



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

JULIANA KELLY URTIGAS DE SOUZA

**Potencial de peptidases extraídas do látex da *Calotropis procera* como
agente imunoterápico contra *Salmonella* ssp.**

Recife-PE

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

JULIANA KELLY URTIGAS DE SOUZA

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: Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho

Recife-Pe

2022

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)

D278p

DE SOUZA, JULIANA KELLY URTIGAS

Potencial de peptidases extraídas do látex da *Calotropis procera* como agente imunoterápico contra *Salmonella ssp* / JULIANA KELLY URTIGAS DE SOUZA. - 2022.
53 f. : il.

Orientador: JOSE VITOR MOREIRA LIMA FILHO.
Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2023.

1. Plantas Laticíferas. 2. *Salmonella*. 3. LPP3. I. FILHO, JOSE VITOR MOREIRA LIMA, orient. II. Título

CDD 636.089

JULIANA KELLY URTIGAS DE SOUZA

**Potencial de peptidases extraídas do látex da *Calotropis procera* como
agente imunoterápico contra *Salmonella* ssp.**

Dissertação aprovada em 16/11/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho (Orientador - UFRPE)

Dra. Betty Mancebo Dorvigny (Membro Titular/ UFPE)

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos (Membro Titular/ UFC)

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares (Examinador Titular/ UFRPE)

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior (Membro Suplente/ UFRPE)

Recife-Pe

2022

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, pela oportunidade de ingressar na pós graduação, agradeço a Ele por ter colocado pessoas em minha vida que contribuíram para o meu processo de formação, por ter me dado forças em momentos muito difíceis, me sustentou e me fortaleceu para que eu conseguisse chegar até aqui.

Ao meu orientador prof. Dr José Vitor Moreira Lima Filho, que confiou em mim, contribuindo não só com meu crescimento científico mais também pessoal, sou muito grata por toda a disponibilidade, paciência e por não ter desistido de mim. Muito obrigada professor.

Aos professores da banca da banca examinadora, tanto no dia da qualificação como na defesa, muito obrigada pela contribuição científica e agradeço a disponibilidade de todos.

Aos meus colegas de laboratório Betty, Esther e Lucas. Muito obrigada meus queridos por toda contribuição, apoio, troca de conhecimentos, desde o dia que cheguei no laboratório, sempre me apoiaram e contribuíram para o meu desenvolvimento. Em especial, agradeço a Betty por todos os protocolos entregues, por toda a paciência e disponibilidade em me ajudar, sem medir esforços para que eu compreendesse o que precisava ser feito.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro por meio da bolsa do mestrado, foi fundamental para que este trabalho pudesse ser desenvolvido.

Ao meu noivo André Guedes que não mediu esforços para me auxiliar em todos os momentos que mais precisei, até o ponto que quase cheguei a desistir, ele esteve comigo me apoiando e incentivando a chegar até o fim.

Aos meus tios/avós Dona Néia e Seu Admilson, graças a eles eu fui a primeira da minha família a ingressar a uma universidade, a primeira da minha família a se formar numa universidade pública, e embora passamos por bastante dificuldades nos últimos anos, sempre me apoiaram para que eu concluísse a minha pós-graduação. A vocês meus queridos dedico este trabalho.

Gratidão!

RESUMO

Proteases isoladas do látex da planta medicinal de *Calotropis procera* têm sido investigadas em diferentes modelos de inflamação. Considerando estudos anteriores que indicaram propriedades anti-inflamatórias de uma mistura de proteases chamada LPp2, neste trabalho, uma mistura de proteases denominada LPp3, ainda pouco estudada, foi investigada em um modelo de salmonelose experimental. Em um dos modelos utilizados de infecção, culturas de macrófagos foram expostas a diferentes concentrações de LPp3 e infectadas com *Salmonella enterica* Sor. Typhimurium. No modelo de infecção in vivo, camundongos Swiss foram infectados, via intraperitoneal, com *S. Typhimurium* e, a seguir, tratados (via endovenosa) com LPp3. Os resultados mostraram que LPp3 não possui ação antibacteriana direta contra *Salmonella in vitro* e foi incapaz de aumentar a viabilidade celular de macrófagos infectados. Nos ensaios in vivo, após 6 h de infecção, os animais tratados com LPp3 (10 mg/kg) tiveram uma maior carga bacteriana no baço e fígado em relação aos grupos controles não tratados (PBS) ou administrados com Dexametasona. Os tratamentos com LPp3 (1,5 e 10 mg/kg) inibiram o recrutamento de leucócitos para o sítio infeccioso após o inóculo de *Salmonella*, na cavidade peritoneal. Contudo, os níveis de expressão gênica de citocinas inflamatórias medidos no baço, tais como, TNF-alfa e IL1-beta estavam significativamente aumentados nos animais tratados com 10 mg/kg em relação aos animais infectados e não tratados. Concluiu-se que LPp3, assim como já demonstrado para LPp2, rica em enzimas proteolíticas, exibe forte ação anti-inflamatória, o que poderia explicar a menor eliminação de bactérias em dosagens mais elevadas.

Palavras-chaves: proteínas laticíferas, *Salmonella* spp., imunoterapêutico

ABSTRACT

Proteases isolated from the latex of the medicinal plant of *Calotropis procera* have been investigated in different models of inflammation. Considering previous studies that indicated anti-inflammatory properties of a mixture of proteases called LPp2, in this work, a mixture of proteases called LPp3 was investigated in an experimental salmonellosis model. Thus, macrophage cultures were exposed to different concentrations of LPp3 and infected with *Salmonella* enterica Sor. Typhimurium. In another infection model, Swiss mice were infected intraperitoneally with *S. Typhimurium* and then treated (intravenously) with LPp3. The results showed that LPp3 has no direct antibacterial action against *Salmonella* in vitro and was unable to increase the cell viability of infected macrophages. In the in vivo assays, after 6 h of infection, animals treated with LPp3 (10 mg/kg) had a higher bacterial load in the spleen and liver compared to untreated control (PBS) or Dexamethasone-administered groups. Treatments with LPp3 (1, 5 and 10 mg/kg) inhibited the recruitment of leukocytes to the infectious site after *Salmonella* inoculum in the peritoneal cavity. However, gene expression levels of inflammatory cytokines measured in the spleen, such as TNF-alpha and IL1-beta, were significantly increased in animals treated with 10 mg/kg relative to infected/untreated animals. It was concluded that LPp3, as already demonstrated for LPp2, is rich in enzymes with strong anti-inflammatory action, which could explain the lower elimination of bacteria at higher doses.

Keywords: laticifer proteins, *Salmonella* spp., immunotherapeutic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de plantas laticíferas:	13
Figura 2 - Planta Medicinal <i>Calotropis procera</i>	15
Figura 3 - Fluxograma da experimentação.....	25
Figura 4 - :Ensaio de ação antimicrobiana direta de LPp3 contra processo de infecção por <i>Salmonella enterica</i> Sor.Typhimurium.....	27
Figura 5- Viabilidade celular de macrófagos peritoneais infectados com <i>S. Typhimurium</i> e tratados com LPp3.	29
Figura 6 - População de leucócitos totais na cavidade peritoneal de camundongos Swiss após 6 h de infecção por <i>S. Typhimurium</i> e tratamento com LPp3. (* $P < 0,05$), comparação em relação ao grupo PBS infectado sem o tratamento com LPp3.	32
Figura 7- Expressão gênica de citocinas em camundongos Swiss em modelo de salmonelose experimental seguido de tratamento com LPp3 em relação aos níveis da expressão de TNF-alfa.	35
Figura 8 - Expressão gênica de citocinas em camundongos Swiss em modelo de salmonelose experimental seguido de tratamento com LPp3 em relação aos níveis da expressão de IL-beta.....	36
Figura 9 - Expressão gênica de citocinas em camundongos Swiss. Observa-se que a dosagem 10 mg/kg aumentou a expressão dessas citocinas mais de cem vezes. A expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 foi diminuída de forma semelhante em todos os grupos em relação aos animais não tratados	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1	Uso de plantas medicinais	10
2.2	Plantas Laticíferas	10
2.2.1	Laticíferos.....	10
2.2.2	Plantas Laticíferas	11
2.2.3	Proteases.....	11
2.3	Características de <i>Calotropis procera</i>	12
2.4	Infecções Bacterianas	16
2.5	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> Sor. Typhimurium	17
2.6	TGF-β	19
3	OBJETIVOS	21
3.1	Geral.....	21
3.2	Específicos	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	Camundongos Swiss.....	22
4.2	Cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	22
4.3	Obtenção da fração proteica LPp3.....	22
4.4	Obtenção de macrófagos peritoneais.....	23
4.5	Ensaio com macrófagos infectados por <i>S. Typhimurium</i>	23
4.6	Efeito da LPp3 em camundongos Swiss infectados com <i>S. Typhimurium</i> .	24
4.7	Quantificação de unidades formadoras de colônias em órgãos-alvo.....	25
4.8	Análise Contagem dos Leucócitos.....	25
4.9	Análise Estatística	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Salmonella* é formado por bactérias Gram-negativas intracelulares facultativas, que se adaptaram para colonizar muitos nichos e hospedeiros diferentes, podendo ser encontradas como comensais ou patógenos no intestino de animais tais como mamíferos, répteis, aves e até mesmo insetos (DOUGAN et al., 2011). O gênero é formado por duas espécies: *S. bongori* e *S. enterica*, sendo este último formado por seis subespécies, dentre as quais a subespécie I engloba mais de dois mil sorotipos, dentre estes patógenos humanos e animais, como por exemplo *S. enterica* Sor. Typhimurium, associada a gastroenterites, e *S. enterica* Sor. Typhi ou simplesmente *S. Typhi*, associada a febre tifóide (DOUGAN, 2011).

A salmonelose é uma doença transmitida principalmente pelo consumo de alimentos e água contaminada, podendo causar infecções sistêmicas em animais e seres humanos. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Existe uma variação no número de casos de febre tifóide e entérica, dependendo do país e das condições em que vivem as populações (SHINOHARA, 2008).

Considerando o tratamento de doenças infecciosas, desde épocas remotas a sociedade humana vem acumulando informações e experiências que possam contribuir para sua sobrevivência no meio em que vive. Diante disso, dentre as muitas práticas que são realizadas em diversas culturas populares, podemos citar o uso de plantas na área medicinal, o que conhecemos como fitoterapia. Mesmo sem compreender cientificamente quais as biomoléculas presentes, o processo de cura e a eficácia nos tratamentos, a fitoterapia tem sido aplicada ao longo de várias gerações (BADKE et al., 2012).

Observa-se, entretanto, um crescimento na utilização de fitoterápicos pela população que sejam reconhecidamente seguros e eficazes (YUNES, et al., 2001). Assim, a pesquisa de compostos biologicamente ativos para utilização na medicina popular tem por objetivo gerar alternativas viáveis para o desenvolvimento de novas drogas na indústria farmacêutica (PEI, 2001). HOSTTETTANN e TERREAUX (2000) esclarecem que produtos de origem vegetal constituíram as bases para tratamento de diversas doenças infecciosas na medicina popular tradicional devido a presença de moléculas bioativas. Isso é particularmente importante no combate a infecções bacterianas causadas por cepas resistentes aos antimicrobianos.

Em particular, diversas plantas laticíferas produzem compostos com atividade farmacológica, dentre elas *Calotropis procera* (KONNO, 2011; MEGERESSA et al., 2015). Esta espécie é muito encontrada no Nordeste brasileiro e em regiões semiáridas do mundo, muito utilizada na medicina popular indiana (CHUNDATTU et al., 2016). A *C. procera* é conhecida popularmente no Brasil como Algodão-de-seda e uma de suas características é a produção de grande quantidade de látex rico em proteínas e enzimas que parecem contribuir para a defesa da planta contra insetos, herbívoros e microrganismos. (RAMOS et al., 2019).

Diversas ações biológica/farmacológicas já foram reportadas para o látex de *C. procera*, entre as quais a resistência a fitopatógenos e insetos (FREITAS et al., 2007); atividades anti-inflamatórias e analgésicas (RAMOS et al., 2007); atividade antimicrobiana e/ou anti-infecciosa (NENAAH, 2013; ALI et al., 2014; MOHAMED et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2016).

O látex de *C. procera* é composto por uma fração de proteínas de alto peso molecular e não dialisável (LP) na qual foram identificadas, por cromatografia de troca iônica, três subfrações distintas denominadas LPp1, LPp2 e LPp3 (RAMOS et al., 2009). Tais frações proteicas têm sido investigadas em busca de novos princípios ativos que possam auxiliar no tratamento de infecções sistêmicas intracelulares, uma vez que tais microrganismos são menos expostos a ação de antimicrobianos.

