

Maria Taciana Ralph

**Propriedades anti-inflamatórias de proteases
cisteínicas do látex da planta medicinal *Calotropis
procera* (Ait.) R. Br. aplicadas ao controle de
infecções por *Salmonella***

RECIFE, 2017



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

Maria Taciana Ralph

Propriedades anti-inflamatórias de proteases cisteínicas do látex da planta medicinal *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. aplicadas ao controle de infecções por *Salmonella*

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcio Viana Ramos

RECIFE, 2017

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

R163p Ralph, Maria Taciana
 Propriedades anti-inflamatórias de proteases cisteínicas do
 látex da planta medicinal *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. aplicada
 ao controle de infecções por *Salmonella* / Maria Taciana Ralph. –
 2017.
 87 f. : il.

 Orientador: José Vitor Moreira Lima Filho.
 Coorientador: Marcio Viana Ramos.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de
 Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal,
 Recife, BR-PE, 2017.
 Inclui referências.

 1. *Calotropis procera* 2. Proteínas laticíferas 3. *Salmonella*
 I. Lima Filho, José Vitor Moreira, orient. II. Ramos, Marcio Viana,
 coorient. III. Título

CDD 636.089

Maria Taciana Ralph

Propriedades anti-inflamatórias de proteases cisteínicas do látex da planta medicinal *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. aplicada ao controle de infecções por *Salmonella*

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

Maria Taciana Ralph - Discente

Tese defendida em: 24 de Fevereiro de 2017

Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho
Deptº de Biologia - UFRPE
Orientador

Prof. Dr. Marcio Viana Ramos
UFC - Examinador

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva
Junior
UFRPE – Examinador

Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli
UFMG – Examinador

Profa. Dra. Jaqueline Bianque de
Oliveira
UFRPE – Suplente

Prof. Dr. Nicodemus Teles de Pontes
Filho
UFPE - Examinador

Prof. Dr. Cláudio Augusto Gomes da
Câmara
UFRPE - Suplente

Dedico...

Aos meus Pais, Lúcia e Ralph, e à
Minha Irmã, Lidiana,

Por todo amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me guiado até aqui, por ter permitido que essa conquista se tornasse possível, por todas as bênçãos, enfim, “Para Ele são todas as coisas”.

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

Ao meu orientador José Vitor Moreira Lima Filho, por ter me dado a oportunidade de ser sua orientanda desde a graduação, por todos os ensinamentos e por toda dedicação para realização de mais este trabalho.

Ao meu co-orientador Prof Marcio Ramos e à todos os integrantes do laboratório de Plantas laticíferas/ UFC, pelo apoio científico e fornecimento das proteínas utilizadas neste trabalho.

Aos professores participantes da banca, por disponibilizarem parte do seu tempo para contribuir para melhoria deste trabalho com sugestões que serão abraçadas com todo carinho.

À todos os integrantes dos Laboratórios de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA/UFRPE, Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada/UFRPE, Laboratório de histopatologia da Medicina Veterinária/UFRPE por todos os ensinamentos e ajuda sem limites.

À todos do laboratório de Microbiologia e Imunologia/UFRPE, Jacqueline, Renata, Raiza e em especial às amigas Lethicia, Ana, Laisla. A todos muito obrigada por toda ajuda.

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

À todos os professores da época do colégio, da graduação, do mestrado, doutorado, por terem me ajudado a chegar até aqui.

À todos os meus amigos.

Aos meus sogros e Cunhada pelo apoio incondicional e acolhimento.

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

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

RESUMO

Calotropis procera (Apocynaceae) é uma planta medicinal, cujas proteínas extraídas do seu látex têm sido reportadas por apresentar importantes atividades biológicas. Em particular, foi identificado que uma fração proteica rica em proteases cisteínicas (LPPII), quando administradas em animais de laboratório, demonstra relevante ação anti-inflamatória e mantém a homeostase da coagulação sanguínea em camundongos infectados por *Salmonella*. No presente estudo, um modelo murino de infecção sistêmica causada por *Salmonella* Typhimurium foi utilizado para avaliar a influência de LPPII sobre o controle da inflamação decorrente da infecção. Dois esquemas de tratamentos foram avaliados, preventivo e curativo. No modelo de tratamento preventivo, os animais experimentais receberam LPPII (10mg/kg) por via endovenosa (ev), enquanto os grupos controles foram administrados com LPPII+IAA (10mg/kg), cujas as proteases foram inativadas com Iodoacetamida, PBS (ev) ou dexametasona (0,5mg/cavidade). Após 30 min, os animais foram desafiados com *S. Typhimurium* (10^5 UFC/mL), por via intraperitoneal (ip). Após 6 horas da infecção, os camundongos foram submetidos aos procedimentos de eutanásia e análises. No modelo de tratamento curativo, os animais foram infectados com *S. Typhimurium* (10^5 UFC/mL) (ip) e durante dois dias consecutivos foram tratados com LPPII (10mg/kg) ou administrados com LPPII+IAA (10mg/kg), PBS (ev) ou dexametasona (ip). Após 72 horas de infecção, os grupos foram submetidos aos procedimentos de eutanásia para coleta de amostras e análises. Os resultados demonstraram que, nos dois esquemas de tratamento, não houve depuração bacteriana no baço, fígado, fluido peritoneal e sangue dos animais experimentais quando comparados aos controles. Também foi possível observar que o tratamento com LPPII reduziu significativamente a quantidade de leucócitos na cavidade peritoneal dos animais, em relação aos grupos controles LPPII+IAA e PBS. Também houve redução da expressão gênica de TNF- α , IL-12 e IFN- γ nos animais que receberam LPPII. Ainda, não houve aumento da sobrevivência de animais tratados com LPPII e infectados com *Salmonella*. Finalmente, uma osmotina obtida de LPPII foi exposta a culturas de macrófagos peritoneais previamente estimulados com LPS. Foi observado que os tratamentos reduziram de forma significativa da expressão gênica de IL-1 β , mas não TNF- α . Conclui-se que proteases cisteínicas presentes no látex de *C. procera* são capazes de diminuir a inflamação no peritônio de camundongos infectados com *Salmonella* Typhimurium. Apesar dos mecanismos envolvidos neste efeito não estejam completamente elucidados, foi demonstrado que uma osmotina presente em LPPII apresenta potencial anti-inflamatório e possível relevância terapêutica.

Palavras-Chave: *Calotropis procera*. Proteínas laticíferas. *Salmonella*.

ABSTRACT

Calotropis procera (Apocynaceae) is a medicinal plant by which its laticifer proteins have been reported as having important biological activities. In particular, a protein fraction rich in cysteine proteases (LPPII) was shown anti-inflammatory and capable to maintain blood clotting homeostasis in *Salmonella*-infected mice. In the present study, a murine model of systemic infection caused by *Salmonella* Typhimurium was used to evaluate the influence of LPPII on control of infection-induced inflammation. Preventive and curative treatment regimens were evaluated. In the preventive treatment schedule, experimental animals received LPPII (10mg/kg) intravenously (iv), whereas the control groups were administered with LPPII + IAA (10mg/kg), whose proteases were inactivated with Iodoacetamide, PBS intravenously or dexamethasone (0.5mg/animal) (ip). After 30 min, the animals were challenged with *S. Typhimurium* (10^5 CFU/mL) intraperitoneally (ip). After 6 hours of infection, the mice were submitted to euthanasia procedures and analyzed. In the curative treatment schedule, the animals were infected with *S. Typhimurium* (10^5 CFU/mL) (ip) and for two consecutive days were treated with LPPII (10mg/kg) or administered with LPPII + IAA (10mg/kg), PBS intravenously or dexamethasone (ip). After 72 hours of infection, the groups were submitted to euthanasia procedures for sample collection and analysis. The results showed that, in the two treatment regimens, there was no bacterial clearance in the spleen, liver, peritoneal fluid and blood of the experimental animals when compared to the controls. The treatments with LPPII significantly reduced the amount of leukocytes in the peritoneal cavity of the animals in comparison to the LPPII + IAA and PBS control groups. The treatments also reduced gene expression of TNF- α , IL-12 and IFN- γ in animals receiving LPPII. Furthermore, there was no increase in survival of LPPII-treated and *Salmonella*-infected animals. Finally, peritoneal macrophages previously stimulated with LPS were exposed to an osmotin isolated from LPPII. It was observed that the treatments significantly reduced the IL-1 gene expression, but not TNF- α . We have shown that cysteine proteases present in the latex of *C. procera* are capable to decrease inflammation in the peritoneum of *Salmonella* Typhimurium-infected mice. Although the mechanisms involved in this effect are not fully elucidated, it has been demonstrated that an osmotin present in LPPII possesses anti-inflammatory potential and possible therapeutic relevance.

Keywords: *Calotropis procera*. Laticifer proteins. *Salmonella*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de doenças transmitidas por alimento no Brasil, 2007-2016	19
Figura 2 Representação esquemática das três vias de inoculação de <i>Salmonella</i> em modelo murino.	22
Figura 3 Representação esquemática da resposta imunológica a <i>Salmonella</i> Typhimurium.	26
Figura 4 <i>Calotropis procera</i> .	31
Figura 5 Cromatografia de troca iônica de LP em coluna de CM-Sepharose e Perfis proteicos de LP (LP _{PI} , LP _{PII} , LP _{PIII}) revelados em gel de eletroforese.	34
Figura 6 Representação esquemática do teste de atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> .	39
Figura 7 Representação esquemática do desenho experimental dos testes <i>in vivo</i> .	42
Figura 8 Contagem de bactérias viáveis em animais controles e experimentais após infecção com <i>Salmonella</i> Typhimurium durante tratamento preventivo.	50
Figura 9 Contagens totais de leucócitos no fluido peritoneal (A) e no sangue (B) de camundongos pré-tratados com LP _{PII} no modelo de peritonite induzido por <i>Salmonella</i> Typhimurium.	51
Figura 10 Expressão gênica de TNF(A), IL-12p35 (B), IL-12p40 (C), IL-10 (D) relativas a camundongos do grupo controle durante tratamento preventivo.	53
Figura 11 Taxa de sobrevivência de camundongos pré-tratados no modelo de peritonite induzido por <i>Salmonella</i> Typhimurium.	54
Figura 12 Contagem de bactérias viáveis em animais controles e experimentais após infecção com <i>Salmonella</i> Typhimurium durante tratamento curativo.	56

Figura 13 Contagens totais de leucócitos no fluido peritoneal (A) e no sangue (B) de camundongos tratados com LP _{P11} no modelo de peritonite induzido por <i>Salmonella</i> Typhimurium.	57
Figura 14 Expressão gênica de TNF (A), IFN- γ (B), IL-12p35 (C), IL-12p40 (D), IL-10 (E) relativas a camundongos do grupo controle durante tratamento curativo.	59
Figura 15 Taxa de sobrevivência de camundongos tratados no modelo de peritonite induzido por <i>Salmonella</i> Typhimurium.	60
Figura 16 Viabilidade celular de esplenócitos e macrófagos tratados com proteínas do látex de <i>C. procera</i> .	63
Figura 17 Expressão gênica das citocinas TNF, IL-1 e INOS em culturas de esplenócitos tratadas com as proteínas do látex de <i>C. procera</i>	64
Figura 18 Expressão gênica das citocinas TNF, IL-1 e INOS em culturas de macrófagos tratadas com as proteínas do látex de <i>C. procera</i> .	65
Figura 19 Expressão gênica das citocinas TNF, IL-1 e INOS em culturas de macrófagos estimuladas com LPS e tratadas com osmotina do látex de <i>C. procera</i> .	66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Contagens totais e diferenciais de leucócitos no sangue de animais controles e experimentais após tratamento preventivo com LP_{PII} e infecção com *Salmonella* Typhimurium. 52
- Tabela 2** Contagens totais e diferenciais de leucócitos no sangue de animais controles e experimentais após tratamento curativo com LP_{PII} e infecção com *Salmonella* Typhimurium. 58

LISTA DE ABREVIATURAS

- ✓ ANOVA: Análise de Variância
- ✓ BANA: N - benzoil-arginina-naftilamida
- ✓ BHI: Meio de Cultura Brain Heart Infusion
- ✓ CpOsm: Osmotina isolada de LP_{PII}
- ✓ DP: Desvio Padrão
- ✓ DTA: Doenças transmitidas por alimentos
- ✓ e.v: Endovenoso
- ✓ Enzima Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- ✓ IAA: Iodoacetamida
- ✓ IL: Interleucina
- ✓ KDa: KiloDalton
- ✓ IFN – γ : Interferon Gama
- ✓ i.p: Intraperitoneal
- ✓ LIKA: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
- ✓ LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano
- ✓ LP: Fração proteica não-dialisável do látex de *Calotropis procera*
- ✓ LP_{PII}+IAA: Proteínas do látex inativadas por iodoacetamida
- ✓ LP_{PII}: Fração proteica de *Calotropis procera* derivada de LP
- ✓ Complexo Maior de Histocompatibilidade de Classe I
- ✓ NK: Células Natural Killer
- ✓ iNOS: Enzima óxido nítrico sintase induzida
- ✓ ON: Oxido nítrico
- ✓ PBS: Tampão fosfato de sódio
- ✓ Pm \emptyset : Macrófagos peritoneais
- ✓ RPMI: Meio Roswell Park Memorial Institute
- ✓ RT-PCR: Reação em cadeia de Polimerase em tempo Real

- ✓ TNF: Fator de Necrose Tumoral
- ✓ UFC: Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Salmonelose	17
2.2 <i>Salmonella enterica</i> Sor. Typhimurium como modelo de infecção sistêmica experimental	20
2.3 Resposta Imunológica durante infecção por <i>Salmonella</i>	23
2.4 Látex e plantas laticíferas	27
2.5 <i>Calotropis procera</i> : propriedades gerais	28
2.6 Frações protéicas do látex da <i>C. procera</i>	32
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Obtenção das proteínas de <i>C. procera</i>	37
4.2 Obtenção das proteínas da osmotina	38
4.3 Microorganismo	38
4.4 Atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	38
4.5 Animais	40
4.6 Desenho experimental	40
4.7 Análise do clareamento bacteriano	43
4.8 Contagem total e diferencial de leucócitos	43
4.9 Análise da expressão gênica de citocinas no baço	43
4.10 Avaliação da citotoxicidade celular de LP _{P11} em culturas primárias de esplenócitos ou macrófagos	44
4.11 Avaliação da influência de CpOsm sobre macrófagos estimulados com LPS.	45
4.13 Determinação da mensagem de síntese de citocinas em culturas celulares expostas a LP _{P11}	45
4.14 Análise estatística	47
5. RESULTADOS	48
6. DISCUSSÃO	67

7. CONCLUSÃO	73
8. AGRADECIMENTOS	75
9. REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais pela população como terapia alternativa para tratar doenças tem sido uma prática comum desde milhares de anos antes de Cristo. Os conhecimentos sobre os efeitos biológicos destas plantas foram passados pelas gerações, tendo um importante papel histórico e social. Essas plantas vêm sendo bastante estudadas e o interesse da comunidade científica por elas é crescente. Isso devido à descoberta de moléculas ativas nestes vegetais e a possível transformação das mesmas em compostos biológicos e em sua utilização na síntese de medicamentos. Contudo, apesar do vasto conhecimento empírico e científico sobre tais moléculas, somente uma pequena parte destes derivados vegetais foram investigados em estudos aprofundados e sequenciais, que conduziram a geração de produtos comerciais.

Grande parte dessas plantas de interesse farmacológico estão entre as aproximadamente 20.000 espécies de plantas laticíferas como é o caso da *Calotropis procera*, conhecida popularmente como leiteiro ou ciúme. O fluido laticífero desta planta é rico em proteínas com relevante potencial farmacológico e seus efeitos biológicos têm sido particularmente avaliados por nosso grupo de pesquisa. Estudos anteriores mostraram que, após processos de centrifugação e diálise do látex de *C. procera*, diferentes frações proteicas podem ser obtidas. Particularmente, a fração proteica não dialisável do látex (LP), tem sido relatada por suas propriedades anti-inflamatórias (ALENCAR et al., 2004). Outros estudos também demonstraram que a administração de LP impediu a morte de camundongos infectados com uma dose letal de *Salmonella* Typhimurium (LIMA-FILHO et al., 2010).

Tendo em vista os resultados obtidos com a fração LP, sua composição proteica tem sido avaliada por este grupo de pesquisas. Particularmente, a separação cromatográfica de LP possibilitou o isolamento de três subfrações proteicas chamadas de LP_{PI}, LP_{PII} e LP_{PIII}, dentre elas, a fração LP_{PII} mostrou-se rica em proteases cisteínicas (FREITAS et al., 2007; RAMOS et al., 2009). LP_{PII} tem sido reportada por apresentar atividades anti-inflamatória e reguladora da coagulação sanguínea em animais infectados com *Salmonella* (RAMOS et al. 2012).

Estudos mais recentes demonstraram a presença de uma osmotina de 22 kDa na fração proteica LP_{PII} do látex de *C. procera*. Esta osmotina (CpOsm) demonstrou interessante atividade antifúngica contra *Fusarium solani*, *Neurospora sp*, *Colletotrichum gloesporioide*. No entanto, o potencial farmacológico de CpOsm ainda é pouco conhecido, principalmente no que diz respeito a sua ação anti-inflamatória e influência sobre as atividades de LP_{PII}.

