PE. As amostras bacterianas foram mantidas congeladas a -20°C em glicerol 10% e reativadas após incubação em estufa a 37°C por 24h em caldo Mueller Hinton (M.H.) para utilização nos experimentos.

4.4. Preparo do inóculo bacteriano

L. monocytogenes foi cultivada em caldo Mueller Hinton (M.H.) por 24h e, a seguir, centrifugada por 10 minutos a 4.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células suspenso em PBS ou RPMI, sendo a quantidade de células ajustada de acordo com a densidade ótica (D.O.) após leitura em espectrofotômetro a 630 nm (D.O. 0.5 \Leftrightarrow 10⁸ células/mL). O inóculo foi ajustado após diluição seriada de acordo com o experimento.

4.5. Teste antimicrobiano direto

Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços e a cafeína, dissolvida em caldo M.H., foi testada em concentrações que variaram de 0,78 a 100 µg/mL. A bactéria foi suspensa e adicionada aos poços com inóculo ajustado para conter 5x10⁵ células/mL. Grupos contendo somente meio de cultura sem inóculo bacteriano ou *L. monocytogenes* sem cafeína, ou a bactéria e gentamicina 100 µg/mL foram utilizados como controle. As amostras foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Ao final do experimento, foi realizada leitura em espectrofotômetro com densidade óptica de 630nm.

4.6. Obtenção e cultivo de macrófagos peritoneais

Para obtenção de macrófagos peritoneais (pMΦ), camundongos Swiss (n=4) foram sacrificados e fixados pelos membros em placa de parafina na posição dorsal, o ventre foi limpo com álcool 70% e cortado de forma asséptica em formato de “U” para a exposição do peritônio, onde foi injetado na cavidade peritoneal 5 mL de RPMI.

Após massagens no abdômen, o fluido peritoneal foi coletado com pipeta estéril e uma alíquota das células foi corada com azul de Tripán, sendo posteriormente quantificadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico. A preparação celular foi ajustada para conter 1×10^6 células/mL, sendo semeadas 200 μ L/poço em placa de 96 poços incubadas em estufa *overnight* nas condições de 5% CO₂ a 37°C.

4.7. Efeito da cafeína em macrófagos peritoneais infectados com *L. monocytogenes*

Após cultivo celular *overnight* (5% CO₂ a 37°C), o sobrenadante dos poços foi descartado e em seguida, foi executado em placa de 96 poços, o desenho experimental abaixo:

Grupo A (controle) – RPMI

Grupo B (controle) – Doxorrubicina (10 μ g/mL) em RPMI

Grupo C (controle) – *Listeria monocytogenes* em RPMI

Grupo D (experimental) – *Listeria monocytogenes* em RPMI + Cafeína 0,05 μ g/mL

Grupo E (experimental) – *Listeria monocytogenes* em RPMI + Cafeína 0,5 μ g/mL

Grupo F (experimental) – *Listeria monocytogenes* em RPMI + Cafeína 5 μ g/mL

Os poços contendo apenas os pM Φ dos grupos D, E e F foram adicionados de cafeína (0,05; 0,5 e 5 μ g/ mL) dissolvida em 200 μ L de RPMI. Após 24 h, o sobrenadante foi retirado e *L. monocytogenes* suspensa em RPMI foi adicionada (200 μ L; 2×10^5 células/poço) aos grupos C, D, E e F por 4 horas. Após este tempo, o sobrenadante foi descartado e gentamicina (100 μ g/ mL) foi adicionada para eliminação de bactérias extracelulares. Em outro desenho experimental, os pM Φ dos grupos C, D, E e F foram primeiramente infectados durante 4 horas com *L. monocytogenes* (2×10^5 células/poço). Após esse tempo, gentamicina (100 μ g/ mL) foi adicionada para eliminação de bactérias extracelulares por 1 hora. Em seguida, o poço C, D, E e F recebeu gentamicina (10 μ g/ mL) para manter o meio de cultura isento de bactérias extracelulares ao longo do experimento. Os grupos D, E e F foram adicionados de cafeína (0,05; 0,5 e 5 μ g/mL) por 24 horas.

Poços sem tratamento (A) ou adicionados de Doxorubicina (agente tóxico para as células) dissolvida em RPMI (B) (10 µg/mL) ou, ainda, infectados com *L. monocytogenes* e sem tratamento (C) foram utilizados como controles. Ao fim dos experimentos, a viabilidade celular dos pMΦ foi mensurada após a adição de 40 µL de resazurina (0,15 mg/mL). A conversão de resazurina (azul) em resorufina (rosa) por células metabolicamente ativas foi avaliada após 2 horas, por meio de leitura em espectrofotômetro a 570 e 600 nm. Para quantificação de bactérias no meio intracelular, o sobrenadante dos poços foi descartado e foi adicionado 200 µL de Triton 0,5% para lise química dos pMΦ infectados. Após 20 min/10°C, o homogenato foi submetido a diluições decimais seriadas, sendo cada homogenato semeado pela técnica de “drop plate” em placas contendo Ágar Mueller Hinton (M.H.) e incubadas em estufa à 37°C por 24 horas. Após o crescimento, as UFC/poço foram quantificadas.

4.8. Efeito da cafeína em camundongos Swiss infectados com *L. monocytogenes*

Para realização dos ensaios *in vivo*, os animais foram divididos em seis grupos, com quatro animais como descrito a seguir:

Grupo I (controle): PBS

Grupo II (controle): *Listeria monocytogenes*

Grupo III (controle): *Listeria monocytogenes* + Dexametasona (0,5 mg/animal)

Grupo IV (experimental): *Listeria monocytogenes* + Cafeína 0,05 mg/Kg

Grupo V (experimental): *Listeria monocytogenes* + Cafeína 0,5 mg/Kg

Grupo VI (experimental): *Listeria monocytogenes* + Cafeína 5 mg/Kg

Para infecção dos animais dos grupos II a VI foi utilizado 200µl do inóculo de *L. monocytogenes* por via intraperitoneal (I.P.) (10^7). Após 30 minutos da administração do inóculo bacteriano, foi injetado 200µL da cafeína, via endovenosa (E.V.), em diferentes concentrações nos animais dos grupos IV a VI, como descrito acima. Os animais não infectados e não tratados do grupo I receberam 200 µL de PBS via endovenosa (E.V.). Nos animais infectados do grupo III, foi administrado 5 mg/animal de dexametasona via intraperitoneal (I.P.) Os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso à água e comida por 6 horas até o momento do sacrifício.

4.8.1. Coleta de amostras

Após serem sacrificados, os animais foram fixados pelos membros em placa de parafina na posição dorsal. O ventre foi limpo com álcool 70% e cortado de forma asséptica em formato de “U” para a exposição do peritônio. Foi injetado na cavidade peritoneal 5 ml de PBS estéril. Foram realizadas massagens no abdômen por cerca de 20 segundos. Uma alíquota de fluido peritoneal foi retirada com auxílio de pipeta estéril para contagem total/diferencial de leucócitos e quantificação de bactérias intracelulares. Também foram retirados e pesados o baço e fígado dos animais para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Uma seção do baço também foi utilizada para extração de RNA total.

4.8.2. Contagem total e diferencial de leucócitos

Para contagem total de leucócitos, 20 µL de fluido peritoneal e sangue (coletado por punção cardíaca) foram diluídos e homogeneizados em 380µL de corante Turk. A alíquota de cada amostra foi submetida à câmara de Neubauer para contagem de células em microscópio óptico. Para contagem diferencial de leucócitos, foi utilizado 20 µL de fluido peritoneal e sangue para realização esfregaço, sendo coradas com panótico rápido. A seguir, os neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos foram contados em microscópio óptico e os resultados expressos em média ± erro padrão médio x 10³ de células/mm³.