Alguns resultados encontrados na literatura demonstraram o potencial anti-inflamatório e citotóxico para células cancerígenas da fração LPp1 (VIANA et al., 2017) e o potencial anti-infeccioso e anti-inflamatório de LPp2 contra *Listeria monocytogenes* (NASCIMENTO et al., 2016; TAVARES et al., 2022). Um estudo anterior sobre potencial anti-infeccioso da fração LPp3 mostrou que a administração preventiva dessas proteínas aumentou a sobrevivência de animais infectados com *Salmonella* (Sousa et al., 2020).

Considerando que as proteínas de *C. procera* não possuem ação antimicrobiana direta contra bactérias, os mecanismos anti-infecciosos parecem estar relacionados à ativação/modulação da resposta imunológica. No presente estudo, a subfração LPp3, extraída do látex da planta *C. procera* foi investigada no tratamento experimental de infecções causadas por *S. Typhimurium* em culturas de macrófagos peritoneais e camundongos Swiss.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Uso de plantas medicinais

A utilização de plantas na medicina popular varia de acordo com o conhecimento de suas propriedades bioativas, que geralmente são repassados de geração a geração (CARVALHO e SILVEIRA, 2010). Mesmo com o desenvolvimento dos fármacos sintéticos, as plantas medicinais permaneceram como forma alternativa de tratamento de doenças em várias partes do mundo, observando-se nas últimas décadas a valorização do emprego de preparações à base de plantas para fins terapêuticos (TUROLLA, 2006).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% usam plantas medicinais ou preparações destas (ROSA et al., 2011). Além disso, grande parte da população mundial, de 70% a 95% da população confia em medicamentos que são produzidos a base de plantas (WHO, 2011). Considerando cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos atualmente comercializados, as plantas representam uma rica fonte de princípios ativos para novas abordagens terapêuticas (KADIYALA et al., 2013).

2.2 Plantas Laticíferas

2.2.1 Laticíferos

Laticíferos são estruturas secretoras internas que contém um fluido denominado látex, que geralmente é mantido sob pressão em células vegetais vivas (AGRAWAL & KONNO, 2009). O látex pode conter hidrocarbonetos poli-isoprenos (borracha), triterpenos, ácidos graxos, aminas, fitosteróis e alcaloides, entre outros compostos (MATILE, 1987; MAUSETH, 1978). A presença dessas estruturas em conjunto com outras evidências tem levado a comprovação de que o látex está relacionado com a defesa das plantas em diferentes ambientes, uma vez que atua na defesa contra microrganismos, sua viscosidade dificulta a predação de insetos herbívoros

(AGRAWAL & KONNO 2009, KONNO 2011) e atua também como selante de ferimentos na planta (FAHN, 1979; Farrell et al., 1991; EVERT, 2006).

Na medicina tradicional, o látex de diferentes espécies vegetais, é geralmente diluído em água e utilizados para o tratamento de inflamações e dores inflamatórias, tumores, gastrites, infecções, dentre outros (DEVPRAKASH et al., 2012; HAGEL et al., 2008).

2.2.2 Plantas Laticíferas

As plantas laticíferas são aquelas que, ao sofrerem algum tipo de dano tecidual, exsudam o seu látex (CHO et al., 2014). Cerca de 12.500 espécies, representantes de 22 famílias, possuem capacidade de produzir este fluido (EVERT, 2006). Dentre as famílias mais representativas, estão: Asclepiadaceae, Apocynaceae, Moraceae, Papaveraceae e Euphorbiaceae (ALBUQUERQUE et al., 2009), com espécies representadas na Figura 1. A estimativa é que 6% de todas as espécies de plantas vasculares apresentem laticíferos (FREITAS et al., 2010), sendo que, aproximadamente 10% das espécies das angiospermas liberam o látex quando os seus tecidos são danificados (METCALFE 1967; FARRELL et al., 1991).

Os canais laticíferos podem ocorrer em diferentes órgãos da planta, tais como caule (*Hevea brasiliensis*), flores (*Aspidosperma australe*), folhas (*Calotropis procera*) e ramos (*Plumeria rubra* e *Cryptostegia grandiflora*) (ALBUQUERQUE et al., 2009). Diversas plantas laticíferas produzem compostos com atividade farmacológica, dentre elas *Calotropis procera* (KONNO, 2011; MEGERESSA et al., 2015).

2.2.3 Proteases

As proteases representam uma classe de enzimas com importantes papéis em processos fisiológicos (HEDSTROM, 2002.) Estas enzimas estão envolvidas em processos biológicos essenciais, como a coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos, entre outros (SAŁAGA et al., 2013). Várias atividades proteolíticas importantes ocorrem como no ciclo de infecção de microrganismos patogênicos (RUFINO et al., 2006).

No passado, as proteases eram classificadas de acordo com o seu peso molecular, carga ou especificidade do substrato. O sistema de classificação é baseado na comparação de centros ativos, mecanismo de ação e estrutura tridimensional

(NEURATH, 1990). As proteases podem ser classificadas também quanto à natureza química do sítio catalítico/mecanismo de ação, são elas: i) serina proteases; ii) cisteína proteases; iii) aspártico proteases; iv) treonina protease e v) metaloproteases (MURI, 2014).

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 encontram-se em todos os seres vivos e representam cerca de 2% do total de proteínas presentes em todos os organismos, estando envolvidas em vias metabólicas e de vias de sinalização celular (VIEIRA, 2013).

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).

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.

2.3 Características de *Calotropis procera*

Pertencente à família Apocynaceae, é uma planta originária da Índia, mas que é encontrada em quase todo os ambientes tropicais. Ela é conhecida popularmente como algodão-de-seda, flor-de-seda, paininha-de-seda e leiteiro (SILVA, 2013). O primeiro relato de utilização de *C. procera* na medicina popular foi realizada por Ved Sushruta, a cerca de 800- 900 a.c. (CHUNDATTU et al., 2016). *Calotropis procera* é usada desde um período muito antigo através de crenças populares como uma droga de escolha para diferentes doenças, suas diferentes fórmulas são encontradas no antigo livro védico da Índia “Sushruta Samita” (CHUNDATTU et al., 2016).

Figura 1 - Exemplos de plantas laticíferas: A) *Allamanda White* (Apocynaceae) B) *Asclepias curassavica* (Asclepiadaceae) C) *Euphorbia pulcherrima* (Euphorbiaceae) D) *Ficus carica* (Moraceae) E) *Eschscholzia californica* (Papaveraceae) F) Látex natural extraído da seringueira do Pará (*Hevea brasiliensis*).



Fonte: Google Imagens

C. procera é uma planta arbustiva no qual seu tamanho pode variar, alcançando 1-5 metros de altura, suas hastes são de textura lisa, porém são cobertas com pelos de cor esbranquiçada. Os arbustos são constituídos de folhas consideravelmente grandes apresentam flores e seus frutos apresentam numerosas sementes em seu interior. As sementes são ovóides com base arredondada e ápice agudo, envoltas de filamento sedosos que facilitam sua dispersão, esta pode ocorrer em longas distâncias. Na região Nordeste brasileira, *C. procera* é encontrada em abundância, pois é muito utilizada na medicina popular (CHUNDATTU et al., 2016).

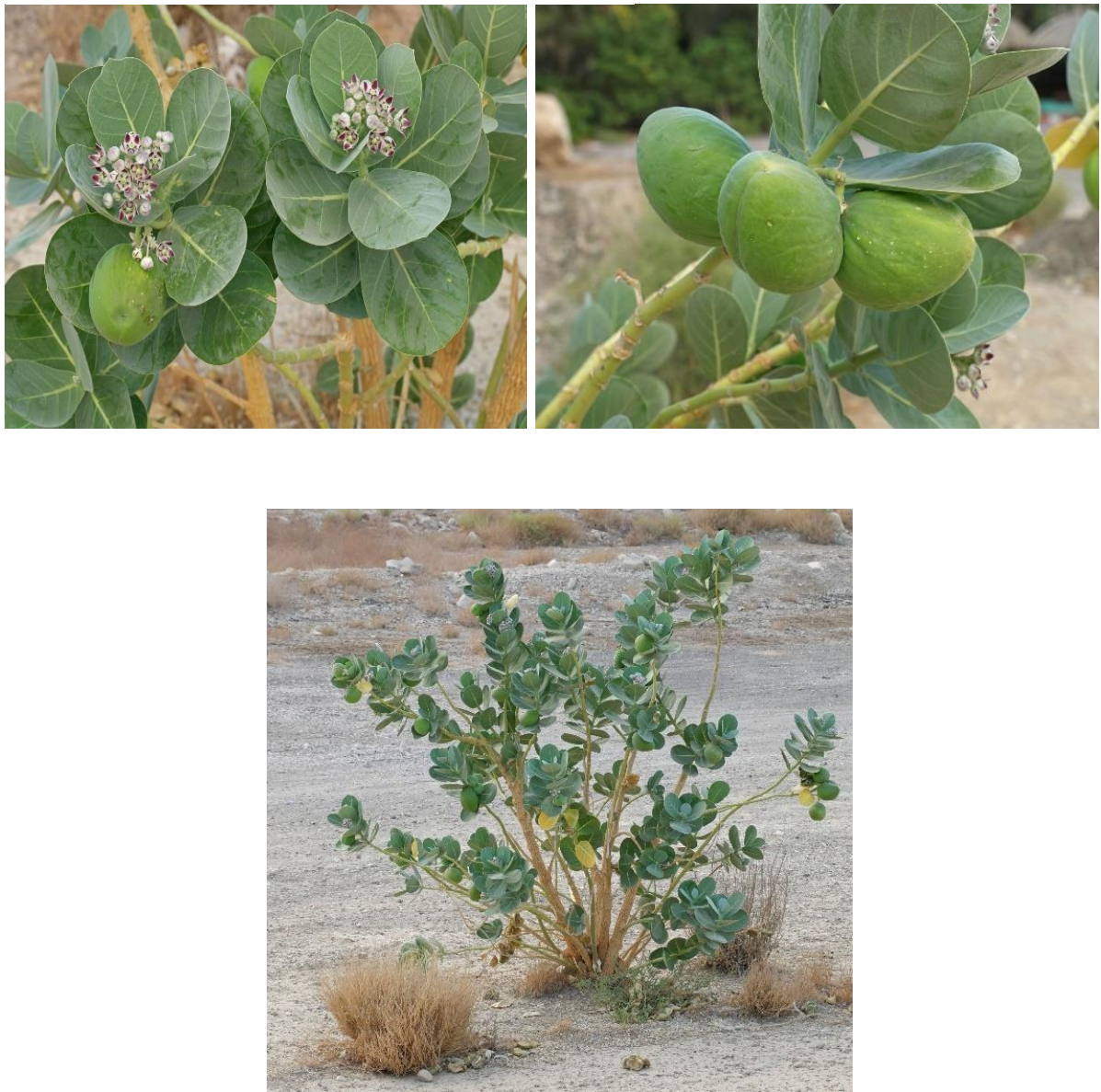
Esta espécie é muito encontrada em regiões semiáridas do mundo, muito utilizada na medicina popular indiana (CHUNDATTU et al., 2016). Os estudos realizados sobre o látex da *C. procera* tem corroborado para afirmação que o látex da *C. procera* possua atividades biológicas contra insetos (FREITAS et al., 2007) e microrganismos (NENAAH, 2013; ALI et al., 2014; MOHAMED et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2016), ação antibacteriana (LARHSINI et al., 1999), contra larvas de *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuide) (RAMOS et al., 2007; RAMOS et al., 2009) e contra fungos fitopatogênicos (*Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*) já foram descritas (SOUZA, 2011).

Uma série de proteínas foram isoladas do látex da *C. procera* (ALENCAR et al., 2006; RAMOS et al., 2009). Particularmente, a atividade proteolítica endógena de enzimas que estão presentes no látex de *C. procera* parece estar relacionada com sua ação antifúngica, uma vez a inibição dessas enzimas reduziu o poder antimicrobiano (SOUZA, 2011). O cultivo da planta contribui para a melhoria das condições do solo e pode servir também como fonte de renda para comunidades das regiões áridas. Segundo DEISE AUR (2022), além de fornecer fibras têxteis, contribuindo para a economia local, *C. procera* fornece outros produtos como: forragem e alimentos para animais de pasto, repelentes de insetos e fertilizantes naturais. A eficácia e as utilidades dessa planta, que as fibras da *C. procera* possuem as mesmas qualidades da seda de origem animal.