As salmoneloses estão entre as infecções alimentares mais recorrentes mundialmente, sendo que a cada ano surgem aproximadamente 93,8 milhões de novos casos de gastroenterites causadas por *Salmonella entérica* Sorotipo Typhimurium (MAJOWICZ et al., 2010). Já as infecções por *Salmonella* Typhi são responsáveis por mais de 200 mil mortes por ano. A infecção por *Salmonella* pode gerar um quadro grave de inflamação sistêmica levando a paciente a morte, o que torna o controle desse processo inflamatório essencial para o sucesso do tratamento e recuperação do paciente.

Considerando o potencial anti-inflamatório e imunorregulador das proteínas laticíferas de *C. procera*, bem como o elevado número de casos de infecção por *Salmonella*, este trabalho foi proposto. O objetivo foi explorar o potencial da fração proteica LP_{PII}, obtidas do látex de *Calotropis procera*, como adjuvante terapêutico no controle da inflamação derivada de infecções sistêmicas experimentais causadas por *S. Typhimurium* em camundongos, além disso, este estudo visa obter dados preliminares sobre o possível potencial anti-inflamatório da osmotina (cpOsm) isolada da fração proteica LP_{PII}, contribuindo assim para o desenvolvimento de novos tratamentos contra infecções graves e processos inflamatórios decorrentes

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Salmonelose

A salmonelose é uma doença de origem alimentar causada por bactérias do gênero *Salmonella*. Estas são pertencentes à família Enterobacteriaceae, bastonetes gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e capazes de infectar diversos hospedeiros (BIEDZKASAREK e SKURNIK, 2006; JONG et al., 2012). A *Salmonella* tem ampla distribuição mundial e representa um importante problema sanitário, de saúde pública e economia mundial (BOROWSKY et al., 2006; SIGAUQUE et al., 2009; BUGAREL et al., 2011; FEASEY et al., 2012). No Brasil, a *Salmonella* ocupa o segundo lugar como patógeno mais recorrente nos quadros de doenças transmitidas por alimento representando 7,3% dos casos relatados (Ministério da Saude, 2016) (Fig. 1).

As infecções por *Salmonella* causam doenças intestinais e sistêmicas. Em humanos, a *Salmonella* pode estar envolvida com três doenças distintas: bacteremia, febre tifóide e enterocolite (ZHANG et al., 2003). A bacteremia é uma síndrome clínica menos comum em humanos causada por *S. enterica* Sor. Choleraesuis ou *S. enterica* Sor. Dublin, que podem entrar na cadeia alimentar por meio de produtos oriundos da carne de porco mal cozidas ou leite não pasteurizado (SAPHRA et al., 1954; FANG, FIERER, 1991; BUGAREL et al., 2011). A Febre tifóide é uma infecção sistêmica causada por *S. enterica* sorotipos Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B e Paratyphi C. Estes sorotipos são estritamente adaptados aos seres humanos e primatas superiores (MEAD et al., 1999; FEASEY et al., 2012). A colonização do tecido do hospedeiro pelo sorotipo Typhi pode causar trombose capilar nas placas de Peyer, que pode resultar em hemorragia, necrose e ulceração intestinal (BITAR e TARPLEY, 1985). Essas infecções clinicamente indistinguíveis são responsáveis por cerca de 27,1 milhões de casos e 217.000 mortes por ano em países em desenvolvimento (CRUMP et al., 2004). Já a enterocolite, frequentemente associada a *S. enterica* Sor. Typhimurium, é a segunda causa mais freqüente de

infecção alimentar nos Estados Unidos, com aproximadamente 1,4 milhões de casos estimados por ano (MEAD et al., 1999).

Além dos problemas causados à saúde humana, bactérias do gênero *Salmonella* estão frequentemente relacionadas com enfermidades em animais, atingindo cães, gatos, ovelhas, equinos dentre outros. A salmonelose em animais pode estar fortemente associada à higienização inadequada do local onde eles são mantidos (BSAVA, 1997). O trabalho realizado por Megid et al. (2001), descreveu um surto de salmonelose em cães mantidos em um canil de experimentação. Após 3 semanas, tempo de duração do surto, Megid e colaboradores observaram uma taxa de mortalidade de 50% (15/30) nos filhotes acometidos pela enfermidade. Ainda neste estudo, todos os animais que morreram foram submetidos à necropsia, sendo verificadas lesões sugestivas de processo septicêmico e pelo cultivo microbiológico do conteúdo intestinal, isolou-se *Salmonella* spp. a partir de todas as amostras. Já Mádic et al (1997), constataram que um surto de aborto ocorrido em um rebanho europeu de 38 cavalos, dos quais 26 eram éguas grávidas, pode ter ocorrido devido a infecções destas por *Salmonella*. Outro estudo feito com um grande surto de salmonelose em cães militares alemães demonstrou não só que as infecções por *Salmonella* em cães podem ocorrer sem sintomas clínicos, mas que a fonte pode estar relacionada à contaminação de rações desidratadas (SCHOTTE et al., 2007).

A resistência aos antimicrobianos em sorotipos de *Salmonella* é um problema global (CHEN et al., 2013). Os dados de vigilância epidemiológica demonstram um aumento da resistência aos antimicrobianos de *Salmonella* entre 20% a 30%, no início da década de 1990, e até 70% em alguns países na virada do século (SU et al., 2004). Desta forma, embora a utilização criteriosa de antimicrobianos possa representar a espinha dorsal do tratamento para infecções por *Salmonella*, o uso de agentes imunomoduladores tem o potencial de aumentar seletivamente a capacidade do hospedeiro para controlar a infecção, sem o risco de desenvolver resistência aos antibióticos (COBURN et al., 2007). Além disso, infecções por *Salmonella* podem gerar grave inflamação sistêmica e choque séptico levando a paciente a morte. Diante disso, o controle desse processo inflamatório é essencial para o sucesso do tratamento e recuperação do paciente.

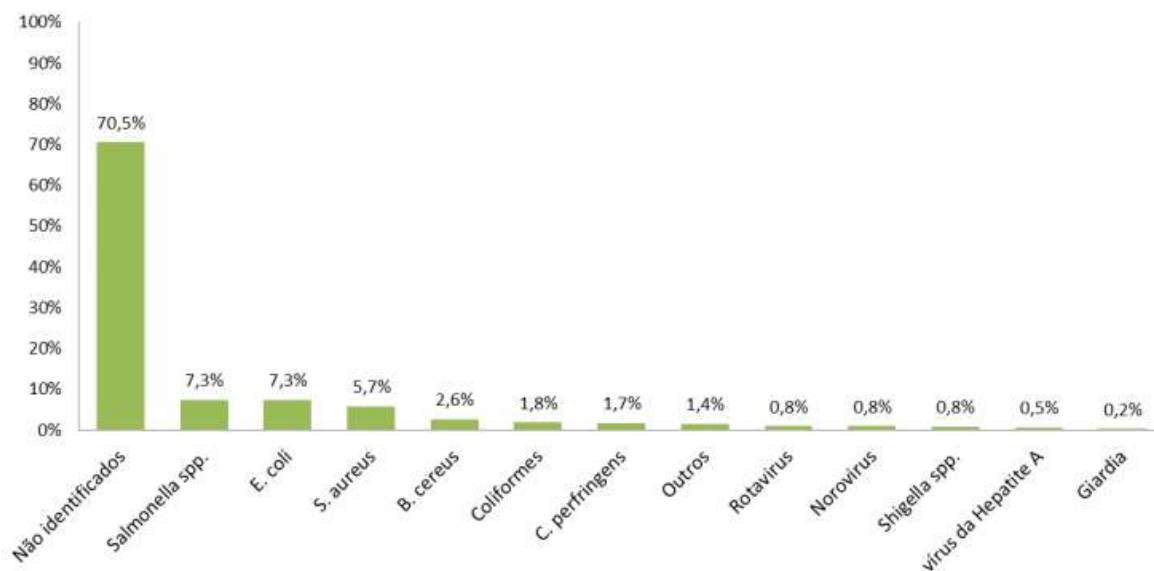


Figura 1 Agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de doenças transmitidas por alimento no Brasil, 2007-2016.

Fonte: SINAN/SVS/Ministério da Saúde

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

Em humanos, *Salmonella* Typhimurium está associada às enterocolites, sendo a principal causa de doenças bacterianas transmitidas por alimento em muitos países (ZHANG et al., 2003; CRUMP et al., 2015). A doença é frequentemente atribuída ao consumo de alimentos contaminados, tais como aves domésticas, carne bovina, carne suína, ovos, frutos do mar, leite, produtos de nozes (TAUXE, 1991; BENENSON et al., 1995; BUGAREL et al., 2011) e os sintomas de gastroenterites começam a surgir algumas horas após a ingestão destes alimentos. De maneira geral, ao percorrer o início do trato digestivo, as bactérias atingem o estômago onde são sensíveis ao ácido estomacal, e boa parte dos microrganismos são eliminados (RUBY et al., 2012). No entanto, as bactérias que conseguem escapar com êxito de serem mortas pelo pH baixo do estômago passam através do intestino delgado para o íleo e cólon distais (FINK e COOKSON 2007; TORTORA et al., 2012). Nestes locais as bactérias penetram a barreira da mucosa e com o auxílio das fímbrias se aderem às células epiteliais intestinais (BAUMLER et al., 1996).

Salmonella causa rearranjos no citoesqueleto celular, danifica a borda em escova do epitélio intestinal normal e induz a modificações subsequentes da membrana plasmática do hospedeiro que absorve o microorganismo para dentro de vesículas fagocíticas (OHL, 2001; TORTORA et al., 2012). As bactérias adentram principalmente as células M (HASE et al, 2009; KNOOP et al, 2009), um tipo de célula epitelial intestinal especializada no transporte de partículas a partir do lúmen do intestino para lâmina própria (FANCHI, 2011). As vesículas então migram até a lâmina própria e a partir daí liberam as bactérias que entram na circulação sanguínea e são absorvidas pelos nódulos linfáticos regionais e levados ao baço e ao fígado. Nestes órgãos, os microrganismos se multiplicam dentro dos macrófagos e quando a quantidade de bactérias no ambiente intracelular se eleva, as células fagocitárias sofrem lise liberando os microrganismos novamente na corrente sanguínea atingindo assim outros órgãos (VAN-DER-VELDEN et al., 2003; BIEDZKA-SAREK; SKURNIK, 2006; MARTINEZ-ARGUDO e JEPSON, 2008). Na corrente sanguínea, as bactérias

Gram-negativas se multiplicam rapidamente e ocorre um acúmulo de grande quantidade de endotoxina, o que induz macrófagos por todo o organismo a liberar mediadores inflamatórios. A liberação maciça de mediadores inflamatórios dá início à hipotensão, hipóxia tissular e morte, caracterizando o choque séptico (FRACASSO, 2008)

Em camundongos, *Salmonella* Typhimurium é capaz de promover tipicamente uma síndrome semelhante à febre tifóide (SANTOS et al., 2001; ZHANG et al., 2003; JONG et al., 2012), podendo levar o animal ao choque séptico (LIMA-FILHO et al., 2004). Além disso, *Salmonella* é um bom modelo de infecção experimental devido à capacidade de causar infecções sistêmicas a partir de inóculos pequenos e por ser encontrada e facilmente isolada de vários órgãos (PORTILLO, 2001). Apesar da via natural de infecção ser a ingestão por via oral e consequente transporte através da barreira intestinal, quando infecções experimentais são provocadas a partir de inoculos orais em camundongos, a taxa de absorção, a taxa de mortalidade e o grau de colonização nos órgãos internos são muito variáveis (observações pessoais). Desta forma, o inóculo de bactérias por via intraperitoneal é mais adequado para a produção de um modelo experimental, uma vez que todos os animais de um único grupo recebem a mesma quantidade de inóculo bacteriano que será confrontado pelo sistema imune. Uma representação esquemática de possíveis vias de inoculação é mostrada na Figura 2.

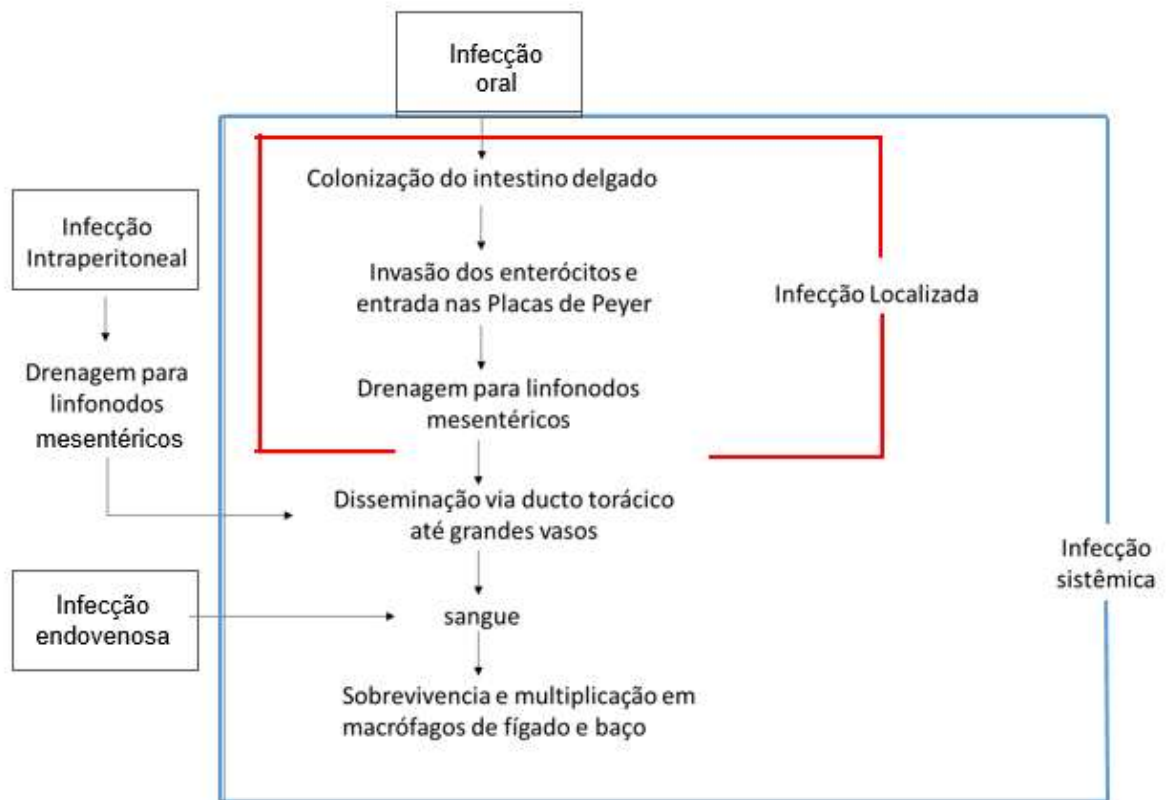


Figura 2 Representação esquemática das três vias de inoculação de *Salmonella* um modelo murino.

Fonte: Maria Taciana Ralph

2.3 Resposta Imunológica durante infecção por *Salmonella*

A inflamação é um processo fisiológico que consiste na resposta orgânica diante de lesão tissular ou infecção, envolvendo uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão (COTRAN et al., 2006). Quando um tecido íntegro sofre agressão, um complexo processo biológico é desencadeado no qual células e moléculas são recrutadas para prevenir a propagação do patógeno e reparar tecidos lesados, restaurando a integridade perdida (MONTENEGRO; FRANCO, 1999). Por outro lado, o retorno a homeostase ocorre devido a regulação desses processos inflamatórios e eliminação do agente etiológico. Já a ausência de controle do processo inflamatório pode acarretar em destruição tecidual e danos ao funcionamento de órgãos vitais. Neste caso, faz-se o uso de anti-inflamatórios, que, dentre outros efeitos, inibem a aderência e/ou migração de leucócitos através do endotélio durante o estado patológico (WAGNER e ROTH, 2000).

Infecções sépticas por bactérias gram-negativas são acompanhadas por uma resposta inflamatória sistêmica, caracterizada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias devido ao estímulo do lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede bacteriana (CAVAILLON et al., 2003). A imunidade a patógenos como a *Salmonella* requer a indução precoce de uma resposta inata que eficientemente induz a ativação da resposta imunológica mediada por células T e B (IWASAKI E MEDZHITOV, 2004). A resposta imunológica inata às bactérias intracelulares consiste principalmente em fagócitos e células Natural Killer (NK). Bactérias resistentes a degradação dentro do fagócito, estimulam as células dendríticas e os macrófagos a produzirem IL-12. Esta citocina é um potente ativador de células NK, que por sua vez, produzem INF- γ que ativa os macrófagos e promove a destruição das células fagocitadas (RUBY et al., 2012; CHANDRASEKAR et al., 2013). Além disso, os macrófagos ativados secretam mediadores da inflamação, como TNF, IL-1, IL-6, IL-8 e óxido nítrico, que trabalham em conjunto ou independentemente, para estimular respostas imunes específica e não-específica contra a invasão (FRACASSO, 2008).

O Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é um dos primeiros mediadores induzidos por lipopolisacarídeo bacteriano (LPS). Esta citocina é produzida por macrófagos e linfócitos T e tem como função estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção (BROZ et al., 2012). Além disso, o TNF participa da ativação dessas células para destruição do microorganismo, bem como da expressão de moléculas de adesão endoteliais (BENJAMIM, 2001). O TNF também estimula a secreção de IL-1, sendo um dos exemplos de uma cascata de citocinas que possuem atividades biológicas semelhantes ou complementares (COHEN, 2002) (Fig. 3).

Em uma infecção por bactérias Gram-negativo, as respostas do endotélio são mediadas por citocinas como TNF- α e IL-1, liberadas de macrófagos (FRACASSO 2008) e estas são a causa de muitas das características patológicas do choque induzido por LPS (DINARELLO, 2009; DINARELLO, 1997). Elas ativam uma cascata inflamatória que inclui citocinas, mediadores lipídicos, espécies reativas de oxigênio e regulam moléculas de adesão, o que resulta na migração celular (COHEN, 2002). No choque séptico ocorre uma produção descontrolada destas duas citocinas induzida por endotoxinas presentes na parede de bactérias Gram-negativo, e esta produção exacerbada acaba por desencadear efeitos deletérios ao hospedeiro (BILATE, 2007)

A citocina IL-6, também é um importante mediador da resposta inflamatória de fase aguda e tem como funções induzir a migração de neutrófilos e monócitos na fase inicial da inflamação (HURST et al., 2001), além de aumentar a expressão de moléculas de adesão celular em células endoteliais e linfócitos (CHEN et al., 2006).

A resposta inflamatória precisa ser rigorosamente regulada para evitar inflamação sistêmica e choque letal (FERNANDEZ-CABEZUDO et al., 2009). Dentre os mecanismos reguladores que atuam para conter a inflamação excessiva estão algumas citocinas como a Interleucina 10 (IL-10). Produzida por macrófagos e células T reguladoras, a IL-10 atua como um inibidor das respostas imunes do hospedeiro, particularmente das que envolvem macrófagos, na medida que a infecção bacteriana é erradicada (PAVLOV et al., 2003; TRACEY, 2007) (Fig. 3).

Produzido principalmente por macrófagos, o óxido nítrico (ON) é de grande importância na defesa do hospedeiro contra *Salmonella* e funciona dentre outras formas como vasodilatador (KATSUKI et al., 1977) e mediador da citotoxicidade de linfócitos efetores ativados (HIBBS et al., 1988; KIECHLE, MARLINSKI, 1993). No entanto, o ON é um mediador inflamatório bastante versátil. Em baixas concentrações, o ON é pró-inflamatório induzindo vasodilatação e o recrutamento de neutrófilos. Entretanto, em altas concentrações reprime a expressão das moléculas de adesão, suprime a ativação de leucócitos e induz a apoptose de células inflamatórias, atuando como anti-inflamatório (ROSS e RESKE-KUNZ 2001).

Apesar da importância da resposta imune inata, a resposta imunológica mediada por células é a principal protetora contra bactérias intracelulares, especialmente células T CD4. Estas células se diferenciam em linfócitos do fenótipo Th1, sob a influência do IL-12 produzida por fagócitos infectados e, em seguida, expressam ligante CD40 e secretam INF- γ , estímulos estes que ativam os macrófagos a produzirem substâncias microbidas como espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e enzimas lisossômicas (JORENS et al., 1995; ABBAS et al 2008). Segundo Walker e colaboradores (2013), INF- γ é a principal citocina do mecanismo de defesa contra patógenos intracelulares. A Figura 3 ilustra a cascata de citocinas que é ativada durante a infecção por *Salmonella*. Contudo, se *Salmonella* escapa dos vacúolos endossomais ao citosol, não será mais susceptível às substâncias bactericidas, sendo seus antígenos processados e apresentados na membrana celular via Complexo Maior de Histocompatibilidade de Classe I (MHC-I). Isto induz a resposta efetora de linfócitos T citotóxicos (T CD8) (ABBAS, et al 2008).

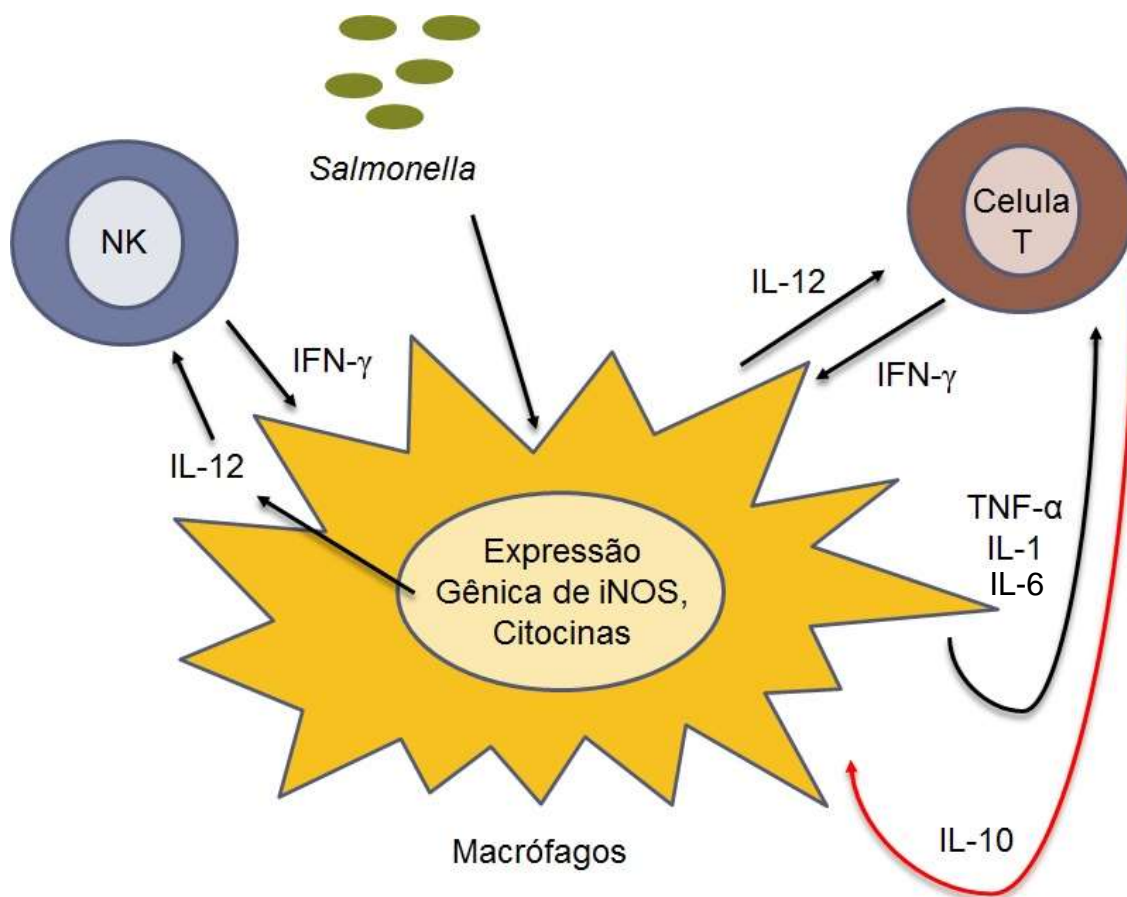


Figura 3 Representação esquemática da resposta imunológica à *Salmonella*.

Fonte: Maria Taciana Ralph

2.4 Látex e plantas laticíferas

Mais de 35.000 espécies de plantas vasculares exsudam látex e resina e, dentre estas, mais de 20.000 espécies de angiospermas de 40 famílias são reconhecidas como plantas laticíferas (KONNO, 2011). Essas plantas possuem um sistema de canais pressurizados a partir do qual o látex é produzido, acumulado e exalado, e muitas delas são reportadas por possuírem relevantes atividades biológicas e aplicações (RAMOS et al., 2006; FREITAS et al., 2010).

O látex é um líquido, geralmente de aspecto leitoso, não transparente. Inicialmente, acreditava-se que os papéis biológicos do látex eram de reserva de água para a planta, ou para excreção de resíduos de metabólitos. Atualmente, reconhece-se que o látex possui papéis defensivos para plantas contra insetos herbívoros e patógenos (AGRAWAL e KONNO, 2009; FARRELL et al., 1991; HUNTER, 1994; KONNO, 2011). Liberado por plantas que sofrem ferimentos por danos mecânicos ou por animais, o látex é constituído de componentes celulares, carboidratos, terpenóides, alcaloides, borracha e cardenólidos, bem como várias proteínas e enzimas tais como proteases, quitinases e glucosidases. Dentre estes componentes, metabólitos de natureza proteica são peças-chaves na defesa contra a herbivoria de insetos (KONNO et al., 2004; HAGEL et al., 2008; WASANO et al., 2009; RAMOS et al., 2009b).

O látex distribui-se pela planta em células alongadas, chamadas “Laticíferos”. De acordo com sua estrutura, os laticíferos são tipicamente classificados como simples (não articulados) ou compostos (articulados) (AGRAWAL e KONNO, 2009; ALDHEBIANI e JURY, 2013). Laticíferos não articulados desenvolvem-se a partir de uma célula que sofre alongamento considerável e que se ramifica durante o desenvolvimento do tecido. Os laticíferos articulados consistem de séries de células ramificadas ou não, que são geralmente alongadas. Neste tipo de célula as paredes das extremidades podem tornar-se porosas ou submetidas a lise completa (FAHN, 1979; RAZAK e BAHRI, 2000). Quando a dissolução das paredes terminais é completa, o sistema resultante tem uma aparência muito semelhante à do tipo não articulado (METCALFE, 1967). Os laticíferos desenvolvidos apresentam-se estruturalmente heterogêneos (MAUSETH, 1988). Quando o látex produzido

está sob pressão e/ou quando os laticíferos são cortados, o látex é expelido. Os tipos de laticíferos são importantes taxonomicamente para a compreensão das relações entre as subfamílias de Apocynaceae (LOPES et al., 2009). Por exemplo, os laticíferos não-articulados têm sido descritos em muitas espécies das seguintes famílias: Apocynaceae, Asclepiadaceae, Euphorbiaceae, Moraceae e Urticaceae (KHAN, 2001).

Muitos estudos têm mostrado a utilização do látex para fins medicinais, dentre esses, podemos citar a utilização do látex da espécie *Ficus pumita* no tratamento de verrugas e como possuidor de atividade anti-helmíntica, o que se dá devido a uma enzima de baixa toxicidade para mamíferos, a Ficina (GAUGHRAN, 1976; PERELLÓ et al., 2000). Outros estudos indicam que o látex da *Argemone ochroleuca* Swee poderia ser uma boa fonte de agente antifúngico contra *Drechslera halodes* e *Candida* spp. e que os fitocomponentes presentes no látex poderiam ser utilizados contra outros patógenos fúngicos (MOUSTAFA et al., 2013). Já o látex de *Jatropha mollissima* foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, enquanto que *Salmonella* Typhi foi inibida pelo látex de *Jatropha gossypifolia* (ROCHA et al., 2009). Ralph e colaboradores (2014) demonstraram a importância do látex da *Carica candamarcensis* no aumento da sobrevivência de animais infectados com *Salmonella*. Em se tratando de animais ruminantes, Buttle e colaboradores (2011), constataram que proteinases cisteínicas derivadas do látex de *Carica papaya* apresentaram interessante atividade anti-helmíntica contra *Haemonchus contortus* em carneiros.

Outra planta laticífera que vem sendo estudada é a *Calotropis procera*. Além da utilização na medicina popular, esta planta tem mostrado interessantes propriedades bioquímicas e imunológicas, discutidas a seguir.

2.5 *Calotropis procera*: propriedades gerais

A *Calotropis procera* Ait. R. Br. é uma planta produtora de látex e pertencente à família Apocynaceae (The Plant List, 2017). No Brasil, a planta é conhecida popularmente como flor-de-seda, paininha de seda, janaúba, ciúme, leiteiro e queimadeira (LORENZI, 2000; MELLO et al., 2001). É uma planta fortemente lactescente e seu látex pode ser facilmente coletado em folhas mais

jovens quando as mesmas são danificadas (RAMOS et al., 2006). A *C. procera* é um arbusto perene, ereto, pouco ramificado, alcançando de 1,5 a 3,5 metros de altura, provavelmente nativa da Índia e naturalizada em todas as regiões tropicais semiáridas da América inclusive no Brasil desde o Nordeste até o norte de Minas Gerais (LORENZI, 2000). Possui folhas grandes e flores arroxeadas dispostas em inflorescência. Os frutos são em cápsulas infladas globosas, multiplicando-se por sementes sendo disseminadas pelo vento (LORENZI, 2000; LORENZI, MATOS, 2002) (Fig. 4).

A *C. procera* é bem conhecida por possuir propriedades medicinais (KUMAR, ROY, 2007). Diferentes partes da planta têm demonstrado propriedades anti-inflamatórias, analgésica e antioxidante (ARYA, 2005; ALENCAR 2006; KUMAR, 2007). O extrato metanólico da raiz de *C. procera* (100 mg/kg) atenuou o diabetes induzido em ratos e tal efeito parece estar relacionado a regeneração de células β do pâncreas, com significativa melhora nos níveis de insulina no plasma dos ratos diabéticos (YADAV et al., 2014). Anteriormente, já havia sido observado que extratos das raízes possuem atividades anti-inflamatória e analgésica segundo ensaio realizado com animais de laboratório (BASU et al., 1991). Extratos das flores de *C. procera* foram produzidos com hexano, butanol, acetato de etila e água e demonstraram interessante atividade antibacteriana. A fração solúvel em hexano destacou-se por apresentar um amplo espectro de inibição contra *Salmonella Typhi*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* e *S. aureus* (MRSA) (ALI et al., 2014). Kumar e colaboradores (2014) demonstraram que a administração endovenosa de proteínas derivadas da cultura in vitro do calo e raízes de *C. procera* foi capaz de inibir, significativamente, a formação do edema induzido pela injeção de carragenina na pata de ratos. Kuta (2008) constatou a atividade antifúngica do extrato da casca da *C. procera* in vitro. O extrato Hidro-etanólico das flores de *C. procera* apresentou efeito hepatoprotetor contra hepatite induzida pelo paracetamol em ratos (SETTY et al., 2007).

O látex da *Calotropis procera* é fonte de diversas biomoléculas e muitas delas apresentam relevantes efeitos biológicos. Padhy et al. (2005), relatam que a aplicação do látex na pele e nas mucosas, induz uma intensa resposta inflamatória. Shivkar et al. (2003), constataram o efeito pró-inflamatório do látex

ao inocularem doses de extrato aquoso do látex na pata de camundongos, onde pode ser observado a formação do edema. Além disso, o látex da *C. procera* também apresentou atividade anti-inflamatória em diferentes modelos de inflamação (ALENCAR et al., 2004; KUMAR et al., 2007) e efeito antifúngico contra *Candida albicans* (SEHGAL et al., 2005).

A atividade anticancerígena do látex da *Calotropis procera* foi descrita por Choedon et al. (2006), os autores trataram ratos portadores de carcinoma hepatocelular com uma solução aquosa do látex, e observaram a proteção dos animais devido a ação citotóxica do extrato sobre as células cancerígenas. Figueiredo e colaboradores (2014) observaram que membranas de polivinil álcool contendo proteínas laticíferas de *C. procera* (0,2 ou 1%) aceleraram de forma significativa a cicatrização de feridas, efeito este acompanhado por fibroplasia e deposição de colágeno.

Diante dos dados mostrados acima, conclui-se que a *C. procera* é uma planta altamente promissora no que diz respeito a propriedades farmacológicas. Particularmente o seu látex, pode ser uma rica fonte de compostos bioativos capazes de serem utilizados como matéria prima na indústria farmacêutica.



Figura 4 *Calotropis procera*.