4.8.3. Quantificação bacteriana

Para quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), baço e fígado foram macerados em PBS e, em seguida, foram submetidos a diluições decimais seriadas, sendo uma alíquota de cada diluição semeada em placas de Petri em meio de cultura M.H. pelo método de *pour plate*. Amostras de fluido peritoneal e sangue também foram diluídas e quantificadas. Todas as placas foram incubadas em estufa por 48 horas a 37°C e, a seguir, as colônias foram quantificadas.

4.8.4. Análise de expressão gênica de citocinas

Amostras de tecido do baço foram utilizadas para extração de RNA total, sendo macerados em almofariz com 500 µL de reagente TRI-reagente para lise química das células, seguindo protocolo do fabricante (Sigma). Após etapas de centrifugação, extração com clorofórmio, precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 75%, o pellet contendo RNA foi suspenso com 30 µL de água ultrapura. O RNA obtido foi utilizado como molde para conversão em DNA complementar (cDNA), utilizando o kit comercial (Sigma). Para reações de RT - qPCR, as amostras de cDNA foram diluídas em água ultrapura (1:10). As reações foram produzidas para um volume de 25 µL em triplicata para cada amostra. Foi utilizado o Rotor Gene Q series - Qiagen, sendo realizados 40 ciclos nas condições de 95°C/15 s seguido de 60°C/60 s. Foram analisadas as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e iNOS com primers específicos e controle interno de amplificação feito com gene peptidil-prolil isomerase A (PPIA) (Tabela 1).

Tabela 1: Primers utilizados para realização da amplificação de cDNA por meio de RT qPCR.

TNF- α	(F) ATTATGGCTCAGGGTCCAAC (R) AAAGCCCATTTGAGTCCTTG
IL-1 β	(F) TGAGCACCTTCTTTTCCTTCA (R) TTGTCTAATGGGAACGTCACAC
IL-6	(F) TAATTCATATCTTCAACCAAGAGG (R) TGGTCCTTAGCCACTCCTTC
IL-10	(F) CATGGGTCTTGGGAAGAGAA (R) AACTGGCCACAGTTTTTCAGG
iNOS	(F) TGTGGCTACCACATTGAAGAA (R)TCATGATAACGTTTCTGGCTCTT
PPIA	(F) GACTGAGTGGTTGGATGGCA (R) GCCATTTCTGGACCCAAAGC

Os resultados foram analisados seguindo a fórmula proposta por Dussault e Pouliot (2006) onde:

$$\Delta\Delta Ct = [(Ct_{GI_{Controle}} - Ct_{PPIA_{Controle}}) - (Ct_{GI_{Experimental}} - Ct_{PPIA_{Experimental}})]$$

Sendo GI representado pelos valores de cycle threshold (CT) dos genes estudados nos grupos experimentais, onde os resultados expressam a variação relativa aos grupos controles (Grupo I) utilizando a fórmula $2^{\Delta\Delta Ct}$.

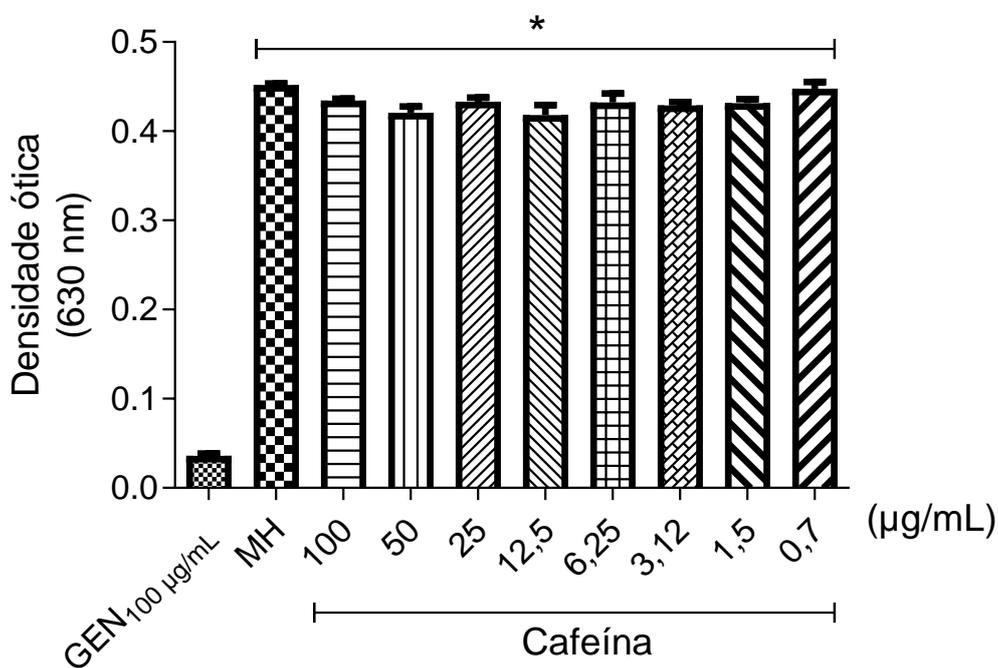
4.9. Análise estatística

Para análise dos resultados e confecção dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism versão 5.0. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e a diferença estatística entre os grupos foi realizada a partir da análise de variância (ANOVA), seguidas pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de $P < 0.05$.

5. RESULTADOS

O resultado do teste antimicrobiano direto mostrou que as concentrações de cafeína entre 0,78 e 100 $\mu\text{g/mL}$ não foram capazes de inibir o crescimento de *L. monocytogenes* (Figura 4). Tais grupos não apresentaram diferenças de leitura densidade ótica em relação ao controle sem tratamento, contendo apenas a bactéria. Por outro lado, o controle antibiótico Gentamicina 100 $\mu\text{g/mL}$, demonstrou inibição do crescimento bacteriano como esperado (Figura 4).

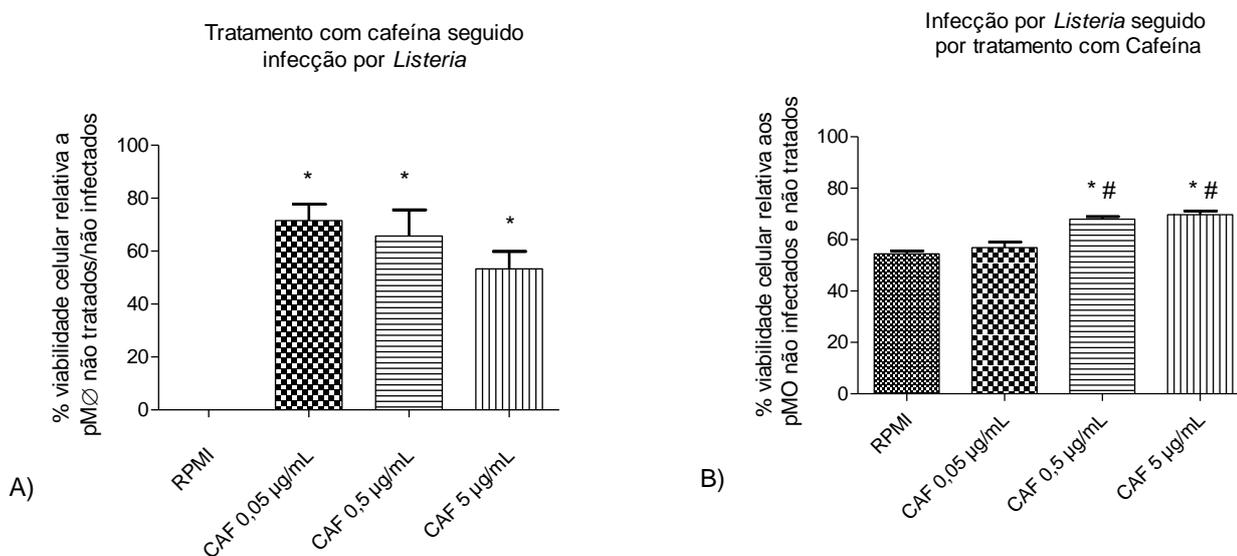
Figura 4: Efeito da cafeína sobre o crescimento microbiano de *Listeria monocytogenes* cepa 619.