Outras atividades farmacológicas descritas para proteínas do látex de *C. procera* incluem: atividade hemolítica (SINGH et al., 2000), anti-inflamatória (ALENCAR et al., 2004), pró-inflamatória (RAMOS et al., 2012), antitumoral (OLIVEIRA et al., 2007), antidiabética (KAZEEM et al., 2016), antioxidante e antiapoptótica (SAYED et al.,

2016) e efeito hipocolesterolêmico (PATIL et al., 2016). Preparações com a casca do caule de algumas espécies de *Calotropis* também foram descritas como eficazes contra convulsões e a infusão 15 de flores foram usadas para tratamento de epilepsia (SHILPKAR et al., 2007). Resultados anteriores encontrados na literatura também já mostraram o potencial anti-inflamatório e citotóxico de proteínas do látex contra células cancerígenas (VIANA et al., 2017).

Figura 2 - Planta Medicinal *Calotropis procera*



Fonte: Google Imagens

O conjunto de proteínas solúveis do látex de *C. procera* (LP) tem sido estudado em relação aos seus efeitos na imunidade antimicrobiana. Por exemplo, LP não foi capaz de inibir o crescimento de *Salmonella* in vitro, mas uma fração proteica obtida a partir de LP (LPp3) diminuiu a mortalidade de camundongos Swis infectados (SOUZA et al., 2020). Assim, há perspectiva da descoberta de novos princípios ativos que possam auxiliar no tratamento de infecções sistêmicas intracelulares, uma vez que tais microrganismos são menos expostos a ação de antimicrobianos.

Considerando que as proteínas de *C. procera* parecem não possuir ação antimicrobiana direta contra bactérias, os mecanismos antiinfeciosos parecem estar relacionados à ativação/modulação da resposta imunológica.

2.4 Infecções Bacterianas

As infecções bacterianas podem ser causadas por bactérias Gram-positivo e por bactérias Gram-negativo (ROGERS et al., 2011). Quando se inicia o processo de infecção bacteriana começa a ser desenvolvido interações complexas entre o microrganismo e o hospedeiro (VAN DER POLL, OPAL, 2008; JONG et al., 2012).

Durante um quadro de infecção generalizada ou como denominamos de sistêmica, pode ocorrer uma alteração no controle local, e como consequência a disseminação bacteriana e desenvolvimento de uma resposta inflamatória sistêmica associada à falência múltipla dos órgãos, ocorrendo então um quadro clínico que conhecemos como sepse (JONG; VAN DER POLL; WIERSINGA, 2010; VAN DER POLL, OPAL, 2008; ALVES-FILHO et al., 2005). Durante o processo de infecção sistêmica, possivelmente acredita-se que ocorre um impedimento do sistema imune através de falhas na imunidade inata (COHEN, 2002). Consequentemente existirá uma falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso possivelmente devido a uma diminuição do rolamento e da adesão dos neutrófilos nas células endoteliais (BENJAMIM; FERREIRA; CUNHA, 2000; ALVES-FILHO et al., 2008). Esta “falência” da migração de neutrófilo está combinada com a captura inadequada destas células pelo fígado (ALVES-FILHO et al., 2008) e é mediada pelos altos níveis de citocinas que induzem a produção sistêmica de óxido nítrico (BENJAMIM; FERREIRA; CUNHA, 2000; ALVES-FILHO et al., 2005). A concentração de citocinas, quimiocinas e óxido

nítrico aumenta significativamente durante a infecção sistêmica (ALVES-FILHO et al., 2005; ALVES-FILHO et al., 2008) e a produção excessiva destes mediadores são eventos críticos que resultam no impedimento da migração de neutrófilos para os sítios da infecção (ALVES-FILHO et al., 2005).

O óxido nítrico é considerado uma molécula com propriedades tanto protetoras como deletérias, dependendo da quantidade liberada (SANTIAGO et al., 2000; FLORA-FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). Ele é responsável por vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, modulação da adesão dos leucócitos no endotélio (BOGDAN, 2001), diapedese dos neutrófilos e faz parte da primeira linha de defesa do organismo com poder microbicida (FLORAFILHO; ZILBERSTEIN, 2000). Entretanto, o alto nível de óxido nítrico produzido por macrófagos, neutrófilos ou outras células ativadas pode diminuir a permeabilidade vascular, induzir à disfunção cardíaca, característica da síndrome de resposta inflamatória sistêmica, e ser tóxico para microrganismos, parasitas ou células tumorais (FLORA-FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

2.5 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Sor. Typhimurium

A *Salmonella* spp. é uma bactéria entérica responsável por graves infecções e intoxicações alimentares, sendo um dos principais agentes envolvidos em surtos registrados em vários países (SHINOHARA et al.; 2008). Pertencente à família Enterobacteriaceae, no qual agrupa microrganismos gram-negativos, e anaeróbios facultativos (TORTORA, 2016). O lipopolissacarídeo (LPS), um glicolípido, é um dos principais componentes da membrana celular das bactérias Gram-negativas, tais como *S. Typhimurium*. O LPS, também conhecido como endotoxina, responde em parte pelo potencial de virulência e patogênese desse grupo de organismos uma vez que provoca forte reação inflamatória (GALLAY et al., 1993).

O gênero *Salmonella* abriga mais de 2000 sorotipos, e tem como seu habitat natural o trato intestinal de humanos e animais (DUARTE et al., 2010). Dentre patógenos humanos e animais, *S. enterica* Sor. Typhimurium é comumente associada com gastroenterites de origem alimentar, servindo de modelo para estudo da febre tifoide em animais de laboratório, uma vez que provoca em roedores os mesmos sintomas causados por *S. enterica* Sor. Typhi em seres humanos.

Salmonella spp. são importantes patógenos com relação ao consumo de alimentos contaminados em todas as regiões do mundo (HAVELAAR et al., 2015), apresentando maior impacto em relação à saúde humana em comparação com outras bactérias que causam infecção alimentar (KIRK et al., 2015; SCALLAN et al., 2015). Uma estimativa que fora levantada sobre a Epidemiologia da Carga de Doenças Transmitidas por Alimentos, o grupo de referência 17 da OMS sugeriu que o gênero *Salmonella* são os patógenos associados à maior número de mortes por doenças transmitidas por alimentos (HAVELAAR et al., 2015).

Uma ampla variedade de alimentos pode ser contaminada com a *Salmonella* spp., mas particularmente àqueles que possuem alto teor de umidade, proteína e carboidratos, como carne bovina, suínos, aves, ovos, leite e derivados, frutos do mar e sobremesas recheadas são mais susceptíveis à deterioração (SHINOHARA et al., 2008). Portanto, após a ingestão de alimento contaminado, a bactéria deve ser capaz de sobreviver ao pH estomacal, aderir-se ao intestino delgado, onde a infecção pode ser estabelecida (MULLER et al., 2009). Além do pH, as bactérias também conseguem resistir à barreira ciliar, à microbiota intestinal, entre outros fatores que contribuem para a defesa do organismo.

A maneira como a salmonelose altera o metabolismo do hospedeiro acaba por ser crucial para a progressão da doença, provocando desde gastroenterites autolimitadas a infecção sistêmica (RIVERA-CHAVEZ E BAUMLER, 2015). Como consequência, os sorotipos de *Salmonella* spp. infectam vários tipos de hospedeiros, incluindo diferentes espécies animais e humanos (UZZAU et al., 2000), o que significa que a bactéria tem grande capacidade de adaptação ambiental.

Particularmente, após a absorção oral de alimentos contaminados, a *S. Typhimurium* invade os enterócitos no intestino do hospedeiro (COLLAZO e GALAN, 1997). As infecções geralmente se iniciam de 6 a 12 horas após a ingestão de alimento contaminado, quando a *Salmonella* percorre todo o sistema digestivo chegando ao estômago, onde é sensível ao ácido estomacal (RUBY et al., 2012). Os microrganismos sobreviventes chegam ao intestino, passando para o íleo e cólon distal. No íleo, a bactéria pode se translocar do lúmen intestinal para a lâmina própria, através de célula M, alcançando o sistema imune associado a mucosa (MALT). Macrófagos presentes no local fagocitam a bactéria, que é capaz de escapar do

fagolisossomo e multiplicar no citoplasma. Os macrófagos infectados levam a bactéria através da corrente sanguínea até o baço e fígado, onde a mesma se dissemina ocasionando quadros de choque septicêmico que pode levar ao óbito (WORLEY et al., 2006).

As bactérias também podem se disseminar livres na corrente sanguínea, sendo absorvidas pelos nódulos linfáticos, atingindo o sistema retículo endotelial (RES), onde provocará a infecção intracelular disseminada em macrófagos que não foram ativados (RICHTER-DAHLFORS et al., 1997), podendo atingir outros órgãos. Alguns indivíduos infectados também podem se tornar portadores assintomáticos por meses ou anos, realizando papel importante para a manutenção e disseminação da doença, uma vez que, estes se apresentam como fonte contínua de transmissão (CARVALHO et al., 2021).

Finalmente, a proteção do organismo contra salmonelose envolve a participação de macrófagos, que são ativados em resposta a componentes microbianos e da sinalização de 18 receptores do tipo Toll-like (TLR). Estas células produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , além de óxido nítrico. Macrófagos e células dendríticas secretam tais citocinas e também apresentam antígenos para linfócitos T-CD4+, ativando a imunidade adaptativa (VARELLA e FORTE, 2001, KALUPAHANA et al., 2005, ABBAS, 2008, NG et al., 2011).

Muito embora uma série de mecanismos imunes limitem a propagação da infecção por *Salmonella*, os sintomas de infecções sistêmicas podem debilitar rapidamente o hospedeiro (WORLEY et al., 2006). Considerando também que a quantidade de cepas bacterianas que apresentam resistência aos antimicrobianos tem aumentado em todo o mundo, portanto, existe uma necessidade de estratégias de tratamento mais eficazes contra essas infecções.

2.6 TGF- β

TGF- β é uma importante citocina multifuncional que é expressa em muitos tipos de células diferentes no intestino, incluindo células epiteliais, fibroblastos e mononucleares. Regula um conjunto diversificado de respostas celulares, como crescimento e proliferação celular, diferenciação celular, produção de matriz extracelular, reparo tecidual e imunomodulação (XU, X et al., 2018).

O nome TGF- β deriva da atividade transformadora da citocina, que induz o crescimento independente de ancoragem quando administrado às células junto com EGF, um polipeptídeo envolvido na proliferação celular e no crescimento e diferenciação de diferentes órgãos (ROBERTS et al., 1981).

Todos os membros da família TGF- β são codificados por polipeptídeos precursores muito maiores cujas sequências foram deduzidas por clonagem de cDNA. Os polipeptídeos precursores são compostos de três segmentos: um peptídeo sinal amino-terminal que é removido durante a translocação da proteína para o lúmen do retículo endoplasmático rugoso, um grande segmento precursor ou pro segmento e o polipeptídeo monomérico da família TGF- β carboxi-terminal. Para a proteína da família TGF- β ativa e totalmente madura (112 resíduos de aminoácidos no caso de TGF- β). Os pro-segmentos variam em comprimento de 150 a 450 resíduos e notavelmente não são conservados em sequência entre os membros da família TGF- β , mesmo entre as três isoformas apresentadas de TGF- β . (DERYNCK R et al., 1988).

O TGF- β atua como uma potente citocina imunossupressora através de efeitos tanto na diferenciação celular quanto na proliferação celular. Por exemplo, TGF- β inibe a proliferação de linfócitos T (KEHRL et al.; 1986). Alguns estudos relatam que TGF- β s demonstraram promover o processo de cicatrização de feridas *in vivo* (MENG et al.; 2016).

TGF- β pode induzir células T reguladoras/inibitórias e pró-inflamatórias, dependendo da presença de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 (SANJABI et al., 2009). Alguns achados demonstraram que *Salmonella* provoca alterações na sinalização de TGF- β 1, no processo de infecção a *salmonella* invade íleo visando as placas de Peyer, foi possível através de análises na região verificar as vias de sinalização do TGF- β que sofreram alterações após a infecção sistêmica (ZANG et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Explorar o potencial curativo de peptidases do látex da *Calotropis procera* em modelos de infecção por *S. Enterica* Sor. Typhimurium.