Fonte: A) www.plantaslaticiferas.ufc.br; B) Marwat et al., 2012

2.6 Frações protéicas do látex da *C. procera*

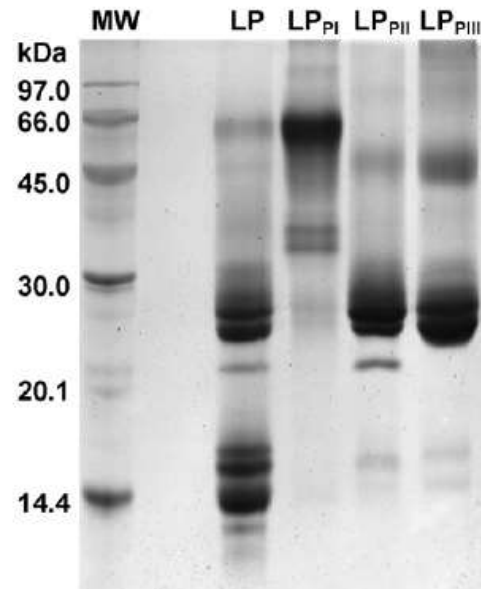
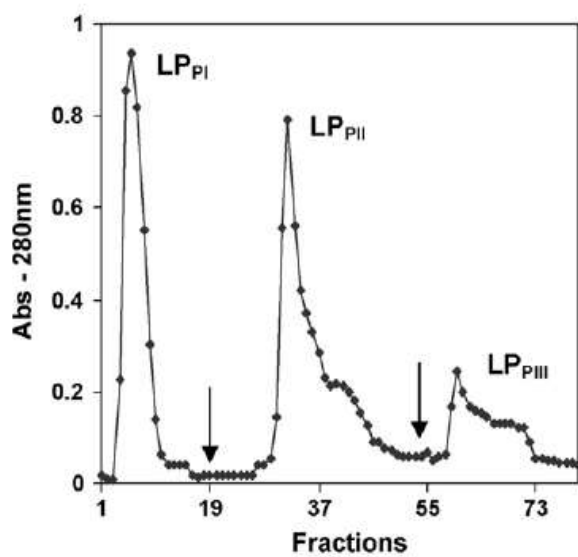
Muitos estudos têm comprovado as ações biológicas de *C. procera*, principalmente de frações protéicas derivadas do seu látex. Alencar e colaboradores (2004 e 2006) demonstraram que o látex de *C. procera* é rico em proteínas que podem ser separadas por diálise em frações dialisável (FD), fração não-dialisável (LP), além da fração rica em borracha (FB), sendo que a fração não-dialisável (LP) apresenta propriedades anti-inflamatórias. Contudo, já foi demonstrado em estudos anteriores que a fração protéica LP pode ser tanto pró-inflamatória quanto anti-inflamatória, de acordo com a via de administração (SINGH et al., 2000; SANGRAULA et al., 2001; ALENCAR et al., 2004, LIMA-FILHO et al., 2010). As proteínas presentes em LP são solúveis em água (RAMOS et al., 2006; FREITAS et al., 2007), e segundo Alencar et al. (2004), são capazes de inibir a inflamação induzida por carragenina no modelo de edema de pata e de atenuar os efeitos de cistite hemorrágica induzida em camundongos.

Além disso, Lima-Filho e colaboradores (2010) relataram que a fração LP impediu a morte de camundongos desafiados com dose letal de *Salmonella*, quando administrada 24 horas antes do desafio. Tal efeito foi possível porque o estímulo inflamatório de proteínas *C. procera* aumentou a fagocitose e equilibrou a liberação de óxido nítrico no sangue, evitando o choque séptico induzido pela infecção por *Salmonella* (OLIVEIRA et al., 2012). O efeito anti-inflamatório de LP foi avaliado sobre inflamação induzida por 5-Fluorouracil em modelo de mucosite oral. Neste caso, LP inibiu significativamente os efeitos macroscópicos e microscópicos danosos causados pela inflamação. O efeito parece estar envolvido com a inibição da enzima iNOS e dos mediadores inflamatórios COX-2 (ciclooxigenase-2), TNF e IL-1 (FREITAS et al., 2012).

Considerando que LP constitui a maioria das proteínas presentes no látex de *C. procera*, tais proteínas foram submetidas a cromatografia de troca iônica, sendo que três frações novas foram produzidas (LP_{PI}, LP_{PII} e LP_{PIII}) (RAMOS et al., 2009) (Fig. 5). Em modelo de peritonite induzida por carragenina, as três frações proteicas foram capazes de diminuir o influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal, além de diminuir a aderência de leucócitos aos vasos

sanguíneos dos animais tratados, mostrando um efeito anti-inflamatório quando administrado por via endovenosa (RAMOS et al., 2009). Chaudhary e colaboradores (2015) evidenciaram o efeito anti-inflamatório da fração LP_{PI} no modelo de inflamação induzida de edema de pata. LP_{PI} produziu uma inibição dose-dependente da formação do edema, acompanhada por normalização dos níveis de marcadores de estresse oxidativo (GSH e TBARS). A administração de LP_{PI} em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* induziu a migração de leucócitos para o foco infeccioso além de aumentar a sobrevivência dos animais tratados em até 80% (NASCIMENTO et al., 2016).

No látex de *C. procera*, sua atividade proteolítica está principalmente relacionada com proteases cisteínicas e estas proteínas se concentram na fração proteica LP_{PII}. As proteínas presentes em LP_{PII} foram reportadas como anti-inflamatória em um modelo de peritonite induzida por carragenina, reduzindo de forma independente de óxido nítrico a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal dos camundongos (RAMOS et al., 2009). Além disso, as proteases presentes no látex de *C. procera* exibiram atividades do tipo trombina e plasmina, mantendo a homeostase de coagulação em camundongos infectados com *Salmonella* (RAMOS et al., 2012). A primeira protease cisteínica isolada de *C. procera* foi a proceraina, seguida pela proceraina B e recentemente um grupo de três novos polipeptídeos foram isolados (CpCP1, CpCP2 e CpCP3) (DUBEY e JAGANNADHAM, 2003; SINGH et al., 2010; RAMOS et al., 2013). Como já mencionado, estas proteases, isoladas de LP_{PII}, demonstram interessantes propriedades farmacológicas e imunomoduladoras.



A

B

Figura 5 (A) Cromatografia de troca iônica de LP em coluna de CM-Sepharose; (B) Perfis proteicos de LP (LP_{PI}, LP_{PII}, LP_{PIII}) revelados em gel de eletroforese.

Fonte: Ramos et al., 2009

Recentemente, a partir fração proteica LP_{P11} do látex de *C. procer*, uma osmotina (CpOsm) de aproximadamente 22 KDa foi purificada e caracterizada através de processos cromatográficos, sendo a mesma caracterizada por ser abundante em resíduos de aminoácidos do tipo cisteína (FREITAS et al., 2011a). Esta proteína demonstrou interessante atividade antifúngica contra *Fusarium solani* (IC₅₀= 67,0 µg/mL), *Neurospora* sp. (IC₅₀= 57,5 µg/mL) e *Colletotrichum gloeosporioides* (IC₅₀= 32,1 µg/mL) inibindo a germinação de esporos e o crescimento vegetativo de hifas. Tal efeito se deve ao fato da CpOsm interagir com a membrana dos fungos causando extravasamento de conteúdo citoplasmático (FREITAS et al., 2011a, 2011b). A osmotina é estruturalmente e funcionalmente homóloga ao hormônio adiponectina em mamíferos, proteína com exerce papel antidiabético, antiaterogênico e atividade anti-inflamatória (NARASIMHAN et al., 2005; MIELE et al., 2011; CASELLI, 2014). Desta forma, estudos revelaram que a osmotina poderia interagir com o receptor de adiponectina favoravelmente, sugerindo que esta osmotina mimetize atividades da adiponectina humana (SOUZA, 2014). Essa similaridade funcional entre as duas proteínas foi corroborada por um estudo publicado por Arsenescu et al. (2011), que demonstrou a atividade anti-inflamatória da osmotina em um modelo murino de colite induzida. Todavia, o potencial farmacológico CpOsm ainda é desconhecido, principalmente no que diz respeito a sua ação anti-inflamatória.

No presente estudo, as propriedades anti-inflamatórias de proteases cisteínicas presentes em LP_{P11} foram investigadas como adjuvantes terapêuticos em modelo de infecção sistêmica causada por *Salmonella*. Ainda, ensaios preliminares com CpOsm foram realizados com culturas de macrófagos estimuladas com LPS para avaliar a influência desta proteína sobre as atividades apresentadas por LP_{P11}. Assim, este trabalho visa contribuir para a geração de conhecimento sobre recursos naturais da flora brasileira e desenvolvimento de novos tratamentos contra infecções graves e processos inflamatórios decorrentes

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial anti-inflamatório de proteínas do látex de *C. procera* no controle do processo inflamatório derivado de infecção sistêmica experimental por *Salmonella Typhimurium* em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Verificar a atividade antibacteriana *in vitro* da fração proteica LP_{PII} do látex de *C. procera* contra *S. Typhimurium*;
- b) Avaliar a influência da fração proteica LP_{PII} na depuração de bactérias viáveis no baço, fígado, fluido peritoneal e no sangue periférico dos animais infectados e submetidos a modelos de tratamentos preventivo e curativo;
- c) Determinar a contagem total e diferencial de leucócitos no sangue e no fluido peritoneal de animais infectados e submetidos a modelos de tratamentos preventivo e curativo;
- d) Analisar a expressão gênica de TNF, IL-1, IL-6, IL-12, IFN- γ , IL-10 e iNOS por RT-PCR no baço dos animais infectados e submetidos a modelos de tratamentos preventivo e curativo;
- e) Avaliar a sobrevivência de camundongos inoculados com a fração proteica LP_{PII} ao desafio experimental com *S. Typhimurium*;
- f) Avaliar a citotoxicidade das proteínas do látex de *C. procera* (LP_{PII}, LP_{PII}+IAA) sobre cultura primária de esplenócitos e de macrófagos peritoneais de camundongos;
- g) Avaliar a expressão gênica de TNF, IL-1 e INOS *in vitro* em culturas de esplenócitos e macrófagos peritoneais tratadas com LP_{PII} e com a osmotina (CpOsm).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os ensaios que envolveram experimentação animal foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética Experimental Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em concordância com procedimentos adotados internacionalmente (Nº da Licença: 056/2016 – UFRPE).

4.1 Obtenção das proteínas de *C. procera*

As proteínas do látex de *C. procera* foram obtidas e isoladas no Laboratório de Bioquímica Vegetal (Universidade Federal do Ceará - Fortaleza) após processos de diálise, centrifugação e cromatografia do látex. Esta etapa foi supervisionada pelo Prof. Dr. Márcio Viana Ramos. De modo geral, o látex foi coletado em tubos de plástico através de incisões no ápice caulinar de plantas saudáveis usando uma lâmina afiada e, em seguida, água destilada esterilizada foi adicionada para completar uma proporção de 1:1 (v:v). Esta solução foi submetida à centrifugação a 5.000 g (10 °C durante 10 min) e o precipitado, principalmente constituído por borracha, foi descartado. O sobrenadante foi dialisado contra água destilada (1: 10; v:v) a 8 °C durante 60 horas. Depois de ter sido centrifugado a 5.000 g (10 °C durante 10 min), um sobrenadante límpido rico em proteínas e desprovida de borracha foi obtido. Estas proteínas solúveis (LP) foram liofilizadas, e posteriormente submetidas a fracionamento por cromatografia de troca iônica numa coluna de fluxo rápido CM-Sepharose, previamente equilibrada com 50 mM de tampão de acetato (pH 5,0) de acordo com Ramos et al. (2009). Três subfrações, designadas LP_{PI}, LP_{PII} e LP_{PIII}, foram obtidas e liofilizadas, após liofilização foram armazenados à temperatura ambiente até à sua utilização. Além disso, a coleta do látex também foi realizada na presença de uma solução de 20 mM de IAA, onde a fração LP foi obtida normalmente seguindo a metodologia sumarizada anteriormente. A inibição da atividade proteolítica de LPIAA foi confirmada através de ensaio de atividade enzimática in vitro utilizando o substrato específico dessa enzima, o N-benzoil-arginina-naftilamida (BANA).

4.2 Obtenção das proteínas da osmotina

Após diálise e liofilização, a fração que tinha sido eluída com NaCl 0,2 M (LP_{PII}) foi submetida a um ciclo adicional de cromatografia de troca iônica em coluna Resource-S e em seguida a uma cromatografia líquida rápida de proteínas. O pico que eluiu com NaCl 0.1M (P2-R) representou a CpOsm (FREITAS et al. 2011a). As proteínas de LP_{PII} bem como a osmotina foram gentilmente cedidas pelo professor Marcio Ramos da UFC.

4.3 Microrganismo

Foi utilizada uma cepa virulenta de *S. Typhimurium* C5 gentilmente cedida pelo Dr. Pietro Mastroeni do Depto. de Medicina Veterinária da Universidade de Cambridge. As bactérias foram mantidas a -18 °C em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) contendo 50% de glicerol. Durante as experiências, as bactérias foram ativadas após cultura em caldo BHI durante 24 horas a 37 °C. As concentrações das suspensões bacterianas foram ajustadas em espectrofotômetro de leitura de densidade óptica para 0,5 a 600 nm.

4.4 Atividade antibacteriana *in vitro*

A atividade antimicrobiana de LP_{PII} foi avaliada através do método de diluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) (KONEMAN et al. 2008). As proteínas foram dissolvidas em salina fosfatada tamponada (PBS) para obtenção de 10 concentrações finais que variaram entre 1 mg/ml e 0,0019 mg/ml, em tubos de caldo Mueller Hinton contendo *S. Typhimurium* (10⁵ UFC / ml). Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Tubos controle não possuíam as proteínas do látex. A CIM foi estimada como sendo a concentração mais baixa que inibiu o crescimento visível após incubação durante 24 h a 37 °C (Fig. 6).

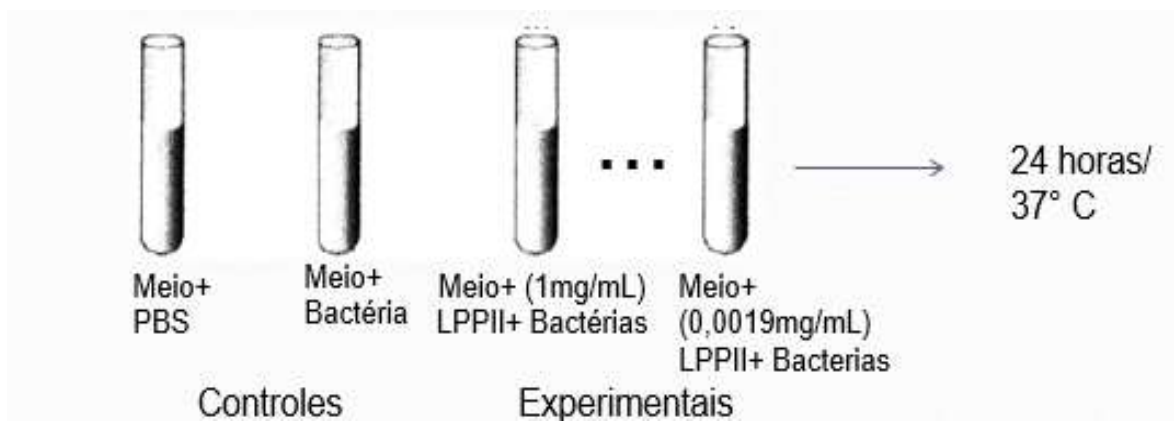


Figura 6 Representação esquemática do teste de atividade antimicrobiana *in vitro*. Foram testadas concentrações de LP_{PII} variando entre 1 mg/ml e 0,0019 mg/ml. A CIM foi estimada como sendo a concentração mais baixa que inibiu o crescimento visível após incubação durante 24 h a 37 °C.

4.5 Animais

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

4.6 Desenho experimental

Para análise *in vivo* da influência da fração proteica LP_{P_{II}} durante o processo de infecção sistêmica por *Salmonella*, dois modelos experimentais foram realizados. Inicialmente, grupos de camundongos foram submetidos a um modelo clássico de peritonite induzida por *Salmonella* cujo tratamento foi administrado de forma preventiva. Posteriormente, a fim de avaliar a influência de LP_{P_{II}} sobre um processo de infecção e inflamação já estabelecido, os animais foram desafiados com *Salmonella* e submetidos ao tratamento curativo com LP_{P_{II}}. (Fig. 7).

No modelo de tratamento preventivo, os animais foram separados em 4 grupos (n=5). O grupo experimental foi administrado por via endovenosa (ev) com 0,2 ml de LP_{P_{II}} na concentração de 10 mg/kg (em PBS estéril, pH 7,2). Os três grupos controles receberam: controle 1: LP_{P_{II}}+IAA (LP_{P_{II}} inativada com iodoacetamida) na concentração de 10mg/kg (ev), controle 2: PBS (ev) ou controle 3: dexametasona (dexa) 0,5 mg por animal (via intraperitoneal - ip). Após 30 minutos, todos os animais foram desafiados por via ip com 0,2 ml de uma solução contendo 10⁵ células de *S. Typhimurium*. Os animais foram submetidos aos procedimentos de eutanásia 6 horas após a infecção para coleta de amostras e realização de análises.

No modelo de tratamento curativo, os animais foram separados em 4 grupos (n=5), todos os grupos foram desafiados com uma solução contendo 10⁵

células de *Salmonella*. Após 24 e 48 horas da infecção, o grupo experimental recebeu 10 mg/kg de LP_{PII} por via ev, e controles receberam: controle 1- LP_{PII}+IAA na concentração de 10mg/kg (ev), controle 2: PBS (ev) ou controle 3: dexametasona 0,5 mg/kg (ip). Após 72 horas de infecção os animais foram submetidos aos procedimentos de eutanásia para realização das análises.

Para avaliação da influência de LP_{PII} sobre o aumento da sobrevivência de animais infectados, os mesmos tratamentos foram realizados e os camundongos desafiados com uma solução contendo 10⁷ células de *S. Typhimurium*. A avaliação dos sintomas clínicos e de sobrevivência após a infecção foi monitorizado a cada 24 horas.