* Significa diferença estatística ($P < 0,05$) entre as concentrações de cafeína (0,7 a 100 $\mu\text{g/mL}$) e o grupo M.H sem tratamento comparado ao grupo controle gentamicina (GEN).

Os testes com pMΦ infectados com *L. monocytogenes*, sob diferentes esquemas de tratamento com cafeína, mostraram aumento da viabilidade celular quando comparados ao grupo RPMI infectado/não tratado (Figura 5). No teste em que os macrófagos foram expostos a cafeína antes da infecção por *L. monocytogenes*, pode-se observar que a viabilidade celular apresentou diferença estatística nos grupos expostos à cafeína nas concentrações de 0,05 µg/mL, 0,5 µg/mL e 5 µg/mL (Figura A), sendo esta viabilidade superior quando comparado ao grupo RPMI infectado/não tratado (Figura A), onde todos pMΦ foram eliminados após a infecção (Figura A). Nos testes em que a infecção foi realizada antes do tratamento com cafeína, observou-se também um aumento na viabilidade celular com diferença significativa nas concentrações de 0,5 e 5 µg/mL (Figura B), comparado ao grupo RPMI infectado/não tratado (Figura B). A análise estatística não mostrou diferença significativa entre as concentrações de cafeína utilizadas no modelo onde o tratamento com cafeína foi realizado antes da infecção (Figura A) mas o teste de comparação múltipla de Bonferroni mostrou diferença significativa entre a cafeína na concentração de 0,05 µg/mL e as concentrações 0,5 µg/mL e 5 µg/mL no segundo modelo, onde a infecção foi realizada antes da exposição a cafeína (Figura B).

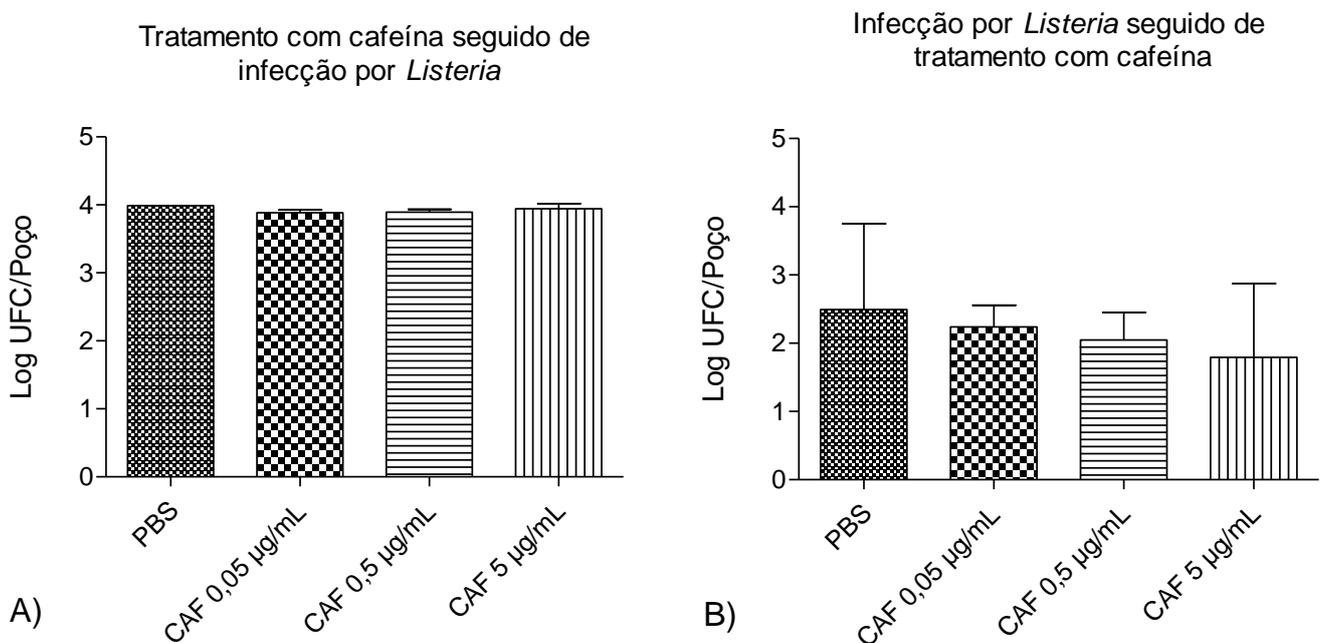
Figura 5: Viabilidade de pMØ de camundongos Swiss tratados com cafeína seguido infecção por *L. monocytogenes* (Figura A) e infectados por *L. monocytogenes* seguido tratamento com cafeína (Figura B).



* Significa diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos tratados com cafeína e o grupo RPMI infectado/não tratado; # significa diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos cafeína 0,5 µg/mL e 5 µg/mL comparado com o grupo cafeína 0,05 µg/mL.

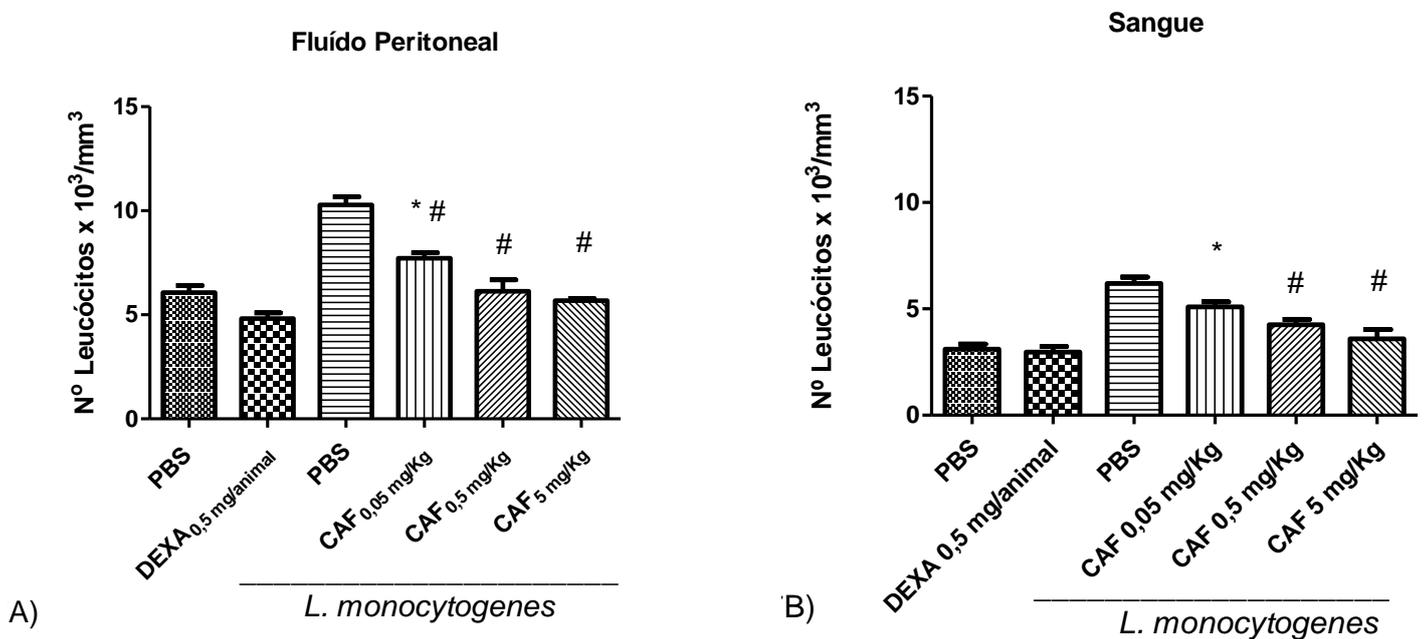
A quantificação bacteriana de pMΦ infectados com *L. monocytogenes* mostrou que os tratamentos com diferentes concentrações de cafeína não produziram diminuição na carga microbiana intracelular, não apresentando diferença estatística significativa quando comparados ao grupo infectado/não tratado em nenhum dos esquemas de tratamento (Figura A e B).