3.2 Específicos

- Determinar as dosagens atóxicas de uma mistura de peptidases cisteínas, denominada LPp3, em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss;
- Avaliar se LPp3 possui ação antibacteriana direta contra *S. Typhimurium* C5;
- Avaliar LPp3 na conservação da viabilidade celular de culturas de macrófagos peritoneais infectadas com *S. Typhimurium*;
- Avaliar o efeito da administração de LPp3 sobre a eliminação de bactérias do fígado e baço em camundongos Swiss previamente infectados com *S. Typhimurium*;
- Avaliar o efeito da administração de LPp3 sobre o recrutamento de leucócitos, após o desafio infeccioso com *S. Typhimurium*, via intraperitoneal, de camundongos Swiss; Avaliar a expressão gênica das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-10 no baço de camundongos Swiss infectados com *S. Typhimurium* e tratados com LPp3.

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.

4.1 Camundongos Swiss

Camundongos Swiss fêmeas adultas (n = 20) com peso de 30-35g (4-6 semanas de idade) foram obtidos do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco. Os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia e Imunologia- LAMIM da UFRPE. Os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso à água e ração comercial, com iluminação controlada em ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura ambiente variando de 23° a 25°C.

Para os procedimentos experimentais envolvendo animais foi solicitada uma licença ao Comitê de Ética e Uso Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco CEUA/UFRPE (Licença nº 8480121120). Todos os experimentos foram realizados de acordo com critérios internacionais de ética experimental.

4.2 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%.

4.3 Obtenção da fração proteica LPp3

A subfração proteica LPp3 foi obtida segundo o protocolo descrito por Alencar et al., (2006). O látex foi coletado das partes aéreas da planta diretamente em água destilada estéril para obtenção de uma diluição 1:2 (v/v). As amostras foram centrifugadas a 5000xG por 10 minutos a 10°C e o sobrenadante foi submetido à diálise em água destilada (ALENCAR et al., 2004). A fração retida na membrana de diálise (LP) foi submetida à cromatografia de troca iônica numa coluna de fluxo rápido (CM-Sephadex), com o objetivo de produzir a fração proteica que foi explorada neste

trabalho (LPp3) (RAMOS et al., 2009). Ensaio com N-benzoil-arginina-naftilamida (BANA) foram utilizados para confirmar a atividade enzimática de LPp3.

4.4 Obtenção de macrófagos peritoneais

Para a obtenção dos macrófagos peritoneais e realização de ensaios *ex vivo*, camundongos fêmeas foram eutanasiados por meio de sedativo inalatório isoflurano. Depois de verificada a morte do animal, o camundongo 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 20 mL, foi injetado 10 mL de meio de cultura RPMI pré-aquecido a 37°C, adicionados antibióticos penicilina e estreptomicina, 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 1 mL, através de pequena incisão realizada no peritônio. Uma alíquota do fluido peritoneal, aproximadamente 20 µL, 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 1×10^6 cél./ mL, com realização de diluição com meio RPMI a 37°C com antibióticos penicilina e estreptomicina. A seguir, 0,2 mL de fluido peritoneal na concentração 1×10^6 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. A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer e a viabilidade celular analisada com corante azul de trypan.

4.5 Ensaio com macrófagos infectados por *S. Typhimurium*

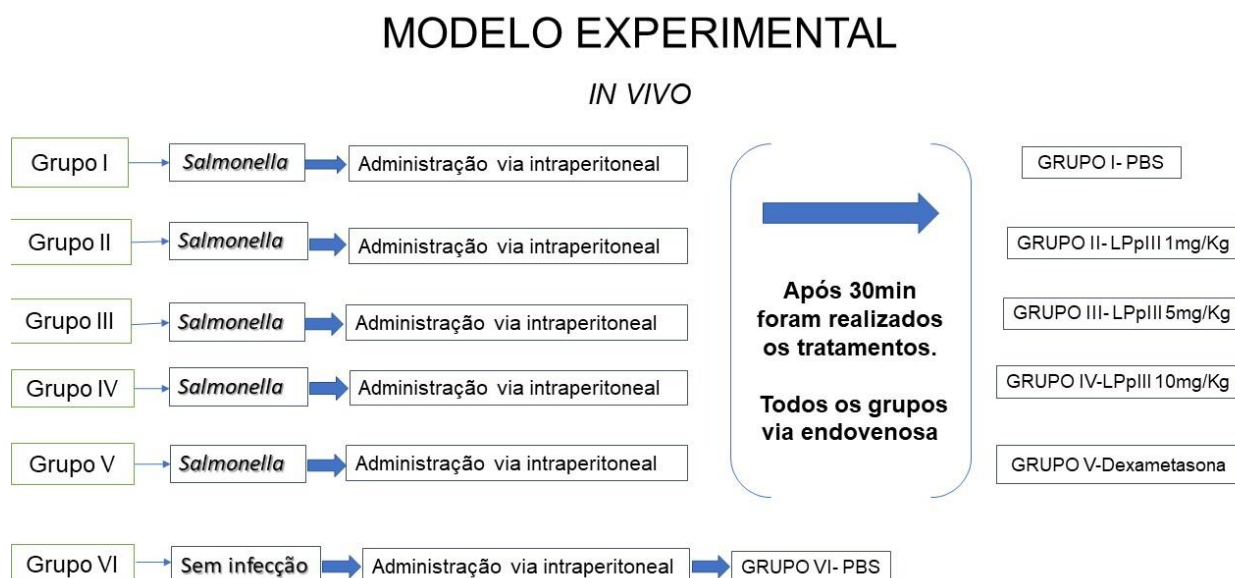
A fim de realizar infecção dos macrófagos peritoneais, a cepa virulenta de *S. Typhimurium* que estavam mantidas congeladas a -20°C em glicerol 10% foram ativadas. Antes de reativá-las as cepas foram testadas em meio Ágar Mac Conkey para verificar se as bactérias se encontravam puras. Para reativação das bactérias, 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°C e mantida em estufa a 37°C, overnight. No dia seguinte, 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 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet bacteriano foi ressuspenso em 5 mL de meio RPMI sem antibióticos pré-aquecido a 37° C, e as culturas foram ajustadas em espectrofotômetro a 630 nm, considerando a densidade 23 óptica de 0.5 correspondente a 10^8 UFC/ mL. Nos ensaios as placas de poliestireno de 96 poços, fundo chato, suspensões com os macrófagos (1×10^6 cél./ml) foram adicionadas em placas de 96 poços. foram infectados com 1×10^6 UFC/mL de *S. Typhimurium* durante o período de 4 horas. Os macrófagos foram mantidos em estufa para cultura celular a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. 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° para remoção de excesso bacteriano. A seguir foi adicionado aos poços 0,2 mL de meio RPMI contendo gentamicina (100µg/mL), com a finalidade de causar morte das bactérias que ainda ficaram no meio extracelular, durante uma hora em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Passado este tempo, os macrófagos foram novamente lavados com PBS e aos poços foram adicionados LPp3 nas concentrações de 0,78 1,56 3,125 6,25 12,5 25 50 e 100 µg/ml por 24h e suspensos em RPMI, contendo gentamicina (10 µg/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 LPPIII foram incubadas em estufa para cultivo celular durante 24 horas em atmosfera de 37°C e 5% de CO₂.

4.6 Efeito da LPp3 em camundongos Swiss infectados com *S. Typhimurium*

O método foi adaptado de Almeida et al., (2021): camundongos Swiss (n = 3 por grupo) foram inoculados intraperitonealmente com *S. Typhimurium* (0,2 ml, 1×10^6 UFC/mL). Após 30 minutos, os animais receberam LPp3 dissolvida em PBS estéril (0,2 ml; 1 mg/kg, 5 mg/kg ou 10 mg/kg), por via intravenosa. Os camundongos do grupo controle receberam 0,2 ml dexametasona (Dexa; 0,5 mg por camundongo) (Laboratório Aché, Brasil). Os animais foram eutanasiados 6 horas após a infecção. Os pMØ foram colhidos, e a viabilidade celular e a carga bacteriana intracelular conforme demonstrado no esquema na figura 3.

Figura 3 - Fluxograma da experimentação



4.7 Quantificação de unidades formadoras de colônias em órgãos-alvo

Os baços e fígados dos animais foram removidos assepticamente e as suspensões desses órgãos foram submetidos a diluições decimais seriadas e semeados em placas de ágar Mueller Hinton pelo método pour plate. Após um período de incubação a 37 °C por 24 h, as unidades formadoras de colônias foram quantificadas. Os resultados foram expressos em UFC/g ou mL.

4.8 Análise Contagem dos Leucócitos

Alíquotas de 20 µL de sangue ou líquido peritoneal foram homogeneizadas com 380 µL de reagente de Turk (Vetec, Brasil) para contagem total de células leucocitárias em uma câmara de Neubauer usando um microscópio óptico. A contagem diferencial foi realizada a partir de esfregaços corados com eosina-metilenoblue-Giemsa, a contagem total de leucócitos foi seguida da contagem diferencial de células neutrófilas, basófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos. Os resultados foram expressos como 10^3 células por mililitro de plasma ou fluido (Souza & Ferreira, 1985). Todas as lâminas foram analisadas por um único patologista que desconhecia os

grupos experimentais. 25 4.7 Efeito da LPp3 na expressão gênica de citocinas inflamatórias Após tratamentos com a LPp3, uma fração dos baços de camundongos Swiss infectados com *S. Typhimurium* foram submetidos à lise celular com o reagente TRI (Sigma-Aldrich/Merck, EUA). O RNA total de um fragmento do baço dos animais submetidos aos ensaios, tratados ou não com LPp3, foi extraído de acordo com Nascimento et al. (2016). O RNA total foi usado para a construção do cDNA usando a enzima de transcrição reversa do vírus da leucemia murina Moloney (M-MLV) (Sigma-Aldrich/Merck, EUA). RT-qPCR foi realizada de acordo com as instruções de uso do SYBR-Green/Kit RT-PCR quantitativo (Sigma-Aldrich/Merck, EUA). Primers específicos para amplificação das citocinas interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 10 (IL-10) foram usadas em tempo real (RT-PCR) (BATISTA et al., 2017). As PCRs (25 μ L) foram realizadas da seguinte forma: 40 ciclos a 95 C/15 s seguidos por 60 C/60 s (Q série Rotor Gene - Qiagen). Os dados foram analisados de acordo com Dussault e Pouliot (2006). O controle interno de amplificação foi feito utilizando-se primers para amplificação da proteína Actina (ACT).

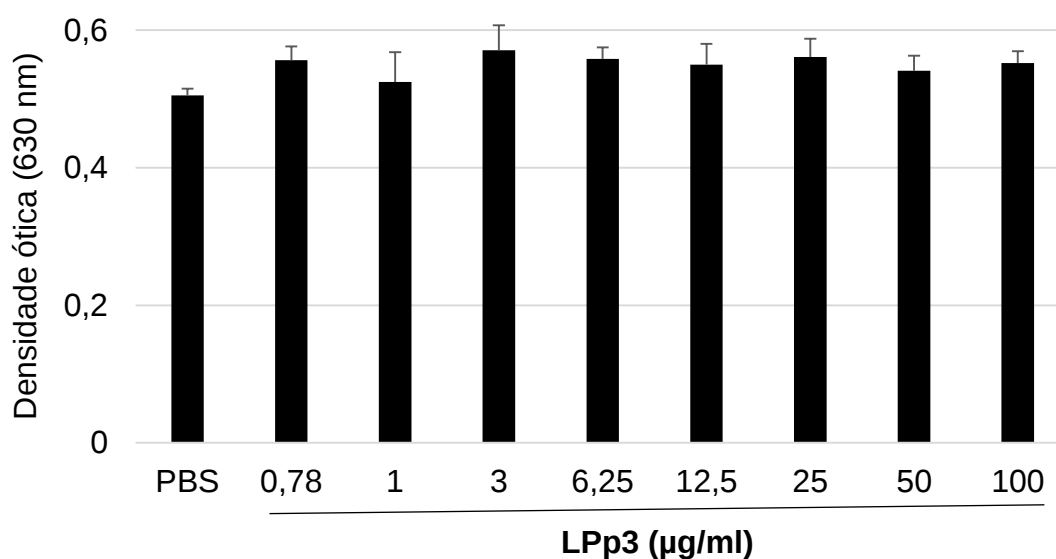
4.9 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para a comparação das médias de grupos foi utilizado o Test "t" de Student. Todos os testes foram realizados com intervalo de confiança de 95% através do programa GraphPad (Domatics®)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram realizados testes para avaliar se as enzimas presentes em LPp3 possuíam ação antibacteriana contra *S. Typhimurium*. Os dados mostraram que a exposição de uma cultura bacteriana do patógeno por 24h às enzimas de *C. procera* não produziu inibição do crescimento até a concentração máxima testada de 100 µg/ml, sendo as densidades óticas registradas semelhante ao grupo PBS ($P > 0,05$) (Fig. 4)

Figura 4 - :Ensaio de ação antimicrobiana direta de LPp3 contra processo de infecção por *Salmonella enterica* Sor.Typhimurium.