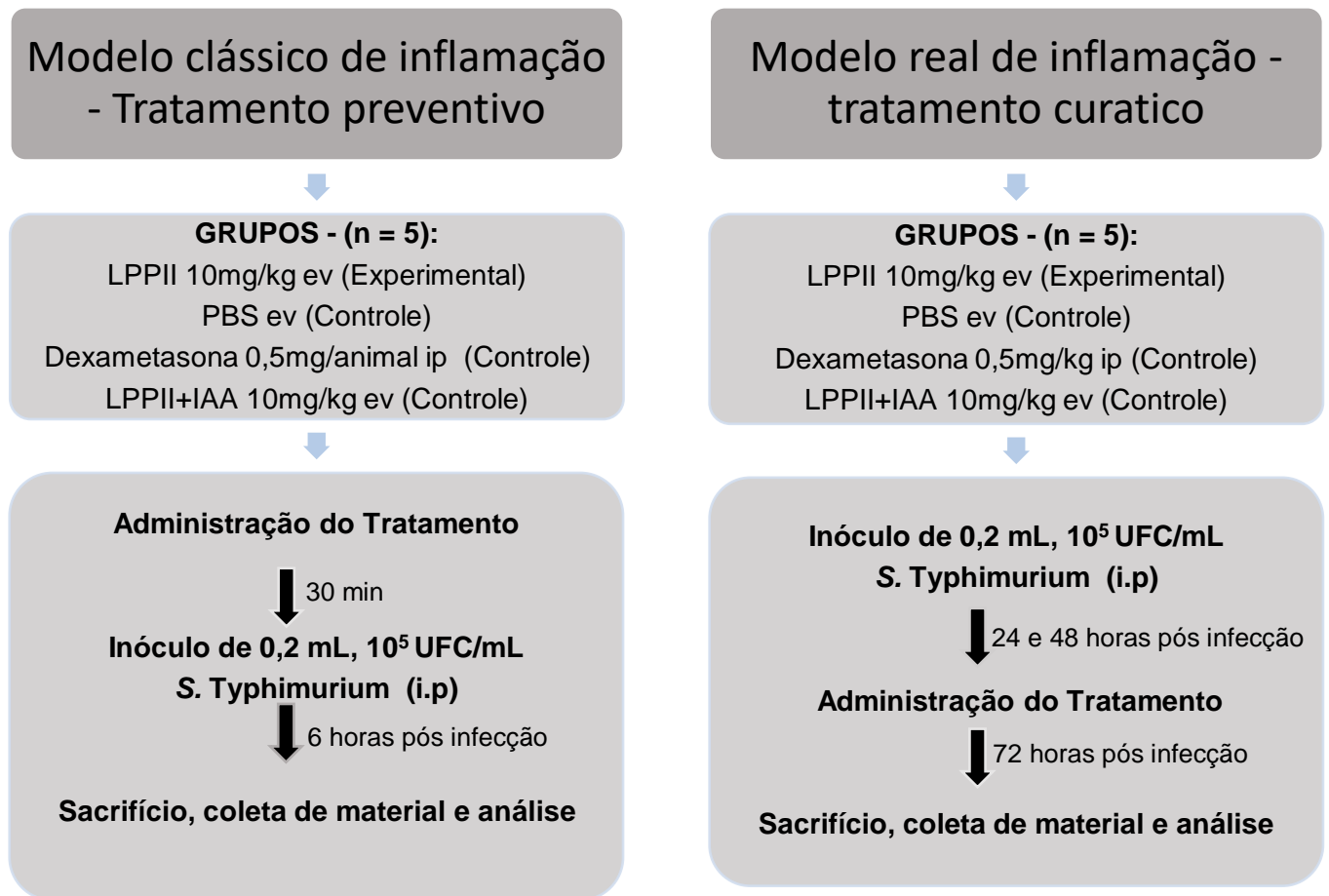


Figura 7 Representação esquemática do desenho experimental dos tratamentos *in vivo*.

Fonte: Maria Tacian Ralph

4.7 Análise do clareamento bacteriano

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

4.8 Contagem total e diferencial de leucócitos

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

4.9 Análise da expressão gênica de citocinas no baço

Uma seção do baço dos animais foi retirada assepticamente e homogeneizada em 0,5ml de TRIzol® Reagent (Invitrogen) para extração do RNA total, seguindo-se o protocolo proposto pelo fabricante. A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro a 260 nm e sua integridade confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% (OLIVEIRA et al, 2012). O RNA obtido foi utilizado como molde para síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando o kit comercial (SIGMA M-MLV Reverse Transcriptase) conforme instruções do fabricante. Para amplificação por RT PCR foi utilizado o kit comercial (SIGMA-SYBR-Green Quantitative RT-PCR KIT) conforme instruções do fabricante. Foram analisadas as expressões das citocinas pelos seguintes primers: Interleucina 1 beta (IL-1 β) (forward 5' tgagcaccttctttcctca 3'; reverse 5'

ttgtctaattggaacgtcacac 3'), Interleucina 6 (IL-6) (forward 5' taattcatatcttcaaccaagagg 3'; reverse 5' tggctcttagccactccttc 3'), Fator de Necrose Tumoral (TNF) (forward 5' ctgtagcccacgtcgtagc 3'; reverse 5' gggtgtctttgagatccatgc 3'), Interleucina (IL-10) (forward 5' catgggtcttggaagagaa 3'; reverse 5' aactggccacagtttcagg 3'), Interleucina 12 (IL-12a forward 5' atgaagctctgcatcctgct 3'; reverse 5' cagatagcccatcacctgt 3'; IL-12b forward 5' agtcccttggccagtggtg 3'; reverse 5' agcagtagcagttcccctga 3'), Interferon Gama (IFN- γ) (forward 5' actggcaaaaggatggtgac 3'; reverse 5' gctgatggcctgattgtctt 3') e a Enzima Óxido Nítrico Sintase (iNOs) (forward 5' tgtggctaccacattgaagaa 3'; reverse 5' tcatgataacgtttctggctctt 3'). O controle interno de amplificação foi feito com a enzima Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (forward 5' accacttggcatcgtggag 3'; reverse 5' gggccatccacggctctctg 3'). A análise dos resultados foi realizada de acordo com Dussault e Pouliot (2006) e para comparação da expressão dos genes de interesse (G.I) entre grupo controles e experimentais foi utilizada a seguinte formula:

$$\Delta\Delta Ct = [(CtGI_{Controle} - CtACT_{Controle}) - (CtGI_{Experimental} - CtACT_{Experimental})]$$

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

4.10 Avaliação da citotoxicidade celular de LP_{P11} em culturas primárias de esplenócitos ou macrófagos

Os ensaios foram conduzidos com culturas primárias de esplenócitos ou macrófagos peritoneais (pMØ) obtidos de camundongos. As células foram ressuspensas em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado com penicilina (100 μ g/ mL) e estreptomicina (100 μ g/ mL). Logo após a obtenção, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer pelo método de exclusão celular com azul de Tripán e ajustadas para conter 1 x 10⁷ cél./ mL. Cerca de 200 μ L da suspensão celular foi semeado em placas estéreis

de 96 poços (2×10^6 cél./ mL) em triplicata e exposto à diferentes concentrações das frações proteicas LP_{P11} e LP_{P11}+IAA [400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL]. As amostras foram incubadas em estufa à 37° C sob atmosfera com 5 % de CO₂ para análise da viabilidade celular após 4 horas do estímulo proteico. Após estes tempo, foi adicionado em cada poço 20 µL de resazurina (0,15 mg/mL em PBS estéril), sendo as placas incubadas por mais 4h/37°C. Em seguida, foram realizadas leituras de densidade óptica a 630nm em espectrofotômetro para determinação da citotoxicidade. Considerando os resultados obtidos no ensaio de viabilidade, duas concentrações finais das proteínas (100 e 10 µg/mL) foram utilizadas para avaliar a expressão gênica de citocinas em culturas de macrófagos peritoneais e esplenócitos. Para avaliação de citocinas, as culturas celulares foram preparadas como descrito acima, sendo o teste conduzido em placas de 24 poços.

4.11 Avaliação da influência de CpOsm sobre macrófagos estimulados com LPS.

Os macrófagos foram coletados como descrito anteriormente. O teste foi conduzido em placas de 24 poços. Os macrófagos foram estimulados com 5µg/ml de LPS. Duas horas após o estímulo, foram adicionados aos poços experimentais uma solução de CpOsm para obtenção de uma concentração final de 10µg/ml. 24 horas após o tratamento com osmotina, foi realizada a extração de RNA e análise de citocinas.

4.12 Determinação da mensagem de síntese de citocinas em culturas celulares expostas a LP_{P11}

Extração de RNA

A extração de RNA total dos macrófagos e esplenócitos submetidos aos ensaios foi realizada de acordo com protocolo adaptado de Nascimento et al., (2016). De maneira geral, após o estímulo com as proteínas, as placas de cultura celular foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas com PBS gelado estéril e, a seguir, foi adicionado 400 µL de Trizol

(Sigma, St Louis, MO, USA) para lise química das células. A lise das células foi também realizada mecanicamente arrastando-se ponteiros estéreis no fundo dos poços. As células foram transferidas para novos tubos contendo 100 µL de clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados em vortex por 15 segundos e deixados descansar por 5 minutos em temperatura ambiente. A seguir, os mesmos foram centrifugados por 5 minutos (10.000 rpm) e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, sendo estes adicionados de 200 µL de isopropanol. Esta solução foi misturada gentilmente e deixada descansar por 5 min. As amostras foram centrifugadas à 13.500 rpm durante 30 minutos. Após este tempo, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o peletes obtido foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% (13.000 rpm, 5 min). Finalmente, o sobrenadante foi descartado e os peletes formados deixados secar em temperatura ambiente. O RNA total obtido foi suspenso em 20 µl de água ultrapura estéril e quantificado em espectrofotômetro (2 µL RNA total + 498 µL de água destilada), cuja leitura foi realizada a 260 nm.

Preparação do cDNA

O RNA total obtido foi utilizado como molde para síntese de DNA complementar (cDNA). Para isto, foi usado o kit comercial (SIGMA M-MLV Reverse Transcriptase) conforme instruções do fabricante.

Amplificação do cDNA

Para amplificação por RT PCR foi utilizado o kit comercial (SIGMA-SYBR-Green Quantitative RT-PCR KIT) conforme instruções do fabricante. Neste aspecto foi analisada a amplificação das citocinas: Interleucina 1 beta (IL-1β), Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-α), Interleucina (IL-10) e a Enzima Óxido Nítrico Sintase (iNOs), de acordo com primers específicos. O controle interno de amplificação foi feito com a enzima Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

A análise dos resultados foi realizada de acordo com Dussault e Pouliot (2006) e para comparação da expressão dos genes de interesse (G.I) entre grupo controles e experimentais foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = [(CtGI_{Controle} - CtACT_{Controle}) - (CtGI_{Experimental} - CtACT_{Experimental})]$$

Na fórmula acima, GI representa os valores de Ct (Cycle Threshold) dos genes de interesse que foram observados nos grupos experimentais (estimulados com as proteínas), cujos resultados foram expressos em termos de variação relativa aos grupos controles (não estimulado) utilizando a fórmula $2^{\Delta\Delta CT}$

4.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Para comparação múltipla dos dados não paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni ou Student Newman-Keuls. Os dados foram considerados estatisticamente significativos com valores de $p < 0,05$. Para análise e processamento dos resultados, foi utilizado o programa Graphpad Prism5.

5. RESULTADOS

Com o intuito de investigar a ação direta das proteínas sobre *S. Typhimurium*, a atividade antibacteriana in vitro da fração proteica LP_{PII} foi avaliada. Não houve inibição do crescimento bacteriano na maior concentração testada (1 mg/ml).

Nos testes de infecção in vivo, foi analisado o efeito da administração endovenosa de LP_{PII} em animais desafiados com *Salmonella Typhimurium*. Inicialmente, o efeito de LP_{PII} foi avaliado em um modelo de peritonite cujo esquema de tratamento foi o preventivo. Neste caso, os animais eram administrados com as proteínas e em seguida desafiados com *Salmonella*. Após 6 horas do início da infecção, não houve diferença significativa do número de bactérias no baço, fígado, sangue e fluido peritoneal dos animais infectado, entre os grupos experimentais e controles ($p > 0,05$) (Fig. 8).

O pré-tratamento com 10mg/Kg de LP_{PII}, entretanto, reduziu significativamente a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal dos animais em comparação ao grupo controle não tratado ou ao grupo controle tratado com dexametasona. Este efeito foi revertido quando as proteínas foram tratadas com iodoacetamida ($p < 0,05$) (Fig. 9A). No sangue, o pré-tratamento com LP_{PII} aumentou o número de leucócitos circulantes em relação aos animais controles ($p < 0,05$) (Fig. 9B). A contagem diferencial de leucócitos demonstrou um aumento no número de linfócitos nos animais tratados com LP_{PII} quando comparados aos grupos PBS ou dexametasona, no entanto, quando as proteínas foram inativadas com IAA houve uma diminuição do número de linfócitos em relação ao grupo controle PBS ($p < 0,05$) (Tab. 1). Não houve alterações em relação ao número de eosinófilos, monócitos e basófilos (Tab. 1).

Não foi possível observar a expressão gênica de iNos, IFN- γ , IL-1 ou IL-6 em nenhum dos grupos analisados. Houve uma diminuição nos níveis de expressão de TNF- α nos animais tratados com as proteínas (Fig. 10A). Os grupos tratados com as proteínas mostraram uma leve alteração das subunidade IL-12p35 e IL-12p40 quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) (Fig. 10B e 10C). A avaliação de transcritos de mRNA de IL-10, confirmou uma leve redução nos grupos LP_{PII} e LP_{PII}+IAA, no entanto, essa produção não apresentou

diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) (Fig. 10D). Camundongos pré-tratados com um único inóculo de LP_{PII} (10mg/kg) ou LP_{PII}+IAA (10mg/kg) 30 minutos antes do desafio bacteriano não apresentaram um aumento na taxa de sobrevivência e sucumbiram igualmente ao grupo controle até o terceiro dia após a infecção por *Salmonella* (Fig. 11).

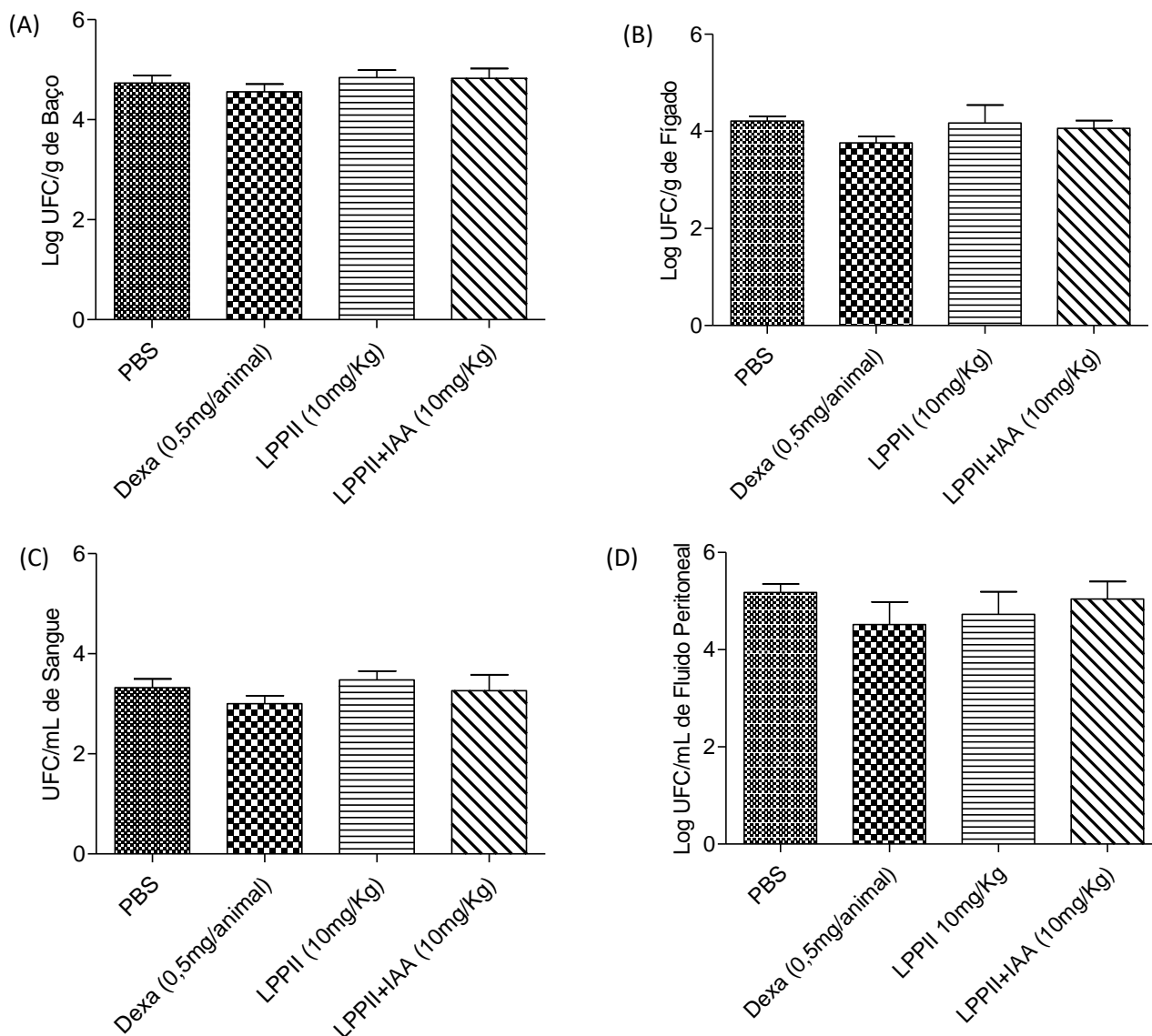


Figura 8 Contagem de bactérias viáveis em animais controles e experimentais após infecção com *Salmonella Typhimurium* durante tratamento preventivo. Os camundongos foram tratados com 10 mg/kg de LP_{PiI} ou 10mg/Kg de LP_{PiI}+IAA (ev), ou PBS (ev), ou dexametasona (0,5mg/animal) (ip). Após 30 minutos os animais foram desafiados com 200 μ L de uma suspensão bacteriana (10^5 UFC/mL) por via ip. A quantificação bacteriana foi realizada 6 horas após a infecção. Os níveis de bactérias foram avaliados no baço (A), fígado (B), sangue (C) e fluido peritoneal (D). Os resultados são expressos como média \pm EPM e comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. O intervalo de confiança foi determinado com $p < 0,05$