Figura 6: Efeito da cafeína na eliminação intracelular de *L. monocytogenes* em culturas de pMØ de camundongos Swiss. Tratamento com cafeína seguido de infecção por *Listeria* (Figura A) e infecção por *Listeria* seguido de tratamento com cafeína (Figura B).



A contagem total de leucócitos no fluido peritoneal dos animais mostrou diferença significativa do grupo PBS infectado/não tratado em relação aos grupos tratados com cafeína nas concentrações de 0,5 mg/Kg e 5 mg/Kg (Figura A). Quando a contagem total de leucócitos foi feita no sangue dos animais, observou-se similaridade na diferença estatística do grupo PBS infectado/não tratado em relação aos grupos tratados com cafeína nas concentrações de 0,5 mg/Kg e 5 mg/Kg (Figura B) como na contagem total de leucócitos no fluido peritoneal. Ainda no sangue, a diferença estatística foi vista entre o grupo DEXA 0,5 mg/animal e a cafeína na concentração de 0,05 mg/Kg (Figura B).

Figura 7: Ação da cafeína na migração de leucócitos no fluido peritoneal (Figura A) e no sangue (Figura B) de camundongos Swiss infectados experimentalmente com *Listeria monocytogenes*.



* Significa diferença estatística (P<0,05) entre os grupos tratados com cafeína e o grupo controle DEXA infectado; # significa diferença estatística (P<0,05) entre o grupo tratado com cafeína e o grupo PBS infectado/não tratado.

Na análise dos resultados para a contagem diferencial de leucócitos no fluído peritoneal dos animais (Tabela 2), observa-se diferença significativa apenas no número de linfócitos no grupo de animais que foram expostos à cafeína na concentração de 0,5 mg/Kg, quando comparado ao grupo PBS infectado/não tratado (Tabela 2).

Tabela 2: Contagem total e diferencial de leucócitos no fluido peritoneal de camundongos Swiss tratados com cafeína após infecção com *L. monocytogenes*.

Grupos	Contagens celulares no fluído peritoneal (10 ³ CELLS/MM ³)					
	Leucócitos totais (10 ³ cells/mm ³)	Eosinófilos	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Basófilos
PBS	10,05± 0,72	0,00 ± 0,00	7,61 ± 2,10	2,09 ± 2,64	0,10 ± 0,11	0,23 ± 0,22
DEXA 0,5 mg/animal	4,66± ,49	0,00 ± 0,00	3,61 ± 0,38	0,92 ± 0,82	0,05 ± 0,08	0,07 ± 0,06
Cafeína 0,05 mg/Kg	7,56± 0,47	0,00 ± 0,00	4,62 ± 0,89	2,84 ± 0,96	0,09 ± 0,04	0,00 ± 0,00
Cafeína 0,5 mg/Kg	4,60± 3,16*	0,00 ± 0,00	3,76 ± 2,61*	0,81 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,03
Cafeína 5 mg/Kg	5,37± 0,63*	0,00 ± 0,00	4,35 ± 1,32	1,00 ± 1,22	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,04

* Significa diferença estatística (P<0,05) entre os grupos tratados com cafeína e o grupo controle PBS infectado/não tratado.

Quando analisados no sangue dos animais (Tabela 3), a contagem diferencial de leucócitos mostrou diferença significativa apenas nos linfócitos, igualmente ao resultado da contagem no fluido peritoneal. Mudando apenas a concentração de cafeína que foi de 5 mg/Kg, quando comparado ao grupo PBS infectado/não tratado (Tabela 3).

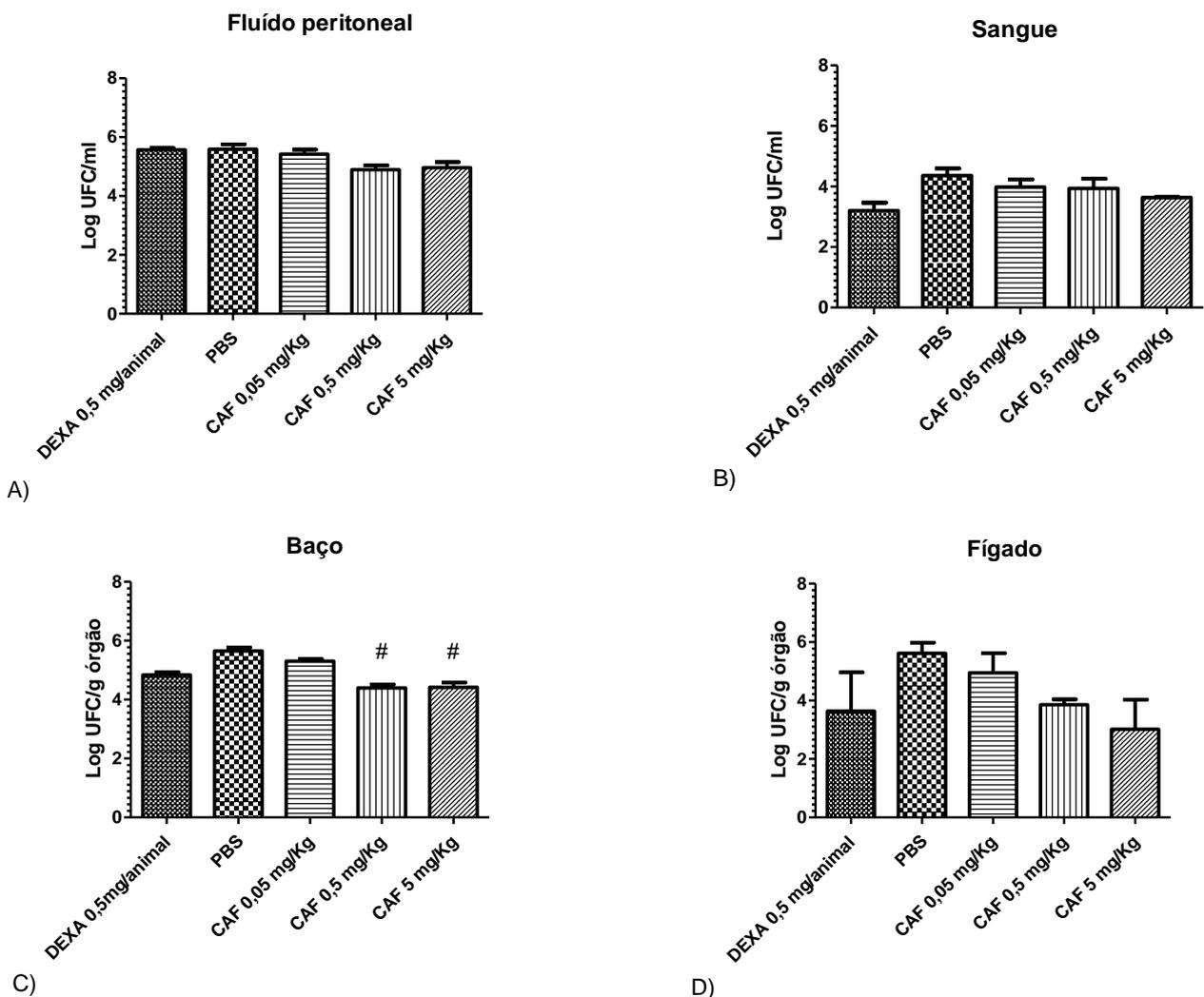
Tabela 3: Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue de camundongos Swiss tratados com cafeína após infecção com *L. monocytogenes*.