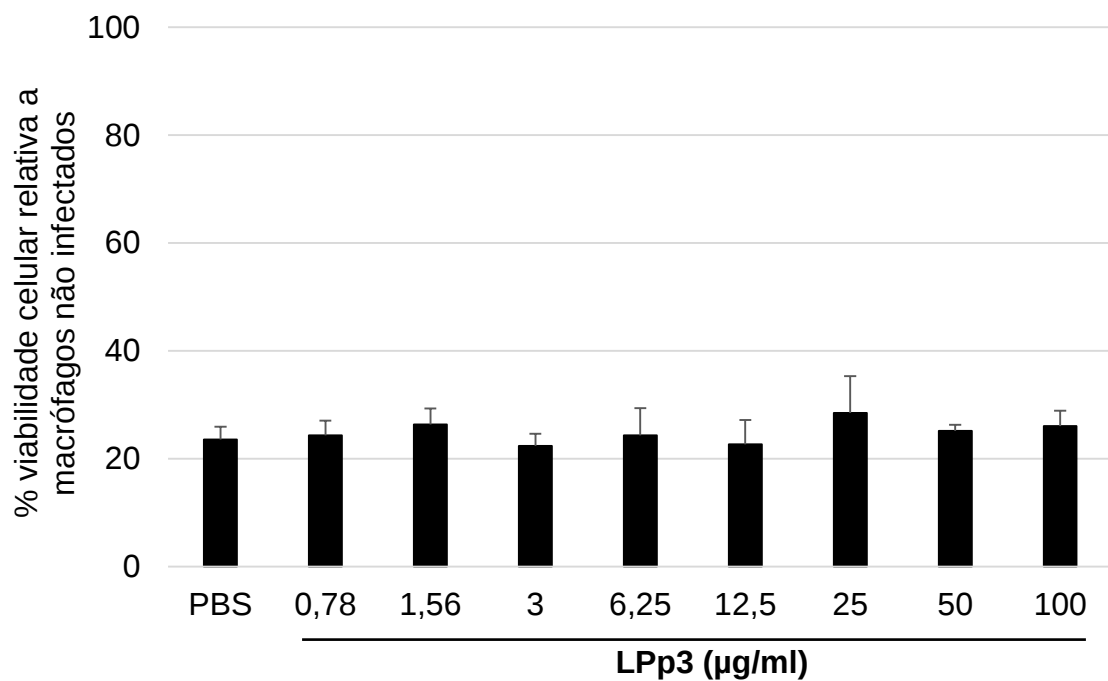


Cabe ressaltar que ensaios anteriores realizados com as frações proteicas LPp1 e LPp2, esta última rica em peptidases cisteínicas, também demonstram a ausência de atividade bacteriana direta contra *Listeria monocytogenes* ou *S. Typhimurium* (NASCIMENTO et al., 2016; TAVARES et al., 2021). Portanto, as peptidases encontradas no látex de *C. procera*, parecem exercer suas ações anti-infecciosas devido a uma modulação da resposta imune que pode alterar o curso de uma infecção.

Considerando a hipótese de que as peptidases presentes em LPp3 pudessem ativar a capacidade bactericida intracelular de macrófagos infectados com *Salmonella*, diferentes concentrações das enzimas foram utilizadas nos tratamentos dessas. Foi observado que a infecção produzida por *S. Typhimurium* diminuiu em aproximadamente 80% a viabilidade dos macrófagos, de forma semelhante ao observado no grupo PBS não tratado ($P > 0.05$) (Figura 5) não havendo, portanto, benefício dos tratamentos com LPp3 contra a infecção. Em estudo anterior de Sousa et al., (2020), LPp3 (5 e 10 mg/kg) foi administrada 24 h antes do inóculo intraperitoneal com *S. Typhimurium* C5.

Tal protocolo demonstrou que a dosagem de 5 mg/kg de LPp3 produziu maior sobrevivência (70%) e população bacteriana diminuída em órgãos alvos da infecção, sendo este processo acompanhado de aumento de IL-10 e redução de óxido nítrico no sangue dos animais tratados. Apesar dos benefícios observados, tais dados parecem não refletir de maneira realista o potencial “curativo” ou anti-infeccioso de LPp3 contra a salmonelose sistêmica. Assim, um novo desenho experimental foi proposto.

Figura 5- Viabilidade celular de macrófagos peritoneais infectados com *S. Typhimurium* e tratados com LPp3. Houve uma diminuição em aproximadamente 80% a viabilidade dos macrófagos, de forma semelhante ao observado no grupo PBS não tratado com Lpp3.



Neste estudo, camundongos Swiss foram primeiramente infectados, via intraperitoneal, e, a seguir, tratados com LPp3, via endovenosa. Considerando que as primeiras horas após o inóculo de *Salmonella* são cruciais para o desenvolvimento de uma infecção sistêmica, os efeitos de LPp3 sobre a imunidade inata e processo inflamatório foram investigados. Foi possível observar que, após 6 h do inóculo infeccioso, *Salmonella* já havia alcançado o baço e o fígado dos animais em populações superiores a 10^5 unidades formadoras de colônias por órgão, confirmando sua virulência. Foi possível observar que os tratamentos com LPp3 na concentração de 10 mg/kg (mas não 1 ou 5 mg/kg), produziram um aumento da carga bacteriana no baço e fígado dos animais tratados (Tabela 1). Tal resultado sugeriu que essa dosagem de proteínas administrada induziu uma ação anti-inflamatória que tornou os animais mais susceptíveis à infecção disseminada.

Anteriormente, Tavares et al., (2021), que investigaram as peptidases cisteínicas de *C. procera* presentes na subfração LPp2, demonstraram que camundongos Swiss administrados com tais proteínas na dosagem de 10 mg/kg, via endovenosa, tiveram amplo dano histológico no baço e fígado que foi associado com a grande carga bacteriana de *S. Typhimurium*. Nossos dados confirmaram que LPp3 produziu ação anti-inflamatória semelhante a LPp2 em todas as dosagens testadas, diminuindo a infiltração de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos desafiados com *Salmonella* (Fig.6). Tal efeito foi semelhante àquele observado com a administração de dexametasona em animais controles infectados e também animais saudáveis não infectados. A análise dos tipos de leucócitos no peritônio dos animais, demonstrou que os tratamentos com LPp3 inibiram principalmente a infiltração de neutrófilos e linfócitos, particularmente na dosagem de 10 mg/kg (Tabela 2).

Tabela 1. População bacteriana em órgãos alvos de camundongos Swiss infectados com *Salmonella* e tratados com LPp3.

	Log ₁₀ UFC	
	Baço	Fígado
PBS	5,51 ± 0,07	5,71 ± 0,06
Dexametasona	5,87 ± 0,58	5,67 ± 0,21
LPp3, 1 mg/kg	5,50 ± 0,07	5,48 ± 0,10
LPp3, 5 mg/kg	5,27 ± 0,22	5,95 ± 0,52
LPp3, 10 mg/kg	6,33 ± 0,33 *	6,42 ± 0,23 * #

* P < 0,05, comparação em relação ao grupo PBS; # P < 0,05, comparação em relação ao grupo Dexametasona.

Figura 6 - População de leucócitos totais na cavidade peritoneal de camundongos Swiss após 6 h de infecção por *S. Typhimurium* e tratamento com LPp3. (* $P < 0,05$), comparação em relação ao grupo PBS infectado sem o tratamento com LPp3.

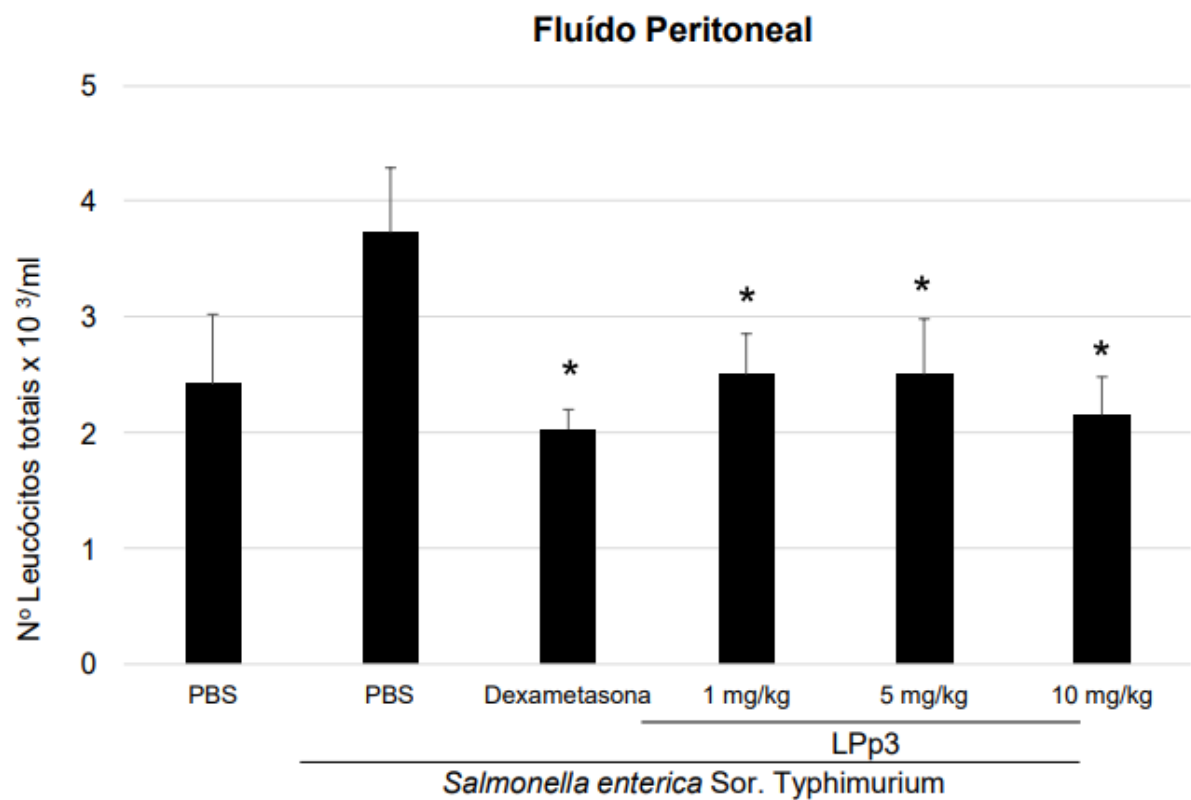


Tabela 2. Quantidade de leucócitos no fluído peritoneal e sangue de camundongos Swiss infectados com *S. Typhimurium* e tratados com as peptidases LPp3 de *C. procera*. É possível observar nos grupos com tratamento na maior dosagem da LPp3 baixa quantidade de neutrófilos no fluido e maior quantidade no sangue, ou seja, os tratamentos inibiram a migração de leucócitos do sangue para o peritônio.

Número de células x 10 ³ /mm ³						
		Neutrófilo	Linfócito	Monócito	Eosinófilo	Basófilo
Grupos		Fluído peritoneal				
Salmonella	Saudável	0.13 ± 0.01	1.73 ± 0.63	0.05 ± 0.06	0.03 ± 0.03	0.19 ± 0.08
	PBS	0.48 ± 0.08	2.79 ± 0.34	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.45 ± 0.63
	DEXA, 0.5 mg/animal	0.10 ± 0.04 *	1.61 ± 0.37 *	0.03 ± 0.06	0.00 ± 0.01	0.05 ± 0.04
	LPp3, 1 mg/kg	0.29 ± 0.12	2.07 ± 0.33 *	0.04 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.11 ± 0.10
	LPp3, 5 mg/kg	0.24 ± 0.23	2.13 ± 0.55	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.03 ± 0.01
	LPp3, 10 mg/kg	0.06 ± 0.03 *	2.02 ± 0.32 *	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.06
		Sangue				
Salmonella	Saudável	0.40 ± 0.23	2.35 ± 0.61	0.11 ± 0.06	0.09 ± 0.06	0.03 ± 0.02
	PBS	0.09 ± 0.09	4.88 ± 3.74	0.02 ± 0.04	0.18 ± 0.04	0.01 ± 0.02
	DEXA, 0.5 mg/animal	0.36 ± 0.11 *	2.51 ± 0.53	0.05 ± 0.02	0.20 ± 0.10	0.05 ± 0.02
	LPp3, 1 mg/kg	0.21 ± 0.18	4.42 ± 0.98	0.14 ± 0.08	0.05 ± 0.08	0.12 ± 0.04
	LPp3, 5 mg/kg	0.88 ± 0.23 *	2.56 ± 0.61	0.29 ± 0.14 *	0.32 ± 0.18	0.23 ± 0.12
	LPp3, 10 mg/kg	0.96 ± 0.10 *	2.97 ± 0.85	0.43 ± 0.05 *	0.23 ± 0.15	0.19 ± 0.13

* $P < 0,05$, comparação em relação ao grupo PBS infectado

Os dados acima são corroborados pelo fato de que a quantificação de neutrófilos no sangue dos animais tratados com LPp3 foi significativamente maior que no grupo PBS infectado (Tabela 2), ou seja, os tratamentos inibiram a migração de leucócitos do sangue para o peritônio, sítio do inóculo infeccioso com *Salmonella*. O mesmo não foi observado com a quantificação de linfócitos no sangue. Sousa et al., (2020) havia demonstrado que o inóculo de LPp3 no peritônio de camundongos não infectados induziu a infiltração de neutrófilos.