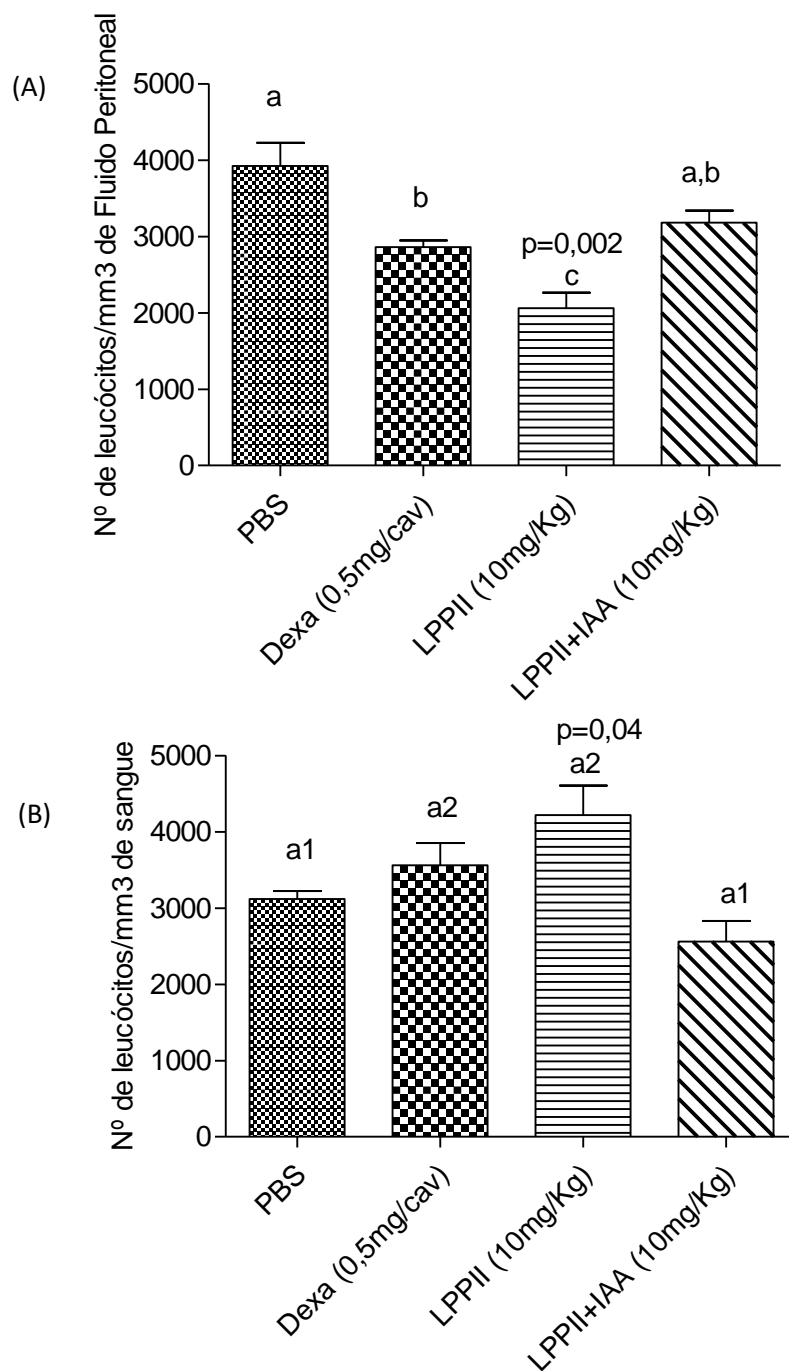


Figura 9 Contagens totais de leucócitos no fluido peritoneal (A) e no sangue (B) de camundongos pré-tratados com LP_{PII} no modelo de peritonite induzido por *Salmonella Typhimurium*. Os camundongos foram tratados com 10 mg/kg de LP_{PII} ou 10mg/Kg de LP_{PII}+IAA (ev), ou PBS (ev), ou dexametasona (0,5mg/animal) (ip). Após 30 minutos os animais foram desafiados com 200 μ L de uma suspensão bacteriana (10^5 UFC/mL) por via ip. A quantificação de leucócitos de todos os grupos foi avaliada 6 horas após a administração da bactéria. Os resultados são expressos como média \pm EPM. Letras diferentes indicam $p < 0,05$ de acordo com o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Valor de p referente ao grupo PBS.

Tabela 1 Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue de animais controles e experimentais após infecção com *Salmonella* Typhimurium. Os camundongos foram pré-tratados com 10 mg/kg de LP_{PII} ou 10mg/Kg de LP_{PII}+IAA (ev), ou PBS (ev), ou dexametasona (0,5mg/animal) (ip). Após 30 minutos os animais foram desafiados com 200 µL de uma suspensão bacteriana (10⁵ UFC/mL) por via ip. A contagem foi realizada 6 horas após a administração da bactéria. Os resultados são expressos como média ± EPM e comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. O intervalo de confiança foi determinado com p <0,05. *= Diferença significativa em relação ao grupo PBS

Grupos		Total de leucócitos (10 ³ cells/mm ³)	Contagem diferencial de leucócitos (10 ³ células/mm ³)				
			Eosinófilo	Linfócito	Neutrófilo	Monócito	Basófilo
6 horas após desafio	PBS	3,12 ± 0,23	0,00± 0,0	2,25 ± 0,05	0,87 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,0 ± 0,0
	DEXA	3,56 ± 0,65	0,00± 0,0	2,27 ± 0,33	1,30 ± 0,33	0,00 ± 0,00	0,0 ± 0,0
	10mg/kg LP _{PII}	4,22 ± 0,86*	0,00± 0,0	3,24 ± 0,28*	0,97 ± 0,26	0,01 ± 0,01	0,0 ± 0,0
	10mg/kg LP _{PII} +IAA	2,56 ± 0,60	0,0 ± 0,0	1,97 ± 0,15*	0,59±0,15*	0,00 ± 0,0	0,0 ± 0,00

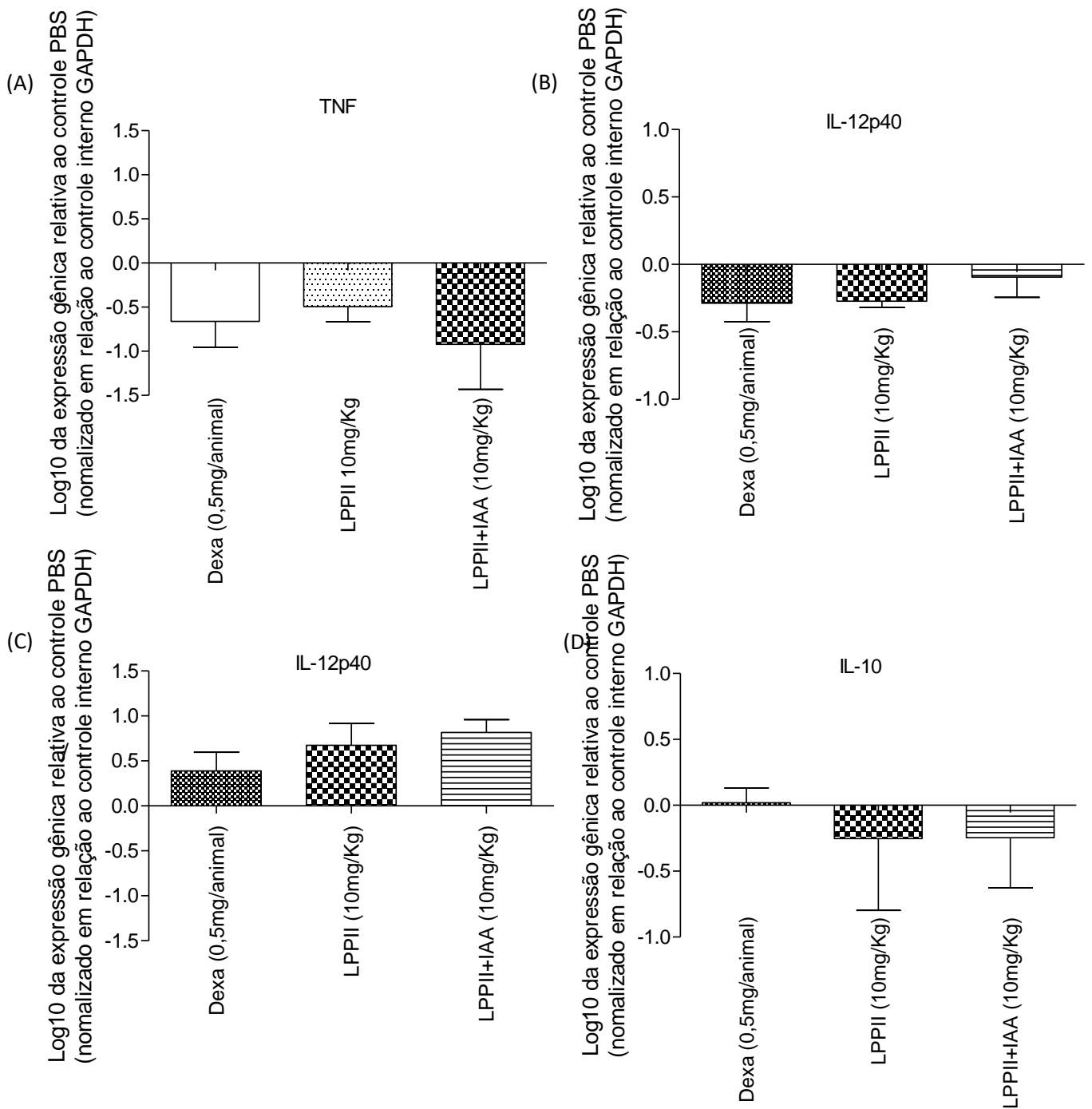


Figura 10 Expressão gênica de TNF(A), IL-12p35 (B), IL-12p40 (C), IL-10 (D) relativas a camundongos do grupo controle PBS durante tratamento preventivo. Os camundongos foram tratados com 10 mg/kg de LP_{PII} ou 10mg/Kg de LP_{PII}+IAA (ev), ou PBS (ev), ou dexametasona (0,5mg/animal) (ip). Após 30 minutos os animais foram desafiados com 200 μ L de uma suspensão bacteriana (10^5 UFC/mL) por via ip. A expressão gênica das citocinas foi avaliada 6 horas após a administração da bactéria. Os resultados são expressos como média \pm EPM e a comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. O intervalo de confiança foi determinado com $p < 0,05$.

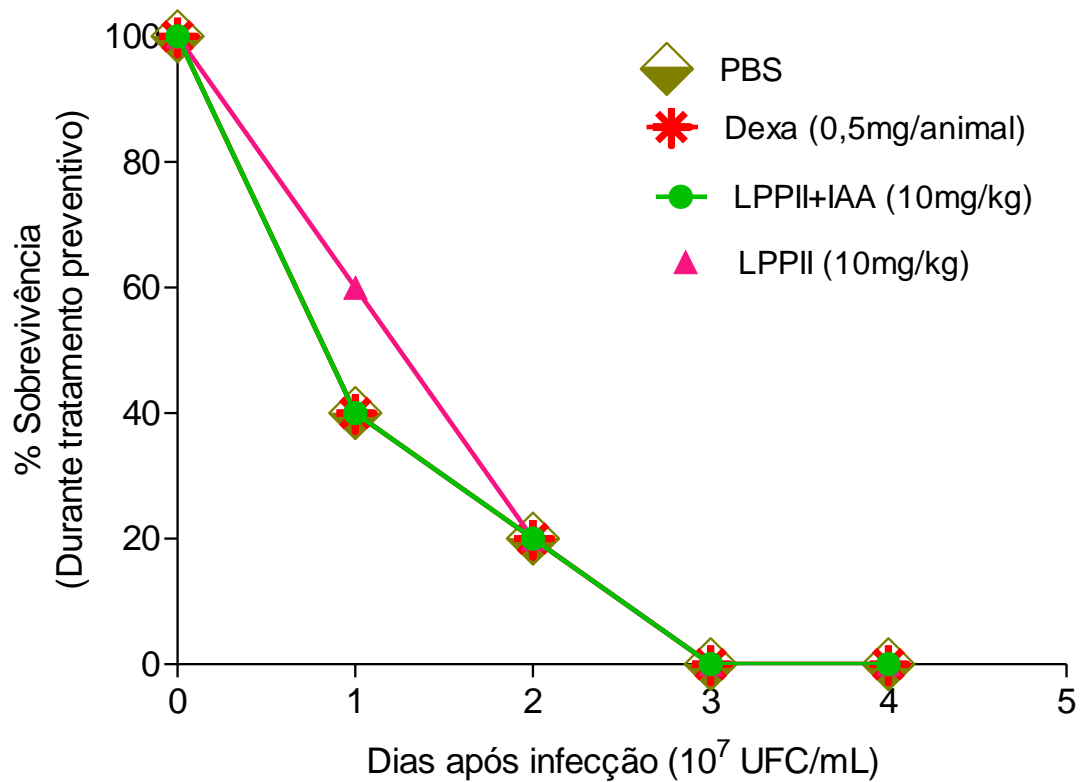


Figura 11 Taxa de sobrevivência de camundongos pré-tratados com LP_{P_{II}} no modelo de peritonite induzido por *Salmonella* Typhimurium. Os camundongos foram tratados com 10 mg/kg de LP_{P_{II}} ou 10mg/Kg de LP_{P_{II}}+IAA (ev), ou PBS (ev), ou dexametasona (0,5mg/animal) (ip). Após 30 minutos os animais foram desafiados com 200 µL de uma suspensão bacteriana (10⁷ UFC/mL) por via ip. A avaliação dos sintomas clínicos e de sobrevivência após a infecção foi acompanhada a cada 24 horas

No esquema de tratamento curativo, os animais foram desafiados com *Salmonella*, e após o estabelecimento real do processo inflamatório, os camundongos foram tratados durante dois dias consecutivos com as proteínas. O número de bactérias viáveis no baço, no fígado, no sangue e no fluido peritoneal não diferiu significativamente entre os animais tratados com LP_{P11} e controles ($p > 0,05$) (Fig. 12). Contudo, houve redução significativa da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal nos animais infectados em comparação ao grupo controle não tratados ou controle dexametasona após 72 horas da infecção ($p < 0,05$) (Fig. 13A), sendo este efeito revertido quando as proteínas foram tratadas com iodoacetamida. A fração proteica LP_{P11} também foi capaz de reduzir o número de leucócitos circulantes no sangue, efeito este não observado quando os animais foram administrados com LP_{P11}+IAA ($p < 0,05$) (Fig. 13B). A análise da contagem diferencial de leucócitos no sangue revelou uma redução no número de linfócitos do grupo LPP₁₁ quando comparado ao controle PBS. Não houve alterações no perfil hematológico das populações de neutrófilos, basófilos, monócitos e eosinófilos no sangue dos animais submetidos ao tratamento curativo (Tab. 2).

Não houve produção de transcritos de iNos, IL-1 ou IL-6 em nenhum um dos grupos. A observação de transcritos de TNF e IFN em células do baço confirmou pequena redução nos grupos tratados com LP_{P11} ou LP_{P11}+IAA 72 horas após a infecção (Fig. 14A e 14B). A expressão gênica de IL-12 também mostrou uma diminuição relativa no grupo tratado com LP_{P11} (Fig. 14C e 14D). O tratamento curativo com as proteínas não foi capaz de aumentar a taxa de sobrevivência dos animais infectados com *Salmonella* (Fig. 15).