Grupos	Contagens celulares no sangue (10 ³ cells/mm ³)					
	Leucócitos totais (10 ³ cells/mm ³)	Eosinófilos	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Basófilos
PBS	6,18± 0,61	0,00± 0,00	4,67 ± 1,64	1,36 ± 1,23	0,03 ± 0,07	0,12 ± 0,14
DEXA 0,5 mg/animal	2,96± 0,54	0,00± 0,00	2,36 ± 0,36	0,54 ± 0,32	0,06 ± 0,06	0,00 ± 0,00
Cafeína 0,05 mg/Kg	5,10± 0,47 [#]	0,00± 0,00	3,12 ± 0,65	1,91 ± 0,64	0,06 ± 0,03	0,00 ± 0,00
Cafeína 0,5 mg/Kg	4,25± 0,51 [*]	0,00 ± 0,00	2,95 ± 0,58	1,22 ± 0,18	0,05 ± 0,04	0,02 ± 0,04
Cafeína 5 mg/Kg	3,60± 0,86 [*]	0,00 ± 0,00	2,67 ± 0,57 [*]	0,85 ± 0,41	0,06 ± 0,05	0,00 ± 0,01

* Significa diferença estatística (P<0,05) entre os grupos tratados com cafeína e o grupo controle PBS infectado/não tratado; # significa diferença estatística (P<0,05) entre o grupo tratado com cafeína 0,05 mg/Kg e o grupo DEXA 0,5 mg/animal.

A quantificação de UFC/poço no fluido peritoneal, sangue, baço e fígado dos camundongos Swiss dos grupos *in vivo* não apresentou diferença significativa entre os grupos infectados sem e com tratamento em ambas as amostras de fluido peritoneal (Figura A), sangue (Figura B) e fígado (Figura D). Por outro lado, observou-se diferença significativa na contagem de UFC/poço no baço dos animais tratados com 0,5 mg/Kg e 5 mg/Kg de cafeína quando comparados ao grupo PBS infectado/não tratado (Figura C).

Figura 8: Quantificação de UFC/poço de *Listeria monocytogenes* após tratamento com cafeína no fluido peritoneal (Figura A), sangue (Figura B), baço (Figura C) e fígado (Figura D) de camundongos Swiss.

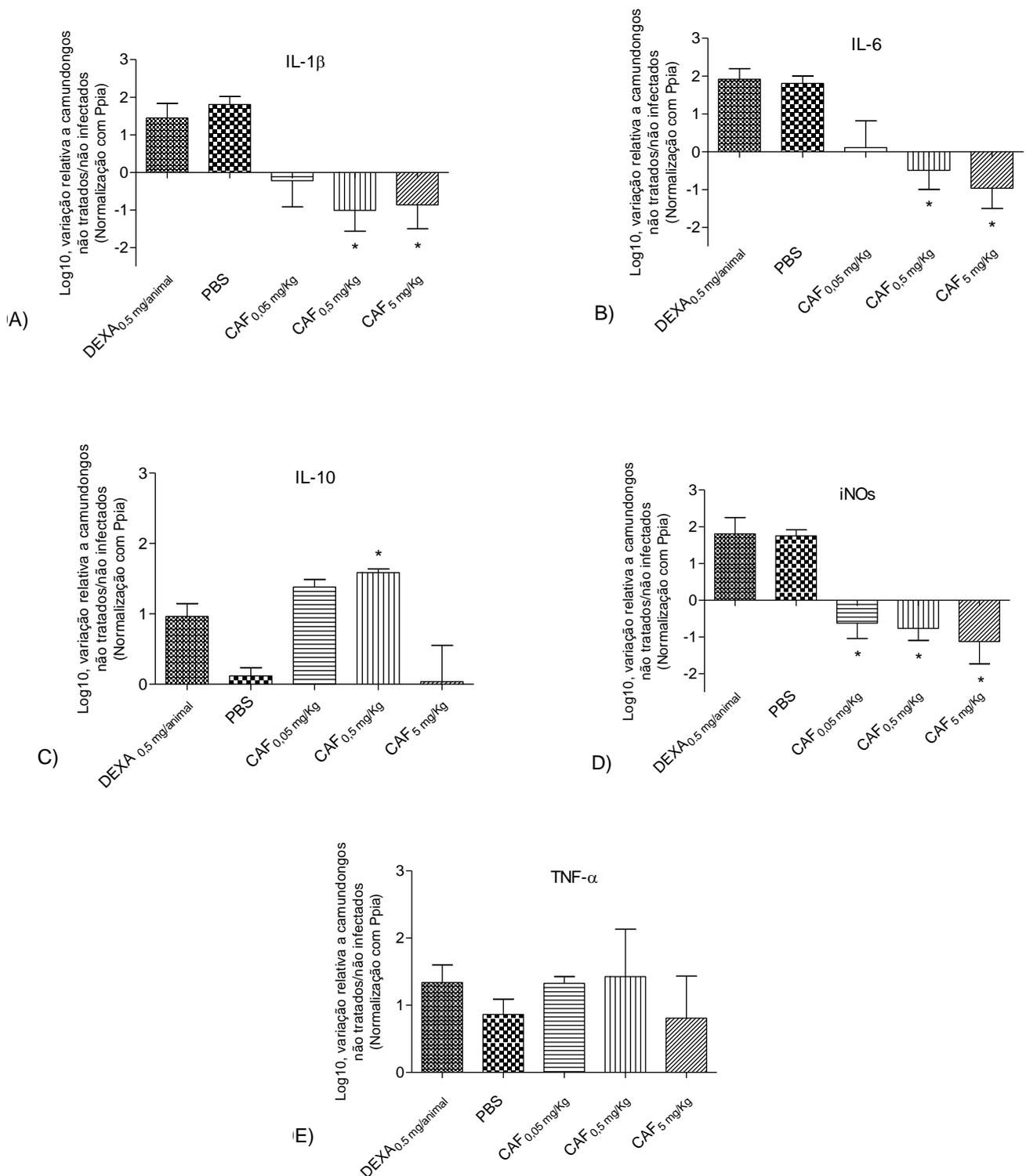


Significa diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos tratados com cafeína e o grupo controle PBS infectado/não tratado.

Os resultados da expressão gênica de citocinas no baço dos animais do experimento *in vivo* mostrou diferença significativa das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) nos grupos infectados/tratados com a cafeína quando comparados ao grupo PBS infectado/não tratado (Figura 9). A citocina TNF- α não apresentou diferença significativa em nenhum dos grupos experimentais (Figura E).

No resultado da citocina IL-1 β nota-se a diminuição da expressão nos grupos tratados com cafeína nas concentrações de 0,5 mg/Kg e 5 mg/Kg (Figura A) quando comparados ao grupo PBS infectado/não tratado (Figura A). Da mesma forma, a diminuição da expressão aparece no gráfico da citocina IL-6, mostrando diferença significativa nos grupos tratados com cafeína nas concentrações de 0,5 mg/Kg e 5 mg/Kg (Figura B) quando comparados ao grupo PBS infectado/não tratado (Figura B). Por outro lado, no gráfico referente a citocina IL-10 observa-se uma alta expressão desta citocina no grupo tratado com cafeína na concentração de 0,5 mg/Kg (Figura C) quando comparado ao grupo PBS infectado/não tratado (Figura C). O resultado no gráfico da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) mostra a diminuição da expressão desta enzima em todas as concentrações de cafeína utilizadas, sendo elas 0,05 mg/Kg; 0,5 mg/Kg e 5 mg/Kg (Figura D) quando comparados ao grupo PBS infectado/não tratado (Figura D). Por fim, não ocorreu diferença estatística na expressão da citocina TNF- α em nenhuma das concentrações de cafeína testadas quando comparadas ao grupo PBS infectado/não tratado (Figura E).