Assim, foi possível sugerir que, ao se desafiar com *Salmonella* (via intraperitoneal) animais previamente tratados com LPp3, já haviam no sítio infeccioso neutrófilos, cuja a ação fagocítica teria sido responsável pela diminuição na carga bacteriana local e no sangue nas primeiras 24h de infecção. Contudo, a via de administração de LPp3 e o protocolo usado no presente estudo difere daquele usado por Sousa et al., (2020), de forma que não pudemos assumir que LPp3 teria efeito inflamatório. De fato, como discutido acima, nossos dados sugeriram um efeito anti-inflamatório de LPp3 quando a mesma é administrada de forma endovenosa após o início da infecção intraperitoneal.

Na tentativa de determinar alguns dos possíveis mecanismos imunes envolvidos e considerando a importância de mediadores inflamatórios na imunidade inata, os níveis de expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa e IL-6 e da citocina anti-inflamatória IL-10 foram determinados de forma semiquantitativa por RT-PCR tempo real. Os dados demonstraram que as dosagens de LPp3 de 1 e 5 mg/kg não influenciaram de forma significativa os níveis de expressão de TNF-alfa (Fig. 7) e IL-1-beta em relação a animais infectados e não tratados (Fig. 8).

Por outro, a dosagem de 10 mg/kg aumentou a expressão dessas citocinas mais de cem vezes. Foi possível observar que, após a infecção, a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 foi diminuída de forma semelhante em todos os grupos em relação aos animais não tratados (Fig. 9).

Figura 7- Expressão gênica de citocinas em camundongos Swiss em modelo de salmonelose experimental seguido de tratamento com LPp3. Os dados mostram que as dosagens de LPp3 de 1 e 5 mg/kg não influenciaram de forma significativa os níveis de expressão de TNF-alfa.

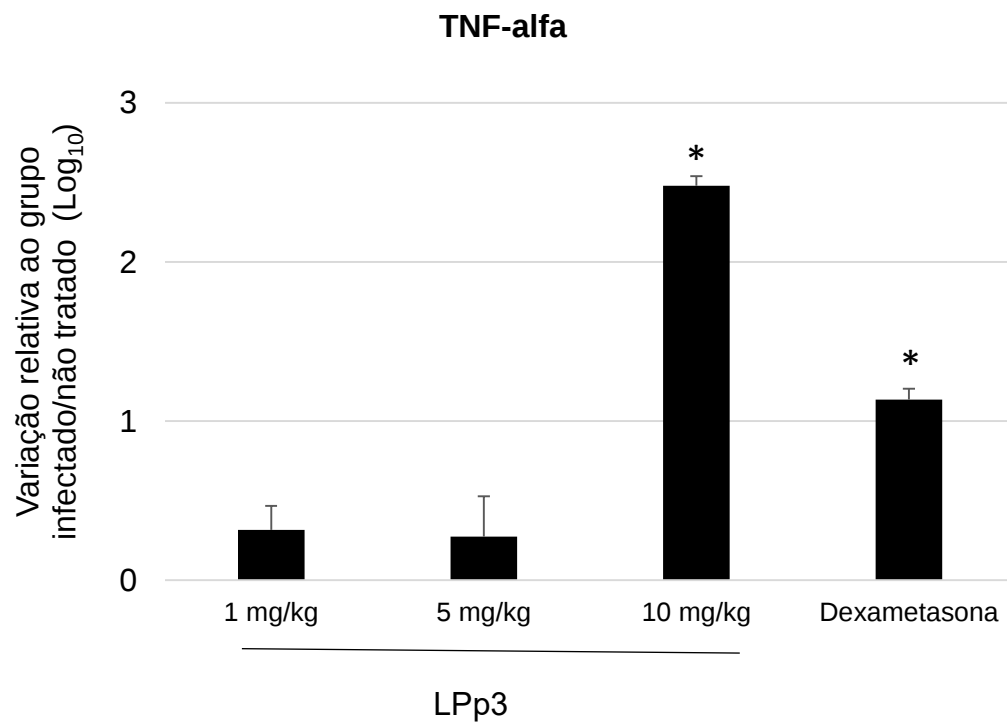


Figura 8 - Expressão gênica de citocinas em camundongos Swiss em modelo de salmonelose experimental seguido de tratamento com LPp3. Os dados mostram que as dosagens de LPp3 de 1 e 5 mg/kg não influenciaram de forma significativa os níveis de expressão de IL-beta. *

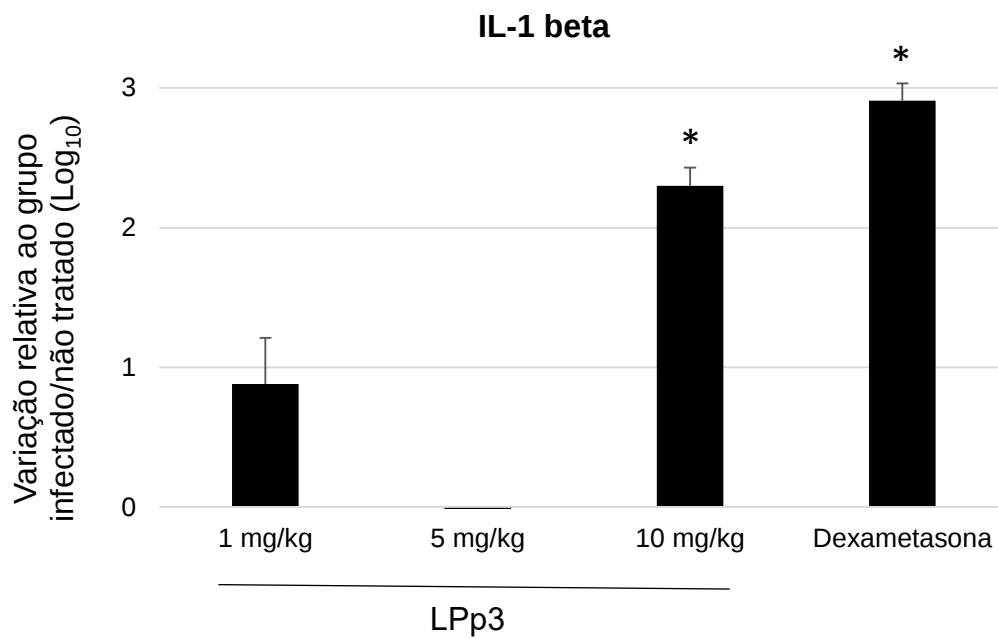
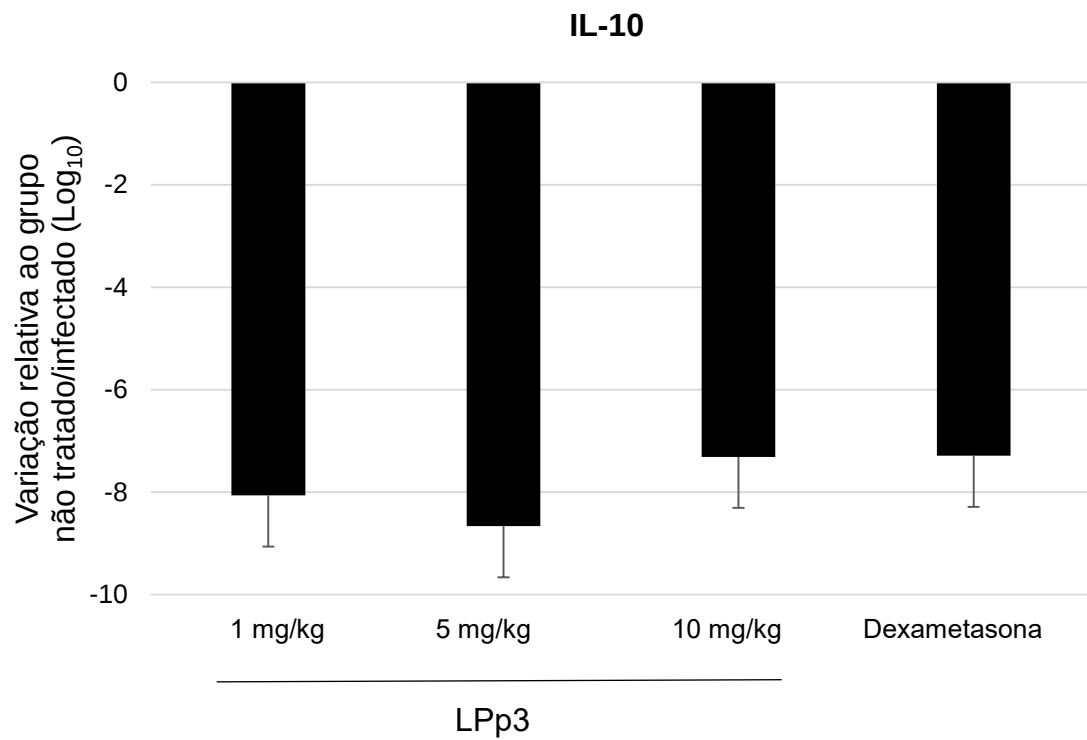


Figura 9 - : Expressão gênica de citocinas em camundongos Swiss. Observa-se que a dosagem 10 mg/kg aumentou a expressão dessas citocinas mais de cem vezes. A expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 foi diminuída de forma semelhante em todos os grupos em relação aos animais não tratados



Anteriormente, Tavares et al., (2021) demonstrou que os tratamentos com LPp2 diminuíram a expressão gênica de TNF-alfa, IL1-beta, IL-6 e também IL-10 em culturas de macrófagos estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS). Apesar de que os pesquisadores demonstraram que os tratamentos in vivo produziram uma ação anti-inflamatória após o desafio com *Salmonella*, o nível de expressão de citocinas nos camundongos não foi determinado. Já o trabalho de Sousa et al. (2020) com LPp3, demonstrou que a quantidade de TNF-alfa e IL1- beta estavam elevadas no fluido peritoneal, possivelmente devido a introdução das proteases e da bactéria no peritônio desses animais no modelo utilizado.

No entanto, nesse estudo, houve elevação dos níveis de IL-10 no sangue dos animais tratados com LPp3. No presente estudo, a expressão das citocinas TNF-alfa (Fig.7) e IL1-beta também diminuída nos animais infectados que receberam dexametasona em relação aos não tratados (Fig.8). Essa droga é um glicocorticoide anti-inflamatório esteroide que atua devido a inibição da enzima Fosfolipase A2 e consequente bloqueio da cascata do ácido araquidônico, impedindo a formação de prostaglandina, tromboxano e leucotrienos, além de reduzir o recrutamento e adesão leucocitária, o que leva a redução local de liberação de citocinas inflamatórias.

Apesar de que os efeitos da dexametasona no modelo de infecção estudado não estão claros, cabe ressaltar que a droga é indicada em dosagens altas (3 mg/kg, inicialmente, e 1 mg/kg a cada 6h até 48 h) em pacientes com febre tifoide grave (Manual MSD, 2022). Tomados juntos, os dados sugerem que a ação anti-inflamatória observada pode ter sido resultado da ativação de outros mediadores não pesquisados neste estudo, possivelmente TGF-beta.