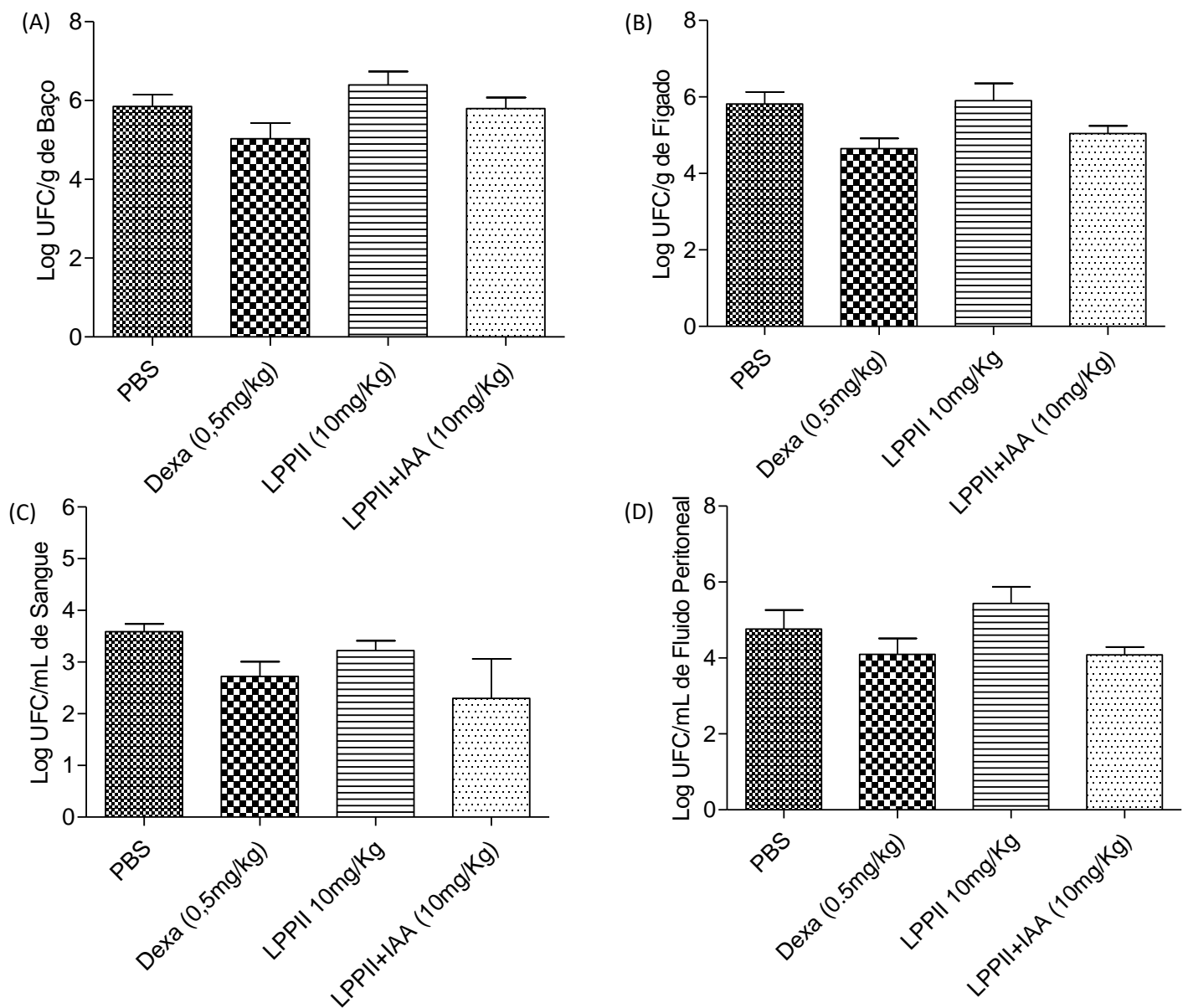


Figura 12 Contagem de bactérias viáveis em animais controles e experimentais após infecção com *Salmonella* Typhimurium durante tratamento curativo. Os camundongos foram desafiados (ip) com 200 μ l de uma solução contendo 10^5 UFC/mL de *Salmonella*. Após 24 e 48 horas da infecção, os mesmos receberam 10 mg/kg de LP_{Pil} ou 10mg/Kg de LP_{Pil}+IAA (ev), ou PBS (ev), ou dexametasona (0,5mg/kg) (ip). Após 72 horas da infecção os animais foram submetidos aos procedimentos de eutanásia para realização das análises. Os níveis de bactérias foram avaliados no baço (A), fígado (B), sangue (C) e fluido peritoneal (D). Os resultados são expressos como média \pm EPM e comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. O intervalo de confiança foi determinado com $p < 0,05$

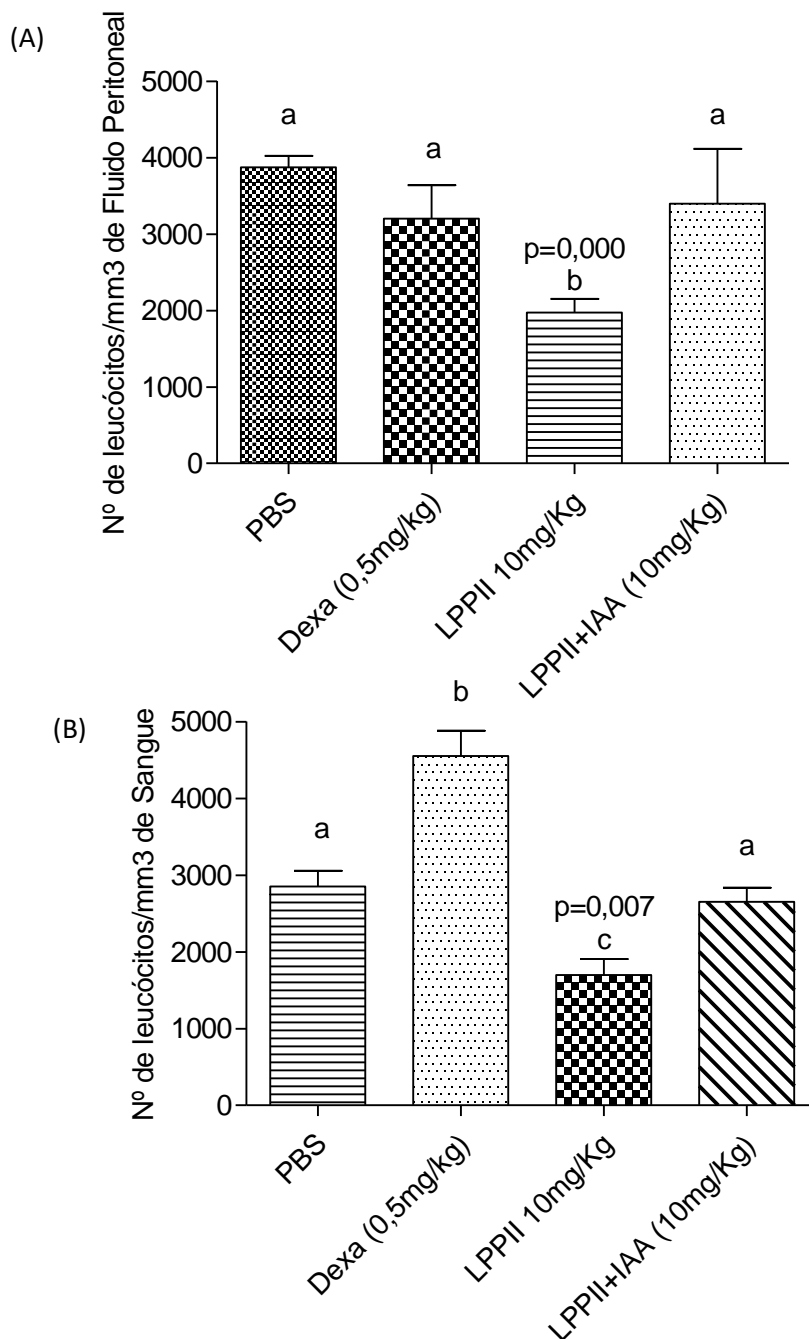


Figura 13 Contagens totais de leucócitos no fluido peritoneal (A) e no sangue (B) de camundongos tratados com LP_{PII} no modelo de peritonite induzido por *Salmonella* Typhimurium. Os camundongos foram desafiados (ip) com 200 μ l de uma solução contendo 10^5 UFC/mL de *Salmonella*. Após 24 e 48 horas da infecção, os mesmos receberam 10 mg/kg de LP_{PII} ou 10mg/Kg de LP_{PII}+IAA (ev), ou PBS (ev), ou dexametasona (0,5mg/kg) (ip). A quantificação de leucócitos de todos os grupos foi avaliada 72 horas após a infecção. Os resultados são expressos como média \pm EPM. Letras diferentes indicam $p < 0,05$ de acordo com o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Valor de p referente ao grupo PBS.

Tabela 2 Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue de animais controles e experimentais após infecção com *Salmonella* Typhimurium. Os camundongos foram desafiados (ip) com 200 µl de uma solução contendo 10⁵ UFC/mL de *Salmonella*. Após 24 e 48 horas da infecção, os mesmos receberam 10 mg/kg de LP_{P11} ou 10mg/Kg de LP_{P11}+IAA (ev), ou PBS (ev), ou dexametasona (0,5mg/kg) (ip). A contagem foi realizada 72 horas após a administração da bactéria. Os resultados são expressos como média ± EPM e a comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. O intervalo de confiança foi determinado com p <0,05. *= Diferença significativa entre em relação ao grupo PBS

	Grupos	Total de leucócitos (10 ³ cells/mm ³)	Contagem diferencial de leucócitos (10 ³ células/mm ³)				
			Eosinófilo	Linfócito	Neutrófilo	Monócito	Basófilo
72 horas após desafio	PBS	2,85 ± 0,41	0,00± 0,0	2,13 ± 0,27	0,70 ± 0,26	0,01 ± 0,01	0,0 ± 0,0
	DEXA	4,55± 0,66	0,00± 0,0	3,61 ± 0,26	0,93 ± 0,26	0,00 ± 0,00	0,0 ± 0,00
	10mg/kg LP _{P11}	1,70 ± 0,42*	0,00± 0,0	1,01 ±0,10*	0,67 ± 0,09	0,01 ± 0,01	0,0 ± 0,0
	10mg/kg LP _{P11} +IAA	2,65 ± 0,37	0,0 ± 0,0	1,99 ± 0,12	0,65 ± 0,12	0,00 ± 0,00	0,0 ± 0,00

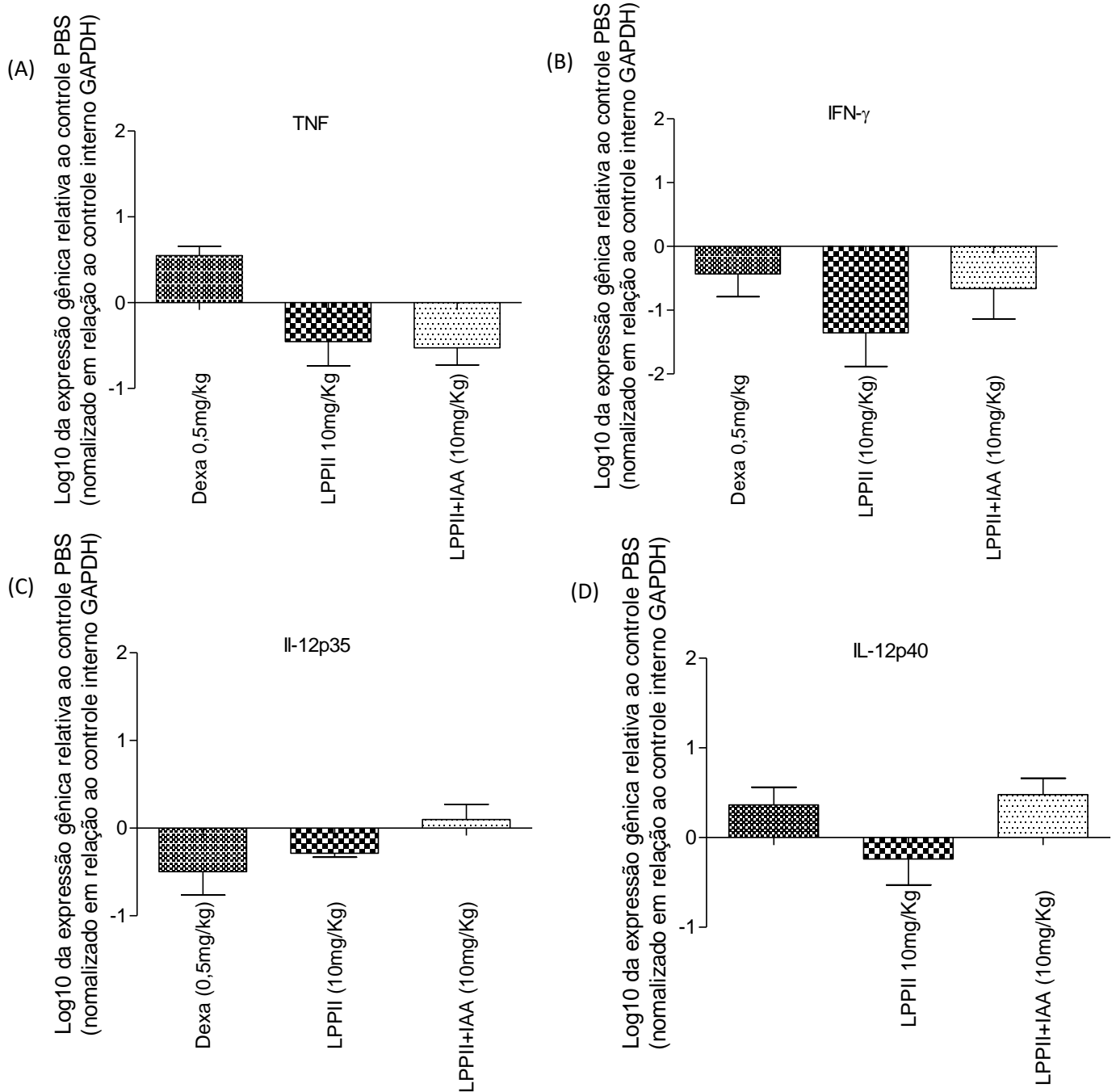


Figura 14 Expressão gênica de TNF (A), IFN- γ (B), IL-12p35 (C), IL-12p40 (D), IL-10 (E) relativas a camundongos do grupo controle PBS durante tratamento curativo. Os camundongos foram desafiados (ip) com 200 μ l de uma solução contendo 10^5 UFC/mL de *Salmonella*. Após 24 e 48 horas da infecção, receberam 10 mg/kg de LP_{P_{II}} ou 10mg/Kg de LP_{P_{II}}+IAA (ev), ou PBS (ev), ou dexametasona (0,5mg/kg) (ip). 72 horas após a infecção os animais foram submetidos aos procedimentos de eutanásia para realização das análises. Os resultados são expressos como média \pm EPM e comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. O intervalo de confiança foi determinado com $p < 0,05$

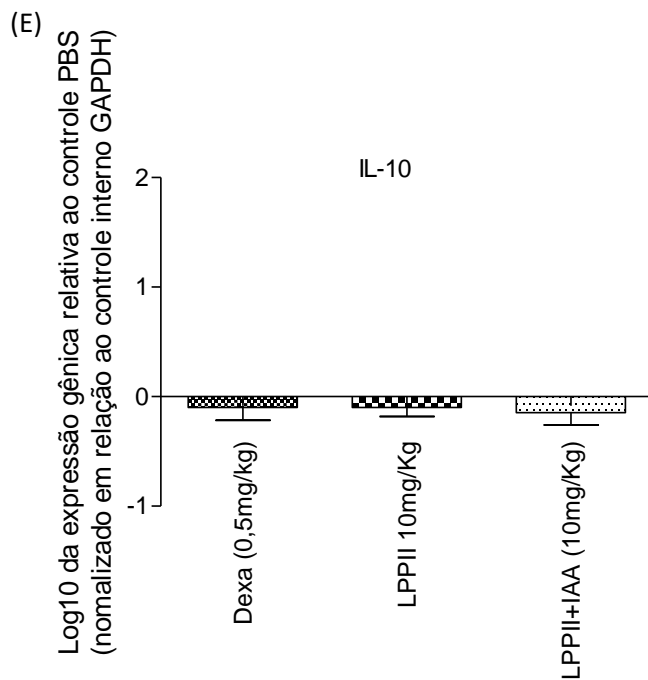


Figura 14 Expressão gênica de TNF (A), IFN- γ (B), IL-12p35 (C), IL-12p40 (D), IL-10 (E) relativas a camundongos do grupo controle PBS durante tratamento curativo. Os camundongos foram desafiados (ip) com 200 μ l de uma solução contendo 10^5 UFC/mL de *Salmonella*. Após 24 e 48 horas da infecção, receberam 10 mg/kg de LP_{PII} ou 10mg/Kg de LP_{PII}+IAA (ev), ou PBS (ev), ou dexametasona (0,5mg/kg) (ip). 72 horas após a infecção os animais foram submetidos aos procedimentos de eutanásia para realização das análises. Os resultados são expressos como média \pm EPM e comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. O intervalo de confiança foi determinado com $p < 0,05$