Figura 9: Expressão de citocinas e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no baço de camundongos Swiss tratados com cafeína e infectados experimentalmente com *L. monocytogenes*.



* Significa diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos tratados com cafeína e o grupo controle PBS infectado/não tratado.

6. DISCUSSÃO

A resposta imune inata ou adaptativa a um patógeno é de extrema importância no controle da infecção, sendo que processos inflamatórios descontrolados podem levar a sepse e a morte (MACHADO et al., 2004). Neste estudo, a cafeína foi investigada com relação aos seus efeitos na resposta imunológica durante infecção experimental causada por *L. monocytogenes*. Após realização e análise dos experimentos, foi observado que a cafeína influenciou a ativação da resposta imune em modelos de infecção com cultura de células, também apresentando ação anti-inflamatória significativa em camundongos Swiss infectados com *L. monocytogenes*.

Testes de atividade antimicrobiana geralmente se caracterizam pela determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) nos quais é avaliado se uma substância inibe o crescimento de um microrganismo (OSTROSKY et al., 2008). Em estudo anterior, Almeida (2005) realizou testes de atividade antimicrobiana com compostos químicos do café, incluindo a cafeína, utilizando bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Os resultados mostraram que a cafeína na concentração de 8 mg/mL foi capaz de inibir o crescimento de *Salmonella choleraesuis*, bactéria de origem alimentar causadora da Salmonelose. Tal dosagem utilizada por Almeida (2005) é extremamente alta e possivelmente indica a ausência de ação antimicrobiana em concentrações terapêuticas. Em outro estudo, Bazzaz (2018) mostrou que a cafeína em concentração de até 200 µg/mL não exerceu efeito inibitório no crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Tais dados corroboram nossos resultados, que mostraram que a cafeína não foi capaz de exercer ação antimicrobiana direta *in vitro* em nenhuma das concentrações utilizadas contra *L. monocytogenes* 619, sendo a concentração mais alta testada de 100 µg/mL.

A realização de teste de citotoxicidade é essencial para avaliar a toxicidade das substâncias de estudo (ARAÚJO et al., 2008). Estudo feito por Liu (2011) com células da medula óssea de ratos, mostrou que doses de cafeína que variaram de 0,005 e 1 mM não afetaram a viabilidade celular, não causando apoptose ou citotoxicidade. As concentrações de cafeína escolhidas para os testes *ex vivo* e *in vivo*, neste trabalho, foram baseadas na literatura e em testes de citotoxicidade realizados por nosso grupo de pesquisa, mostrando que a cafeína não causou danos em culturas de macrófagos nas dosagens testadas (dados não publicados).

Anteriormente, Deliktaş (2017), induziu a citotoxicidade da bilirrubina em astrócitos de ratos. Para testar uma possível reversão desta citotoxicidade, os astrócitos foram expostos a cafeína (100 µM). Como resultado, foi observado que a cafeína, por meio de ação antiapoptótica e antiinflamatória, diminuiu os fatores prejudiciais da bilirrubina. Neste estudo, a viabilidade celular de macrófagos infectados com *L. monocytogenes* foi aumentada quando as células foram expostas à cafeína, antes ou após infecção, quando comparados aos macrófagos infectados/não tratados. Tais dados, confirmaram a capacidade da cafeína em aumentar a viabilidade celular, apesar dos que os mecanismos envolvidos não estarem claros.

Para verificar se a cafeína estaria exercendo uma ação anti-infecciosa, estimulando a capacidade bactericida dos macrófagos e aumentando a eliminação bacteriana, foi realizada quantificação de *L. monocytogenes* no ambiente intracelular. Contudo, não foi observada diferença entre as contagens de bactérias dos grupos experimentais em qualquer das concentrações em relação aos controles. Assim, novos experimentos se fazem necessários para esclarecer a ação da cafeína sobre a resposta inflamatória. Durante reações inflamatórias derivadas de infecções, os neutrófilos são as primeiras células da imunidade inata que migram para o sítio infeccioso, atuando precocemente na eliminação microbiana (CRUVINEL *et al.*, 2010).

Considerando os relatos de ação anti-inflamatória da cafeína, a hipótese de que a mesma poderia inibir o recrutamento de leucócitos durante uma infecção real por *L. monocytogenes* foi investigada. Nossos dados confirmaram que houve uma diminuição significativa de leucócitos no fluido peritoneal dos camundongos Swiss, após infecção intraperitoneal, quando os animais foram expostos pelo menos a uma das doses de cafeína testadas, quando comparados ao grupo infectado sem tratamento. Ainda, uma redução de leucócitos no sangue foi observada, sugerindo que a cafeína poderia estar inibindo a hematopoese de células imunes. Esses dados sugeriram, em princípio, que o tratamento com cafeína poderia comprometer a eliminação de *L. monocytogenes* em estágios iniciais da doença. Contudo, dentre os tipos de leucócitos quantificados no teste *in vivo*, apenas os linfócitos foram os que

apresentaram redução significativa no fluido peritoneal e sangue quando comparado ao grupo infectado não tratado.

Durante as bacteremias, o baço executa papéis importantes na depuração de bactérias na corrente sanguínea, uma vez que é rico em macrófagos residentes (MARQUES, 2002). De forma semelhante, o fígado é rico em células de Kupffer fagocíticas. Contudo, *L. monocytogenes* pode sobreviver em macrófagos não ativados e possui mecanismos de escape intracelular (COUSENS e WING, 2000). Na quantificação de bactérias *in vivo*, não foi observada diferença significativa entre os grupos em amostras do fluido peritoneal e sangue. Ainda, os tratamentos com cafeína produziram uma redução de mais de dez vezes na quantidade de bactérias encontradas no baço, sugerindo estímulo da atividade fagocitária e ativação de mecanismos antimicrobianos. Contudo, tal redução não foi associada a ação bactericida produzida por óxido nítrico intracelular, sugerindo que outros compostos bactericidas podem estar sendo ativados como, por exemplo, derivados reativos oxidativos (ROS).

Para investigar se a cafeína estaria estimulando a produção de mediadores associados ao controle do processo inflamatório *in vivo*, durante infecção por *L. monocytogenes*, modificações no nível de expressão gênica das citocinas TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 foram avaliadas a partir de RNA total extraído do baço dos animais. Citocinas são proteínas secretadas por células capazes de mediar a resposta inflamatória causada por infecções. A produção exacerbada de citocinas inflamatórias, por exemplo, pode comprometer hemodinamicamente o indivíduo (OLIVEIRA, 2011). Estudos demonstram a importância das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β na mobilização de leucócitos aos sítios infecciosos. Por outro lado, a expressão precoce da citocina anti-inflamatória IL-10 pode ser prejudicial no controle inicial de infecções por *L. monocytogenes*, diminuindo a resposta imune ao patógeno (CALAME et al., 2016).