6 CONCLUSÃO

A planta medicinal *C. procera* apresenta moléculas bioativas que têm sido isoladas e purificadas para utilização como alternativa para tratamentos de infecções. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com LPp3 produziu ação anti-inflamatória em todas as dosagens testadas, diminuindo a infiltração de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos desafiados com *Salmonella*. Este efeito não foi relacionado a elevação dos níveis de IL-10 no sangue dos animais tratados com LPp3. Os dados sugerem que a ação anti-inflamatória observada pode ter sido resultado da ativação de outros mediadores não pesquisados neste estudo, possivelmente TGF-beta.

Apesar de que tais propriedades anti-inflamatórias possam ser úteis para o manejo de processos inflamatórios derivados de infecções bacterianas, não houve benefício claro da administração de LPp3 no controle das fases iniciais da infecção por *Salmonella*.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMANN, A.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. Ed. Riode Janeiro: Elsevier, 2008.
- AGRAWAL, A. A; KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.40 p. 311-331, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120307>
- ALBUQUERQUE, T.M.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, J. G.; FIGUEIREDO, I.S.T.; TEIXEIRA, C.M.; BITENCOURT, F. S.; SECCO, D. D.; ARAUJO, E. S.; LEAO, A. M. C. A.; RAMOS, M. V. Vascular permeability, neutrophil migration and edematogenic effects induce by the látex of *Cryptostegia grandiflora*. **Toxicon**, v.53, p. 15-23, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.10.009>
- 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**, v. 55 p. 559–564, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00011-006-6025-y>
- ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; VALE, M.R.; BITENCOURT, F.S.; OLIVEIRA, J. S.; RIBEIRO, R.A.; RAMOS R.V. Anti-inflammatory effect of the látex from *Calotropis procera* in three diferente experimental models: Peritonitis, Paw EDEMA AND Hemorrhagic Cystitis. **Planta Medica**, v.70, p. 1144-1149, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-2004-835842>
- 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**, v. 27 p.1565-1569, 2014. Disponível em: researchgate.net/publication/264678996_Antibacterial_potential_of_Calotropis_procera_flower_extract_against_various_pathogens. Acesso em 05 de agosto de 2022.
- ALMEIDA, I. A., DORVIGNY, B. M., TAVARES, L., SANTANA, L. N., & LIMA-FILHO, J. V. Anti-inflammatory activity of caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) after experimental challenge with virulent *Listeria monocytogenes* in Swiss mice. **International Immunopharmacology**, v.100, p.108090. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108090>.

ALVES-FILHO, C.J.; BENJAMIM, C.; TAVARES-MURTA, B.M.; CUNHA, F.Q. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100(Suppl. I), p.223-226. 2005.

ALVES-FILHO, C.J.; FREITAS, A.; SPILLER, F.; SOUTO, F.O.; CUNHA, F.Q. The role of neutrophils in severe sepsis. **SHOCK**, v. 30 (Suppl 1), p. 3-9. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1097/shk.0b013e3181818466>

BADKE, R.M, BUDÓ, M. L. D; ALVIM, N.A. T; ZANETTI, G. D; HEISLER, E. V. Saberes y prácticas populares en el cuidado de la salud con el uso de plantas medicinales. Texto & Contexto - **Enfermagem [online]**. v.21, n.2, p. 363-70.2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-07072012000200014>:

BATISTA, J. E. C., RALPH, M. T., SOUZA, P. F. C., SILVA, A. B., NASCIMENTO, D. C. O., SOUZA, L. T., LIMA-FILHO, J. V. Plant lectins ConBr and CFL modulate expression toll-like receptors, pro-inflammatory cytokines and reduce the bacterial burden in macrophages infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Phytomedicine**, v.15, p. 52–60.2017. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.12.005

BENJAMIM, C.F.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Role of Nitric Oxide in the Failure of Neutrophil Migration in Sepsis. **J. Infect. Dis.** v.182, p. 214–23. 2000.DOI: <https://doi.org/10.1086/315682>

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

CARVALHO, A. C. B.; SILVEIRA, D. Drogas vegetais: uma antiga nova forma de utilização de plantas medicinais. **Brasília Médica**, v.48, n.2, p.219-237, 2010. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/282672848_Drogas_vegetais_uma_antiga_nova_forma_de_utilizacao_de_plantas_medicinais. Acesso em 25 de agosto de 2022.

CARVALHO. L; CARACUSCHANSKI, F. D.; RISTOW, A. M. Pesquisa de Salmonella spp. Em carne suína in natura comercializada no Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.6, p. 56959-56967 jun. 2021. DOI:10.34117/bjdv7n6-211

CHO, W.K; JO, Y.; CHU, H.; PARQUE, S.H.; KIM, K. H. Integration of latex protein sequence data provides comprehensive functional overview of latex proteins.

Molecular biology reports, v.41, p. 1469-1481,2014. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s11033-013-2992-6>

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**. v. 420, p. 19-26. 2002. DOI:

<https://doi.org/10.1038/nature01326>

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

<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.03.011>

COLLAZO, C.M., AND GALAÂN, J.E. The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell.

Mol Microbiol, v.24 p. 747± 756.DOI: [https://doi.org/10.1046/j.1365-](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3781740.x)

[2958.1997.3781740.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3781740.x)

Deise Aur. *Calotropis procera*: erva daninha que produz seda vegetal.

2022.**GreenMe**. Disponível em: <https://www.greenme.com.br/informarse/green-economy/90413-calotropis-procera-erva-daninha-produz-seda-vegetal/>. Acesso em 12 de agosto de 2022

DERYNCK R, LINDQUIST PB, LEE A.; WEN D.; TAMM J.; GRAYCAR JL.; RHEE L.; MASON AJ.; MILLER DA. A new type of transforming growth factor- β , TGF- β 3 .

EMBO J v.7, p. 3737-3743. **Coffey RJ**, et al. 1988. DOI:

<https://doi.org/10.1002%2Fj.1460-2075.1988.tb03257.x>

DEVPRAKASH, T.R., GURAV, S., KUMAR, G.P.S., MANI, T.T. An review of phytochemical constituents and pharmacological activity of *Plumeria* species

International Journal of Current Pharmaceutical Research, v. 4, p.1–6.

2012.Disponível: em:

https://www.researchgate.net/publication/221947927_An_review_of_phytochemical_constituents_and_pharmacological_activity_of_Plumeria_species

DOUGAN, G.; JOHN, V.; PALMER, S.; MASTROENI. **Immunity to salmonellosis**. **Immun Rev**, v.240, p.196-210,2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.2010.00999.x>

DUARTE. D. A. M; VASCONSELOS, AM. M.; SILVA, J. V. D.; ANDRADE, P. L. A. Ocorrência de Salmonella spp. e Estaphylococcus coagulase positiva em pescado no Nordeste, Brasil. **Arquivo instituto online**, v.77 n. 4 pp. 711-713, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657v77p7112010>

DUBEY, V. K. e JAGANNADHAM, M.V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of Calotropis procera. **Phytochemistry**, v.62 p.1057-1071, 2002.DOI: [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00676-3](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00676-3)

DUSSAULT, A. A., & POULIOT, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. **Biological Procedures On line**, v. 8, p. 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1251/bpo.114>

EVERT, R.F. **Esau's plant anatomy**, 3ed. Wiley-Interscience: New York.2006

FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London, Academic Press.1979

FARRELL, B.D.; DUSSOURD, D.E. & MITTER, C. 1991. Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? **American Naturalist**, v.138 n.4 pp. 881-900. 1991. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/2462439>. Acesso 10 de setembro de 2012

FREITAS, C. D. T.; SOUZA, D.P.; ARAÚJO, E.S.; CAVALHEIRO, M. G.; OLIVEIRA, L. S. RAMOS, M. V. Anti-oxidative and proteolytic Activities and protein profile of laticifer cells of *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra* and *Euphorbia tirucalli*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.22 p. 11-22,2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1677-04202010000100002>

FREITAS, C.D.T., Oliveira, J.S., MIRANDA, M.R. a, MACEDO, N.M.R., Sales, M.P., Villas-Boas, L.a., RAMOS, M.V. Enzymatic activities and protein profile of latex from Calotropis procera. Plant Physiol. **Biochem**, v.45, p. 781–789.2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.07.020>

- GALLAY, P; HEUMANN, D.; L.E ROY, D, BARRAS, C; GLAUSER, M.P.
Lipopolysaccharide-binding protein as a major plasma protein responsible
forendotoxemic shock. **Proc natl acad sci**, U S A, v.90 p.9935–9938, 1993.DOI:
<https://doi.org/10.1073%2Fpnas.90.21.9935>
- HAGEL, J.M., WELJIE, A.M., VOGEL, H.J., FACCHINI, P.J. Quantitative ¹H NMR
metabolite profiling as a functional genomics platform to investigate alkaloid
biosynthesis in opium poppy. **Plant Physiol.** 147, 1805–1821.2008.DOI:
10.1104/pp.108.120493.
- HEDSTROM, L.; **Chem. Rev**, v.102, p.4501.2002. DOI:
<https://doi.org/10.1021/cr000033x>
- HOSTETTMANN, K. E TERREAUX, C. Search for new lead compounds from higher plants.
Chimia, v.54 n.11 p. 652-657,2000. Disponível em: [https://archive-
ouverte.unige.ch/unige:11790](https://archive-ouverte.unige.ch/unige:11790). Acesso em 15 de agosto de 2022.
- JONG, H.K.; VAN DER POLL, T.; WIERSINGA, W.J. The systemic pro-inflammatory
response in sepsis. **J. Innate Immun.** v. 2, p. 422-430. 2010.
- JONG, H.K.; PARRY, C.M.; VAN DER POLL, T.; WIERSINGA, W.J. Host-pathogen
interaction in invasive Salmonellosis. **PLoS Pathog.** v. 8, n. 10, e1002933. 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**, v.15 p.37:34,2016. PMID: 28228802; PMCID: PMC5242350.
Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5242350/>
- Kane CJ, Hebda PA, Mansbridge JN, Hanawalt PC. 1991. Direct evidence for spatial
and temporal regulation of transforming growth factor β 1 expression during wound
healing. **J Cell Physiol** 148 : 157-173
- KADIYALA, M.; S PONNUSANKAR, K. E. *Calotropis gigantea* (L.) R. Br
(Apocynaceae): a phytochemical and pharmacological review. **J Ethnopharmacol**,
v.150 n.1 p.32-50, 2013.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.045>
- KALUPAHANA, R. S., et al. Activation of murine dendritic cells and macrophages
induced by *Salmonella* entérica serovar Typhimurium. **Immunology**, v.115 p. 462-
472, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02180.x>

Kehrl JH; Wakefield LM; Roberts AB; Jakowlew S; Alvarez-Mon M; Derynck R; Sporn MB; Fauci AS; Transforming cell growth factor β by human T lymphocytes and its potential role in the production of T cell growth. **J Exp Med**, v.163 p.1037-1050.1986. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.163.5.1037>

KIRK, M. D.; PIRES, S. M.; BLACK, R. E.; CAIPO, M.; JONH, A.; Devleesschauwe, D. D. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases. **Plos Med**, v.3 n. 12 p. 1001921, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001921>

KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, v.72 n.13 p. 1510-1530, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.016>

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**, v. 37 p.370-378, 2004.DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01968.x>

LARHSINI, M.; OUMOULID, L.; LAZREK, H.B.; WATALEB, C. S.; BOUSAID, BEKKOUCHE, K.; MARKOUK, M.; JANA, M. Sacreening of antibacterial and antiparasidic activities of six Moroccan medicianal plants. **Therapie**, v.54, p.763-765,1999. PMID: 10709454.