Nossos resultados mostraram uma diminuição significativa na expressão das citocinas IL-1 β e IL-6, acompanhado de aumento da expressão gênica de IL-10, a depender da dosagem de cafeína, quando comparados ao grupo infectado e não tratado. De acordo com Antonioli (2019), a ativação do Ars do tipo A_{2A} por cafeína

pode restringir a produção da citocina IL-6 e da enzima iNOS. Por outro lado, esta ativação aumenta a expressão da IL-10, corroborando com os nossos resultados. Ohta (2007) também observou o aumento da expressão de IL-10 em ratos após a exposição a doses de cafeína. Por fim, os dados sugerem que os tratamentos com cafeína induziram a produção de IL-10, o que explicaria a ação anti-inflamatória observada no presente estudo.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que os tratamentos com cafeína exerceram ação anti-inflamatória durante processo infeccioso produzido por *L. monocytogenes* que foi correlacionada com a produção da citocina anti-inflamatória IL-10. Tal ação anti-inflamatória não comprometeu a capacidade eliminação da bactéria de órgãos alvo da infecção. De fato, houve efeito benéfico da cafeína na redução da carga microbiana tecidual do baço, que não foi correlacionado a ação bactericida produzida por óxido nítrico intracelular. Apesar deste mecanismo ainda não estar elucidado, os dados aqui apresentados apontam para o potencial da utilização de cafeína como anti-inflamatório no controle de processos inflamatórios graves derivados de infecções microbianas.

8. REFERÊNCIAS

- ABATCHA, M. G.; GONI, M. D.; ABBAS, M. A.; JALO, I. M.; MOHAMMED, G. A. Review of *Listeria* and *Salmonella*: An update on description, characteristics, incidence, and antibiotic susceptibility, **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, p. 1232-1249, 2020.
- ABBAS, A.K.; LICHTMANN, A.; PILLAI, S. Imunologia celular e molecular. 6. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, p. 341-345. 2008.
- ABD, E. et al. Deformable liposomes as enhancer of caffeine penetration through human skin in a Franz diffusion cell test. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 43, n. 1, p. 1–10, 2020.
- ABBASI, A. et al. Nicotine and caffeine alter the effects of the LPS- primed mesenchymal stem cells on the co-cultured neutrophils. **Life Sciences**, v. 199, p. 41–47, 2018.
- ABIC. **Sumário executivo café**. Disponível em:<<https://www.abic.com.br/wp-content/uploads/2020/01/2021.02.SumarioCafe.pdf>>. Acesso em: 08 de abr. de 2021.
- ALMEIDA, A. A. P.; SILVA, D. A. M.; NUNAN, E. A.; GLÓRIA, M. B. A. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de compostos químicos do café. **Simposio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 2005.
- ALVES, R. C.; CASA, S.; OLIVEIRA, B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade?. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2169-2180, 2009 .
- ANTONIOLI, L. et al. Adenosine signaling and the immune system: When a lot could be too much. **Immunology Letters**, v. 205, p. 9–15, 2019.
- ARAUJO, D. E. P.; DELFINO, F. S.; PROVESI, J. V.; SKIBA, L. G.; HASPER, M. G. Consumo da cafeína: uma abordagem bioquímica e sociocultural no IFC-Araraqui. **Projeto de iniciação científica**, 2017. Disponível em:<<http://quimica.araraqui.ifc.edu.br/wpcontent/uploads/sites/20/2018/12/TRABALHO-FINAL-CONSUMO-DE-CAFE%C3%8DUA-UMA-ABORDAGEM-BIOQU%C3%8DMICA-E-SOCIOCULTURAL-NO-IFC-ARAQUARI.pdf>> Acesso em: 08 de abr. de 2021.
- ARAÚJO, S. A. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MIRANDA, A. M.; LIMA, F. E. S.; MELO, V. S. P.; RICARTE, A. R. F.; COSTA E. C. Avaliação in vitro da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, p. 25-31, 2008.
- ASADI, A. et al. A review on anti-adhesion therapies of bacterial diseases. **Infection**, v. 47, n. 1, p. 13–23, 2018.
- ASPECTOS Botânicos. **International Coffee Organization**, 2018. Disponível em: <https://www.ico.org/pt/botanical_p.asp>. Acesso em: 23 de mar. de 2021.

BALLESTEROS-YÁÑEZ, I. et al. The role of adenosine receptors in psychostimulant addiction. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 2018.

BAZZAZ, B. S. F., FAKORI, M., KHAMENEH, B., HOSSEINZADEH, H. Effects of omeprazole and caffeine alone and in combination with gentamicin and ciprofloxacin against antibiotic resistant *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia coli* strains. **Journal of Pharmacopuncture**, v. 22, p. 49-54, 2019.

BAZZAZ, B. S. F., KHAMENEH B., ZAHEDIAN, M. R. O, HOSSEINZADEH H. *In vitro* evaluation of antibacterial activity of verbascoside, lemon verbena extract and caffeine in combination with gentamicin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* clinical isolates. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 8, n. 3, p. 246-253, 2018.

BOREA, P. A. et al. Pharmacology of adenosine receptors: The state of the art. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1591–1625, 2018.

CAFÉ no Brasil. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/cafes/cafecultura-brasileira>>. Acesso em: 07 de abr. de 2021.

CAFÉ no mundo. **Sindicato da Indústria de Café do Estado de Minas Gerais**, 2004. Disponível em:<<http://sindicafe-mg.com.br/cafes-no-mundo>>. Acesso em: 08 de abr. de 2021.

CALAME, D. G.; MUELLER-ORTIZ, S. L.; WETSEL, R. A. Innate and adaptive immunologic functions of complement in the host response to *Listeria monocytogenes* infection. **Immunobiology**, v. 221, n. 12, p. 1407–1417, 2016.

CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Teor de cafeína em cafés brasileiros. **Ciênc. Technol. Aliment.** v. 18, n. 4, p. 421-424, 1998.

CHLEBICZ A, ŚLIŻEWSKA K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as zoonotic foodborne diseases: A review. **International Journal Environmental Research and Public Health**, v. 15, 2018.

CONLAN, J. W.; NORTH, R. J. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 3, p. 741–744, 1991.

COUSENS, L. P.; WING, E. J. Innate defenses in the liver during *Listeria* infection. **Immunological Reviews**, v. 174, n. 1, p. 150–159, 2000.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAUJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista brasileira de reumatologia** 50 (4), 434-447, 2010.

DELIKTAŞ, M. et al. Caffeine prevents bilirubin-induced cytotoxicity in cultured newborn rat astrocytes. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 32, n. 11, p. 1813–1819, 2018.

DHAMA, K. et al. Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, v. 35, n. 4, p. 211–235, 2015.

DUPRÉ, L. et al. T Lymphocyte Migration: An action movie starring the actin and associated actors. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 2015.

DURÁN, C. A. A.; TSUKUI, A.; SANTOS, F. K. F.; MARTINEZ, S. T.; BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. Café: Aspectos gerais e seu aproveitamento para além da bebida. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, 2017.

EMBRAPA, 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/48512453/consumo-mundial-de-caffe-em-2019-atinge-168-milhoes-de-sacas>>. Acesso em: 19 de mar. de 2021.

EMBRAPA, 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/41277124/consumo-interno-dos-cafes-do-brasil-representa-13-da-demanda-mundial>>. Acesso em: 19 de mar. de 2021.

FARBER, J. M., PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 752–752, 1991.

FORBES, 2021. Disponível em: <<https://forbes.com.br/listas/2015/07/10-paises-que-mais-consomem-chocolate-no-mundo/>>. Acesso em: 19 de mar. de 2021.

FRANCO, R.; OÑATIBIA-ASTIBIA, A.; MARTÍNEZ-PINILLA, E. Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. **Nutrients**, v. 5, n. 10, p. 4159–4173, 2013.

HORRIGAN, L.A.; KELLY J.P.; CONNOR T.J. Immunomodulatory effects of caffeine: friend or foe? *Pharmacol. Therapeut.*, vol. 111, p. 877-892, 2006.

HWANG, J.-H. et al. Caffeine prevents LPS-induced inflammatory responses in RAW264.7 cells and zebrafish. **Chemico-Biological Interactions**, v. 248, p. 1–7, 2016.