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 latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J. Ethnopharmacol**, v.129, p. 327–334.2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.03.038>

MATILE, P.The sap of the plant cells. **New Phytologist**, v.105 p.1-26, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb00107.x>

MAUSETH, J.D. Further studies of the unusual type of laticiferous canals in *Mammillaria* (Cactaceae): structure and development of the semi-milky type. **American Journal of Botany**, v.65 n.10 p. 1098-1102, 1978.DOI: <https://doi.org/10.2307/2442327>

MEGERESSA, M.; BISLAT, 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, v.15, p. 270, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0803-4>

MENG, XM., NIKOLIC-PATERSON, D. & LAN, H. TGF- β : the master regulator of fibrosis. **Nat Rev Nephrol**, v.12, p. 325–338 2016. DOI: doi.org/10.1038/nrneph.2016.48

METCALFE, C.R. Distribution of latex in the plant kingdom. **Economic Botany**, v.21 p. 115-127, 1967. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/4252857>

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**, v.4 p.876-883, 2014. DOI: <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.201414B216>

MURI, ESTELA MARIS FREITAS. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptidomiméticos. **Química Nova [online]**. v. 37, n. 2, pp. 308-316. 2014. DOI: doi.org/10.5935/0100-4042.20140052

Manual MSD Versão para profissionais de saúde. FEBRE TIFÓIDE. Disponível em <https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/bacilosgram-negativos/febre-tifoide>. Acesso em 17/09/2022

MULLER, C.; BANG, I., VELAYUDHAN, J.; KARLINSEY, J.; PAPENFORT, K.; VOGEL, J.; FANG, F. Acid stress activation of the σ^E stress response in *Salmonella* entérica serovar Typhimurium. **Mol Microbiol**, v.71 p.1228- 1238, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06597.x>

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**, v.14 p.79-86, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.10.004>

NENAAH, G. Antimicrobial activity of *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae) and isolation of four flavonoid glycosides as the active constituents. **World J Microbiol Biotechnol**, v.29 p.1255–1262, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1288-2>

NEURATH, H; BEYNON, R. J.; BOND, J. S. The diversity of proteolytic enzymes. (Eds.). Proteolytic enzymes - a practical approach. **Oxford: JRL Press**, p.259, 1990.DOI: [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(90\)90038-P](https://doi.org/10.1016/0307-4412(90)90038-P)

NG, S. C; BENJAMIN, J.L.; MCCARTHY, N.E; HEDIN, C. H.R; KOUTSOMPAS,A.; PRICE, C. L.; HART, A. L.; KAMM, M. A.; FORBES, A.;KNIGHT, S.C.; LINDSAY, J.O.WHELAN, K.; STAGG, A.J. Relationship between human intestinal dendritic cells, gut microbiota,and disease activity in Crohn's disease. **Inflamm**, v.17, p. 2027–2037, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/ibd.21590>

OLIVEIRA, J. S.; PEREIRA, D.B.; FREITAS, C.D.; MARINHO-FILHO, J.D.B.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; RAMOS, M. V. In vitro cytotoxicity Against diffent human câncer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Toxicology in vitro**, v.21, p. 1563-1573, 2007.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.05.007>

PATIL, S.P; PATIL, M.P.; PATIL, R.H.I n-vitroanti-hypercholesterolemic activity of *Calotropis procera*(Ainton) using human erythrocytes. **Biocatalysis and agrigultural biotechnology**, v.5 p.104-110,2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.01.002>

PEI, S. Ethnobotanical Approaches of Traditional Medicine Studies: Some Experiences from Asia. **Journal Pharmacology Biology**, v.39 p. 74-79, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1076/phbi.39.s1.74.0005>

RAMOS M.V.; AGUIAR V.C.; XAVIER, A. A.S., LIMA MW, BANDEIRA G.P.; ETCHHELLS J.P, NOGUEIRA N.A.; ALENCAR N.M. Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested by enzymatic action in vitro and are not immunologically detected in feces material. **Fitoterapia**, v.77 p.251–256, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.02.010>

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**, v.111, p.115–122, 2007.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.034>

RAMOS, M.V.; VIANA, C. A.; SILVA, A. F.; FREITAS, C. D. T. FIGUEIREDO, I. S.T.; OLIVEIRA, R. S. B.; ALENCAR, N.M.N; LIMA-FILHO, J. V.; KUMAR, V.L. Proteins

derived from látex of *C. procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. **Naunyn Schmiedeberg's Arch**

Pharmacol, v.385, p.455-463,2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00210-012-0733-3>

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., VITOR LIMA-FILHO, J., 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. **J. Ethnopharmacol**. 125, 387–392, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.07.030>

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 Bioproducts Processing**, v.89 p.73-80, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.02.001>

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**, v.186 p. 569–58, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1084%2Fjem.186.4.569>

RIVERA -CHAVEZ.F.; ANDREAS, J B.. The Pyromaniac Inside You: *Salmonella* Metabolism in the Host Gut, v. 69 p. 31-48. 2015. DOI: 10.1146/annurev-micro-091014-104108.

ROBERTS, A.B; ANZANO, M.A; LAMB, L.C; SMITH, J.M; SPORN, M.B. New class of transformative growth factors potentiated by epidermal growth factor: Isolation of non-neoplastic tissues. **Proc Natl Acad Sci**, v.78 p.5339-5343, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.78.9.5339>

ROGERS, A.B.; AMINZADEH, Z.; HAYASHI, Y.; PATERSON, D.L. Country-to-Country Transfer of Patients and the Risk of Multi-Resistant Bacterial Infection. **Clin Infect Dis**. v. 53, n. 1, p. 49-56. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cir273>

ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v.16, n. 1, p. 311 - 318, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232011000100033>

RUBY, T.; MCLAUGHLIN, L.; GOPINATH, S.; MONACK, D. Salmonella's long-term relationship with its host. **FEMS Microbiol Rev.** v. 36, p. 600–615. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00332.x>

RUFINO, R.; SILVA, J. R. L.; J. Cellular and biochemical bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Bras. Pneumol*, v.32, p.241.2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132006000300011>

Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. **Curr Opin Pharmacol.** 2009;9(4):447-453. doi: 10.1016/j.coph.2009.04.008

SALAS, C. E.; GOMES, M. T. R.; HERNANDEZ, M.; LOPES, M. T. P. Plant cysteine proteinases: Evaluation of the pharmacological activity. **Phytochemistry**, v.69 p.2263-2269, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.05.016>

Salaga, M.; Sobczak, M.; Fichna, J.; **Drug Discovery Today** (2013), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.03.004>

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**, v.128 p.189-194,2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.023>

SCALLAN,S. M.; CRIM, A. R. HENAO, O.L.; MAHON, B.E.; HOEKSTRA, R. M. GRIFFIN, P. M. Bacterial Enteric Infections Among Older Adults in the United States: Foodborne Diseases Active Surveillance Network.1996–2012. **Foodborne Pathog Dis**, v.6 p.:492-499.2015. DOI: <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1915>

SGARBIERI, V.C.; GUPTA, S. M.; KRAMER, D.E. AND WHITAKER, J.R. Ficus enzymes: Separation of proteolytic enzymes of *Ficus glabrata* and *Ficus carica*. *J. Chem.*, v.239 p. 2170-2177, 1964.PIMID: 14209944

SILVA, M. L.; NETO-BEZERRA, F.; LINHARES, P. C. F.; BEZERRA, KATHERINE. Production of carrots fertilised with roostertree (*Calotropis procera* (Ait.) R.Br.). **Revista Ciência Agronômica** v. 44, n. 4 p. 732-740. 2013, DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-66902013000400009>.

SINGH, H.; KUMAR, S.; DEWAN, S.; KUMAR, V.L. Inflammation induced by latex of *Calotropis procera*- a new model to evaluate anti-inflammatory drugs. **Journal Pharmacology and Toxicology Methods**, v.43, p.219-224, 2000.DOI:

[https://doi.org/10.1016/s1056-8719\(00\)00105-2](https://doi.org/10.1016/s1056-8719(00)00105-2)

SHILPKAR, P.; SHAH, M.; CHAUDHARY, D. An alternate use of *Calotropis gigantea*: Biomethanation. **Current science**, v.92 p. 435-437,2007. Disponível em:

<https://www.jstor.org/stable/24097554>.

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C.L.; DUTRA, R.A.F.; FILMA-FILHO, J.L. – *Salmonella* spp., important pathogenic agent transmitted through foodstuffs– **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5 p. 1675-1683,2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232008000500031>

SOUZA, G. E., FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents and Actions**, v.17, p.97–103. (1985).DOI: <https://doi.org/10.1007/bf01966691>

SOUSA, B. F. E; SILVA, A. B. ; LIMA FILHO, J.V ; AGOSTINHO, A. G. ; OLIVEIRA, D. N. ; ALENCAR, N. M. ; DINIZ, C. ; Ramos, M.V . Latex proteins downregulate inflammation and restores blood-coagulation homeostasis in acute *Salmonella* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, p. 1-8, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-02760200458>

SOUZA, D. P.; FREITAS, C. D. T.; PEREIRA, D. A.; NOGUEIRA, F. C. SILVA, SALAS, C. S.; RAMOS, M.V. Laticifer proteins play a defensive role against hemibiotrophic and necrotrophic phytopathogens. **Planta**, v.234 n.1 p.183-193.2011 DOI: doi: 10.1007/s00425-011-1392-1

TAVARES, L. ; RALPH, M. T. ; BATISTA, JACQUELINE ELLEN CAMELO ; SALES, A. C. ; ANDRADE, L. ; USMAN, U. ; SILVA JUNIOR, V. ; RAMOS, MARCIO V ; LIMA FILHO, JV . Perspectives for the use of latex peptidases from *Calotropis procera* for control of inflammation derived from *Salmonella* infections. **INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES**, v. 121, p. 37-43, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.172>

TAVARES, L. S.; MANCEBO, B; SANTANA, L. N.; Adelson Do Nascimento S. A.; SILVA, R. L. O.; BENKO-ISEPPON, A. M.; RAMOS, M. V.; MONTEIRO DO NASCIMENTO, C. T.; GRANGEIRO, T. B; SOUSA, J. S. MOTA, R. A.; JÚNIOR, V. A. S.; Lima-Filho, J. V. Recombinant osmotin inclusion bodies from *Calotropis procera* produced in E. coli BL21(DE3) prevent acute inflammation in a mouse model of listeriosis. **PHYTOMEDICINE**, v. 154186, p. 154186, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154186>

Tortora, Gerard J.; Funke, Berdell R.; Case, Christine L.; **Microbiologia** - 12ª Ed. 2016. Editora: Artmed, 2016.

TUROLLA M. S.R.; Nascimento E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterapicos utilizados no Brasil. **Rev Bras Cienc Farm**, v. 42, n. 2 p. 289-306, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000200015>

UZZAU, S.; BROWN, D.J.; WALLIS, T.; RUBINO, S.; BERNARD, S.; CASADESÚS, J.; PLATT.; OLSEN, J.E.; **Epidemiol Infect**, v.125 n.2 p. 229–255.2000. DOI: <https://doi.org/10.1017%2Fs0950268899004379>

VAN DER POLL, T.; OPAL, S.M. Host-pathogen interactions in sepsis. **Lancet Infect Dis**. v. 8, p. 32–43. 2008. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(07\)70265-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(07)70265-7)

VIANA, C. A.; Ramos, M. V.; FILHO, J. D. B. M.; LOTUFO, LETÍCIA V. C.; FIGUEIREDO, I. S. T.; DE OLIVEIRA, J. S; MASTROENI, P.; Lima-Filho, J. V.; ALENCAR, N. M. N. . Cytotoxicity against tumor cell lines and anti-inflammatory properties of chitinases from *Calotropis procera* latex. **Naunyn-schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 390, p. 1005-1013, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1397-9>

VARELLA, P. e FORTE, W.C.N. Citokines: a review. **Rev. bras. alerg.imunopatol**, v.24 p.146-154, 2001.ID: 402536

WHO (WHORD HEALTH ORGANIZATION). The word medicines situation: tradicionaça medicines: global situation, issues and challenges. **Geneva**, 2011. Disponível em:

[http://biofarmaka.ipb.ac.id/biofarmaka/2011/Material%20of%20Workshop%20Herbal Net%20\(World%20Medicine%20Situation%202011\)%20-%20WMS%20ch18w%20TraditionalMed%202011.pdf](http://biofarmaka.ipb.ac.id/biofarmaka/2011/Material%20of%20Workshop%20Herbal%20Net%20(World%20Medicine%20Situation%202011)%20-%20WMS%20ch18w%20TraditionalMed%202011.pdf)

WORLEY, J. M.; NIEMAN, G.S.; FRED, K. G.; Salmonella typhimurium disseminates within its host by manipulating the motility of infected cells. **Natl Acad Sci**, v.103 n.47 p.17915-20. U S A. 2006 DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0604054103>.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL, F, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24 n.1 p.147-152. 2001; DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000100025>

XU X, ZHENG L, YUAN Q; ZHEN, G; CRANE, J. L.; ZHOU, X.; Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis. **Bone Res**, v.6 p.2, 2018. DOI:10.1038/s41413-017-0005-4

ZHANG YG.; SINGHAL, M; LIN, Z.; MANZELLA, C.; KUMAR, A.; ALREFAI, W.A.; DUDEJA, P.K.; SAKSENA, S; SUN, J.; GILL, R. Infection with enteric pathogens Salmonella typhimurium and Citrobacter rodentium modulate TGF-beta/Smad signaling pathways in the intestine. **Gut Microbes**, v.9 n.4 p.326-337. 2018; doi:10.1080/19490976.2018.1429878