JACOBSON, K. A., GAO, Z. G., MATRICON, P., EDDY, M., CARLSSON, J. Adenosine A2A receptor antagonists: from caffeine to selective non-xanthines. **British Journal of Pharmacology**, p. 1-16, 2020.

JANITSCHKE, D. et al. Unique role of caffeine compared to other methylxanthines (theobromine, theophylline, pentoxifylline, propentofylline) in regulation of ad relevant genes in neuroblastoma sh-sy5y wild type cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 9015, 2020.

LAFUENTE, Y. et al. Preparation and evaluation of caffeine bioadhesive emulgels for cosmetic applications based on formulation design using QbD tools. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 42, n. 6, p. 548–556, 2020.

LECUIT, M. *Listeria monocytogenes*, a model in infection biology. **Cell Microbiology**, p. 4-22, 2020.

LIU, S. H. et al. Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, n. 6, p. 954–960, 2011.

LÓPEZ-CRUZ, L.; SALAMONE, J. D.; CORREA, M. Caffeine and selective adenosine receptor antagonists as new therapeutic tools for the motivational symptoms of depression. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.

MACHADO, E. C. Detecção e quantificação de bactérias resistentes aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol em estações de tratamento de esgoto doméstico. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 25, n. 6, p. 847-857, 2020 .

MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, p. 647-664, 2004.

MARQUES, R. G. Importância da preservação de tecido esplênico para a fagocitose bacteriana. **Acta Cir. Bras**, v. 17, n. 6, p. 388-393, 2002

MATEREKE, L. T.; OKOH, A. I. *Listeria monocytogenes* virulence, antimicrobial resistance and environmental persistence: A review. **Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 528, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças transmitidas por alimentos: causas, sintomas, tratamento e prevenção. Disponível em: < <https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>>. Acesso em: 24 de jun. de 2021.

MATLE, I.; MBATHA, K. R.; MADOROBA, E. A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 87, n. 1, 2020.

MCLAUHLIN, J., MITCHELL, R.T., SMERDON, W.J., JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.92, p. 15 – 33, 2004.

MONTEIRO, J. et al. Pharmacological potential of methylxanthines: Retrospective analysis and future expectations. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 16, p. 2597–2625, 2018.

MST. Norte e Nordeste concentram produção de cacau no Brasil. Disponível em: < <https://mst.org.br/2020/11/24/norte-e-nordeste-concentram-producao-do-cacau-no-brasil/>>. Acesso em: 19 de mar. de 2021.

NISHIYAMA, M. F. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30, supl. 1, p. 191-196, 2010.

NUGRAHINI, A. D. et al. Anti-degranulation activity of caffeine: In vitro and in vivo study. **Journal of Functional Foods**, v. 60, p. 103422, 2019.

OHTA, A.; LUKASHEV, D.; JACKSON, E. K.; FREDHOLM B. B.; SITKOVSKY, M. 1,3,7-trimethylxanthine (caffeine) may exacerbate acute inflammatory liver injury by weakening the physiological immunosuppressive mechanism. **The Journal of Immunology**, p. 7431-7438, 2007

OLAIMAT, A. N. et al. Emergence of antibiotic resistance in *listeria monocytogenes* isolated from food products: A comprehensive review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 5, p. 1277–1292, 2018.

OLIVEIRA, C. M. B. Citocinas e dor. **Rev. Bras. Anestesiol**, v. 61, n. 2, p. 260-265, 2011.

OSTROSKY, E. A. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. bras. farmacogn**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

RAMÍREZ, E. J. M.; FERNÁNDEZ, J. M. Infección invasiva por *Listeria monocytogenes* en un paciente con síndrome de Evans. **Revista Ciencia y Salud Integrando conocimientos**, v. 4, n. 4, 2020.

REIS, A. M. S. Efeitos in vivo e in vitro da cafeína sobre a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais e atividade de síntese de osteoblastos e condrócitos de ratos. 2017. 178 f. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2017.

RODRÍGUEZ-AUAD, J. P. Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes*. **Revista chilena de infectología**, v. 35, n. 6, p. 649–657, 2018.

ROSADO, C. et al. Another reason for using caffeine in dermocosmetics: Sunscreen adjuvant. **Frontiers in Physiology**, v. 10, 2019.

RUBY, T. et al. Salmonella 's long-term relationship with its host. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 600–615, 2012.

SERBINA, N. V. et al. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 59–70, 2003.

SHUSHTARI, N.; M, D. V.; FROUSHANI, S. M. A. Caffeine augments the instruction of anti-inflammatory macrophages by the conditioned medium of mesenchymal stem cells. **Cell Journal**, v. 19, p. 415-424, 2017.

STATISTA, 2021. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/940102/global-tea-consumption/#statisticContainer>>. Acesso em: 19 de mar. de 2021.

TORRES-BARCELÓ, C. The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2018.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 584–640, 2001.

WEISER, T. et al. Efficacy and safety of a fixed-dose combination of ibuprofen and caffeine in the management of moderate to severe dental pain after third molar

extraction. **European Journal of Pain**, v. 22, n. 1, p. 28–38, 2017.

ZENEWICZ, L. A.; SHEN, H. Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 10, p. 1208–1215, 2007.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer de aprovação da CEUA - UFRPE



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Potencial imunomodulador da cafeína em cultura de macrófagos peritoneais em modelo de infecção experimental por *Listeria monocytogenes*", protocolada sob o CEUA nº 8883080121 (ID 000596), sob a responsabilidade de **Jose Vitor Moreira Lima Filho e equipe; Ingridt de Alcântara Almeida** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE) na reunião de 10/03/2021.

We certify that the proposal "Caffeine immunomodulatory potential in culture of peritoneal macrophages in a model of experimental infection by *Listeria monocytogenes*", utilizing 12 Heterogenics mice (12 females), protocol number CEUA 8883080121 (ID 000596), under the responsibility of **Jose Vitor Moreira Lima Filho and team; Ingridt de Alcântara Almeida** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Rural Federal University of Pernambuco (CEUA/UFRPE) in the meeting of 03/10/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 04/2021 a 05/2021 Área: Ciências Biológicas

Origem:	Biotério Jacques Robert Nicoli	sexo:	Fêmeas	idade:	1 a 4 meses	N:	12
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	25 a 40 g		
Linhagem:	Swiss						

Local do experimento: Todos os experimentos serão realizados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMIM), localizado no prédio Newton Banks na UFRPE.

Recife, 10 de março de 2021

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite de Souza
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Carlos Fernando Rodrigues Guaraná
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural de Pernambuco

ANEXO B – Parecer de aprovação da CEUA - UFRPE



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO DA 1,3,7 TRIMETILXANTINA EM MODELOS DE INFECÇÃO POR *Listeria monocytogenes*", protocolada sob o CEUA nº 2230060421 (ID 000653), sob a responsabilidade de **Jose Vitor Moreira Lima Filho** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE) na reunião de 14/04/2021.

We certify that the proposal "IMMUNOMODULATORY POTENTIAL OF CAFFEINE IN A MODEL OF *LISTERIA* monocytogenes INFECTION IN SWISS MICE", utilizing 24 Heterogenics mice (24 females), protocol number CEUA 2230060421 (ID 000653), under the responsibility of **Jose Vitor Moreira Lima Filho** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Rural Federal University of Pernambuco (CEUA/UFRPE) in the meeting of 04/14/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [04/2021](#) a [05/2021](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem:	Biotério Jacques Robert Nicoli	sexo:	Fêmeas	idade:	1 a 4 meses	N:	24
Espécie:	Camundongos heterogênicos						
Linhagem:	Swiss			Peso:	25 a 40 g		

Local do experimento: Todos os experimentos serão realizados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMIM), localizado no prédio Newton Banks na UFRPE.

Recife, 14 de abril de 2021

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite de Souza
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Carlos Fernando Rodrigues Guaraná
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural de Pernambuco