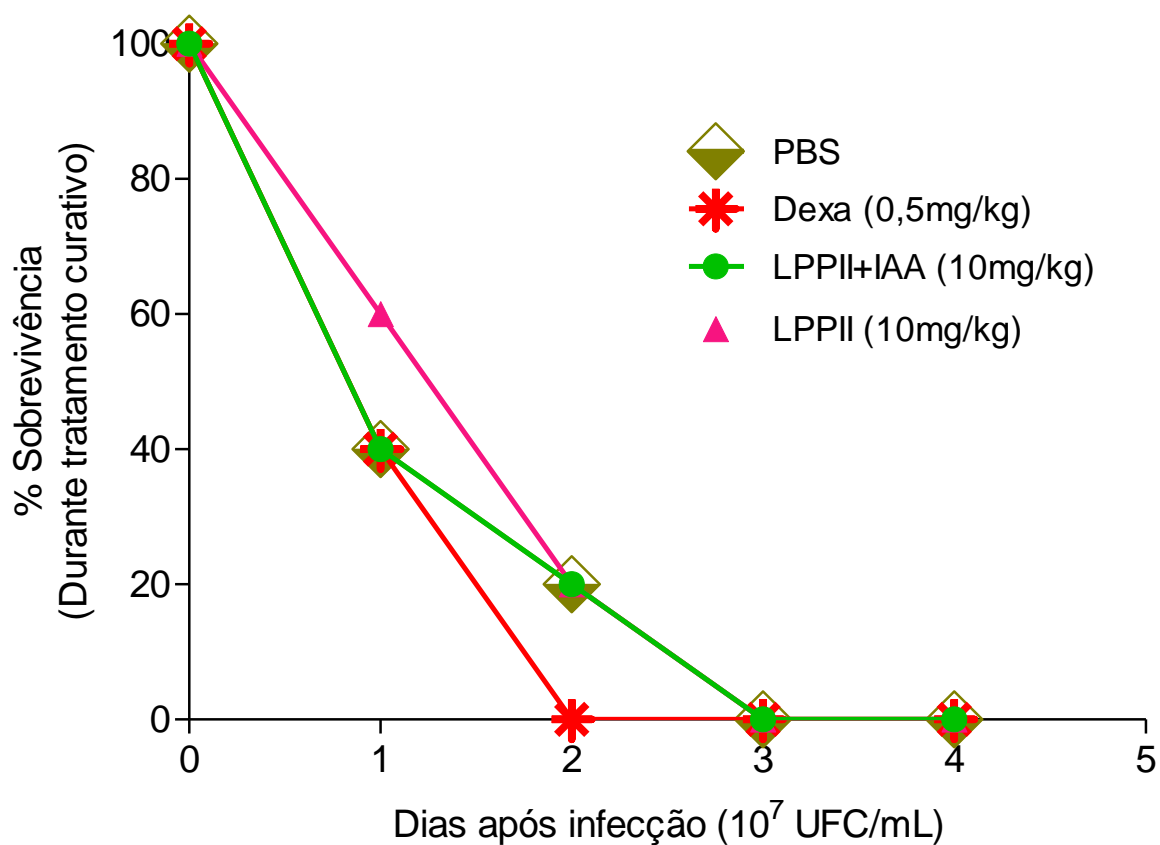


Figura 15 Taxa de sobrevivência de camundongos tratados no modelo de peritonite induzido por *Salmonella Typhimurium*. Os camundongos foram desafiados (ip) com 200 μ l de uma solução contendo 10^5 UFC/mL de *Salmonella*. Após 24 e 48 horas da infecção, receberam 10 mg/kg de LP_{PII} ou 10mg/Kg de LP_{PII}+IAA (ev), ou PBS (ev), ou dexametasona (0,5mg/kg) (ip). A avaliação dos sintomas clínicos e de sobrevivência após a infecção foi acompanhada a cada 24 horas.

Os testes preliminares com cultura primária de esplenócito demonstraram que após o estímulo das células com LP_{PII} e LP_{PII}+IAA por quatro horas, as duas frações proteicas apresentaram baixa toxicidade, sendo a viabilidade celular superior a aproximadamente 90% quando utilizada a dosagem mais alta de proteínas (400 µg/mL) (Fig, 16A e 16B). Em cultura de pMØ, no mesmo tempo de análise, as frações proteicas LP_{PII} e LP_{PII}+IAA demonstraram baixa toxicidade, diminuindo a viabilidade celular dos macrófagos em aproximadamente 13% nas concentrações proteicas maiores que 100 µg/mL (Fig, 16C e 16D).

O estímulo dos esplenócitos com LP_{PII} culminou em um aumento da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-1, no entanto, o tratamento das proteínas com iodoacetamida reverteu tal efeito. Também observamos uma redução na expressão gênica de iNOS no grupo tratado com LP_{PII} (Fig. 17). A cultura de pMØ estimulado com LP_{PII} demonstrou um aumento na expressão de TNF-α e IL-1, no entanto tal efeito não foi observado quando as proteínas foram inativadas com IAA. A expressão gênica de iNOS foi reduzida nos grupos tratados (Fig. 18).

Considerando os resultados já relatados sobre a atividade anti-inflamatória da osmotina, este trabalho buscou avaliar se CpOsm, isolada a partir da fração LP_{PII}, seria capaz de alterar a expressão de citocinas inflamatórias influenciando assim nos efeitos demonstrados por LP_{PII}. Para isto, foi realizado um teste em cultura de macrófagos peritoneais estimulado com LPS. Os resultados demonstraram que o tratamento com a CpOsm aumentou levemente a expressão de TNF-α e iNOS nos grupos tratados. Mas houve uma diminuição significativa da expressão gênica de IL-1 no grupo tratado com CpOsm (Fig. 19).

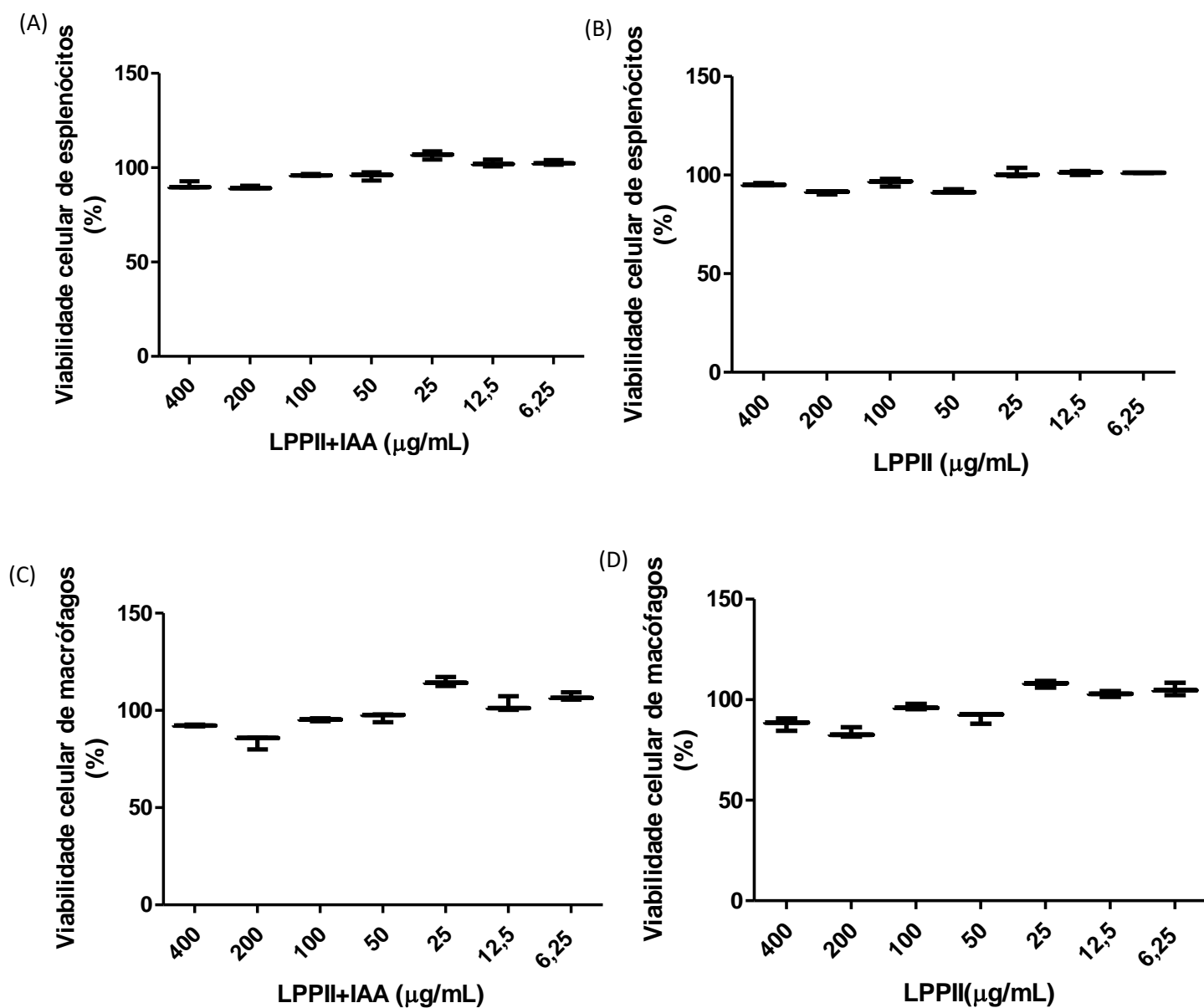


Figura 16 Viabilidade celular de esplenócitos e macrófagos tratados com proteínas do látex de *C. procera*. A) esplenócito tratados com LP_{PII}+IAA, B) esplenócito tratados com LP_{PII}, C) macrófagos tratados com LP_{PII}+IAA, D) macrófagos tratados com LP_{PII}. As culturas foram tratadas com as proteínas e 4 horas após o início do tratamento a viabilidade foi mensurada.

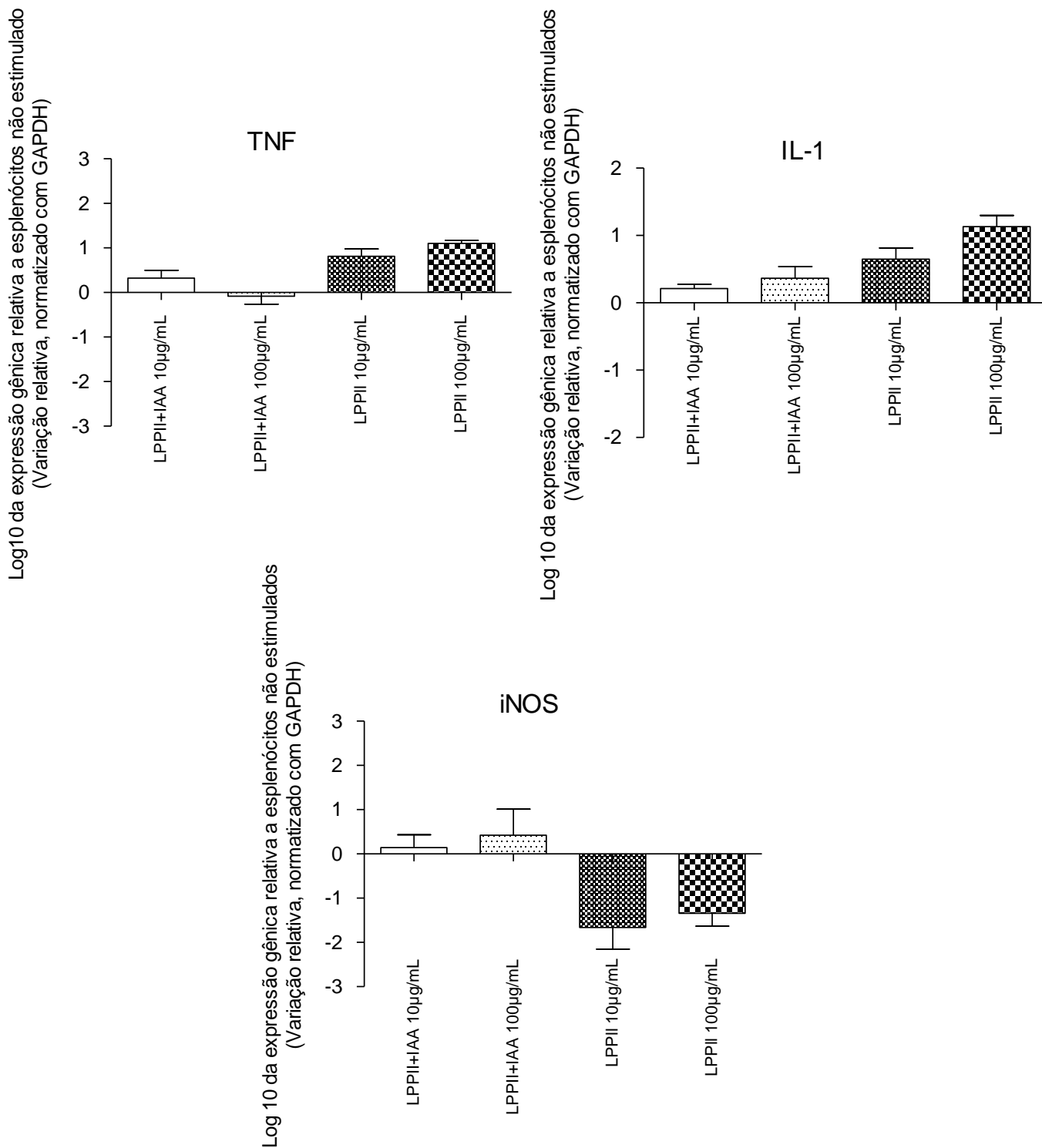


Figura 17 Expressão gênica das citocinas TNF, IL-1 e INOS em culturas de esplenócitos tratadas com as proteínas do látex de *C. procera*. As culturas foram estimuladas com as frações LP_{PII} e LP_{PII}+IAA. A extração do RNA total foi feita 4 horas após o tratamento. Como controle interno da reação de rt-pcr foi utilizada a expressão gênica de GAPDH.

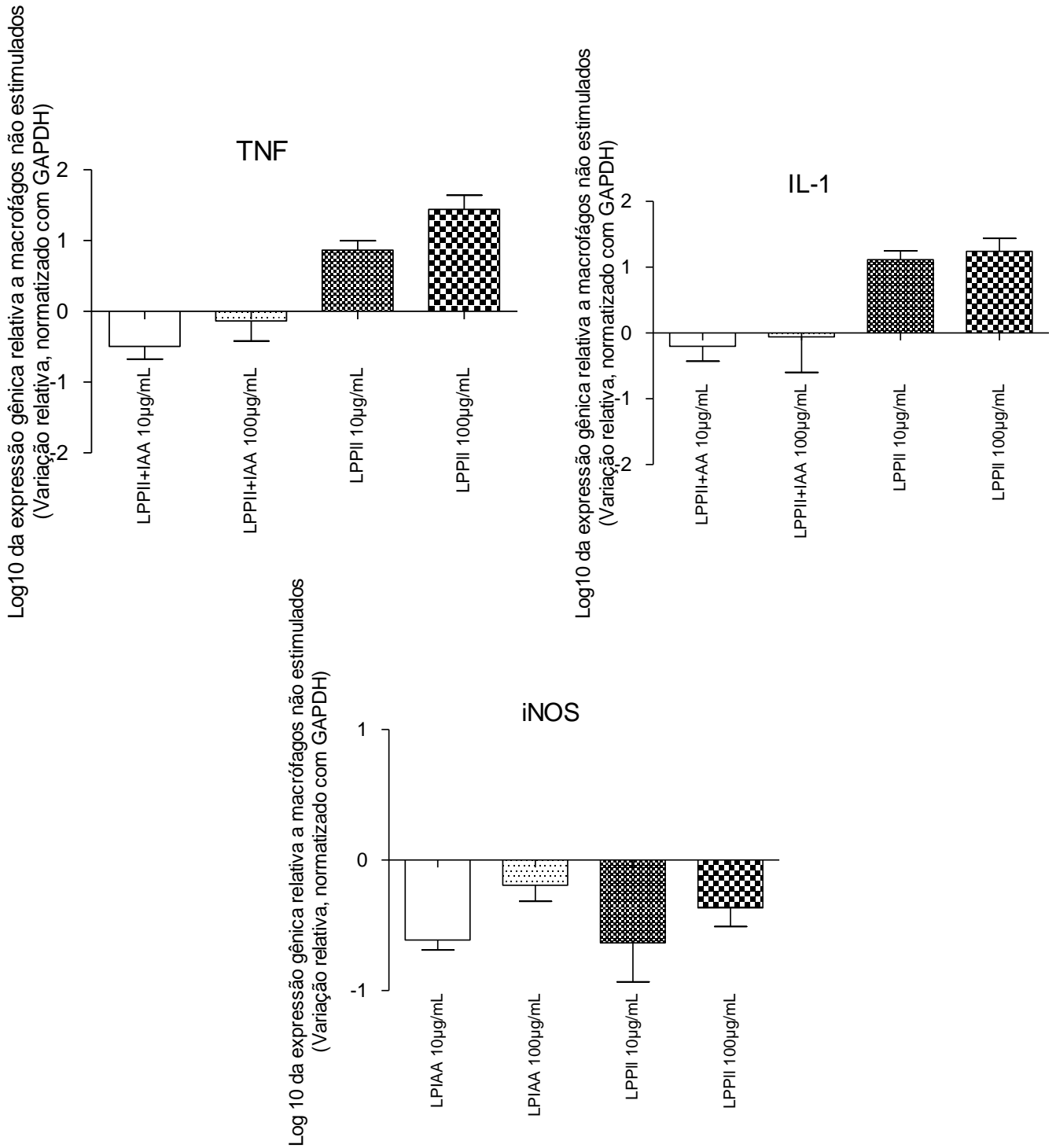


Figura 18 Expressão gênica das citocinas TNF, IL-1 e iNOS em culturas de macrófagos tratadas com as proteínas do látex de *C. procera*. As culturas foram estimuladas com as frações LPIII e LPIII+IAA. A extração do RNA total foi feita 4 horas após o tratamento. Como controle interno da reação de rt-pcr foi utilizada a expressão gênica de GAPDH.

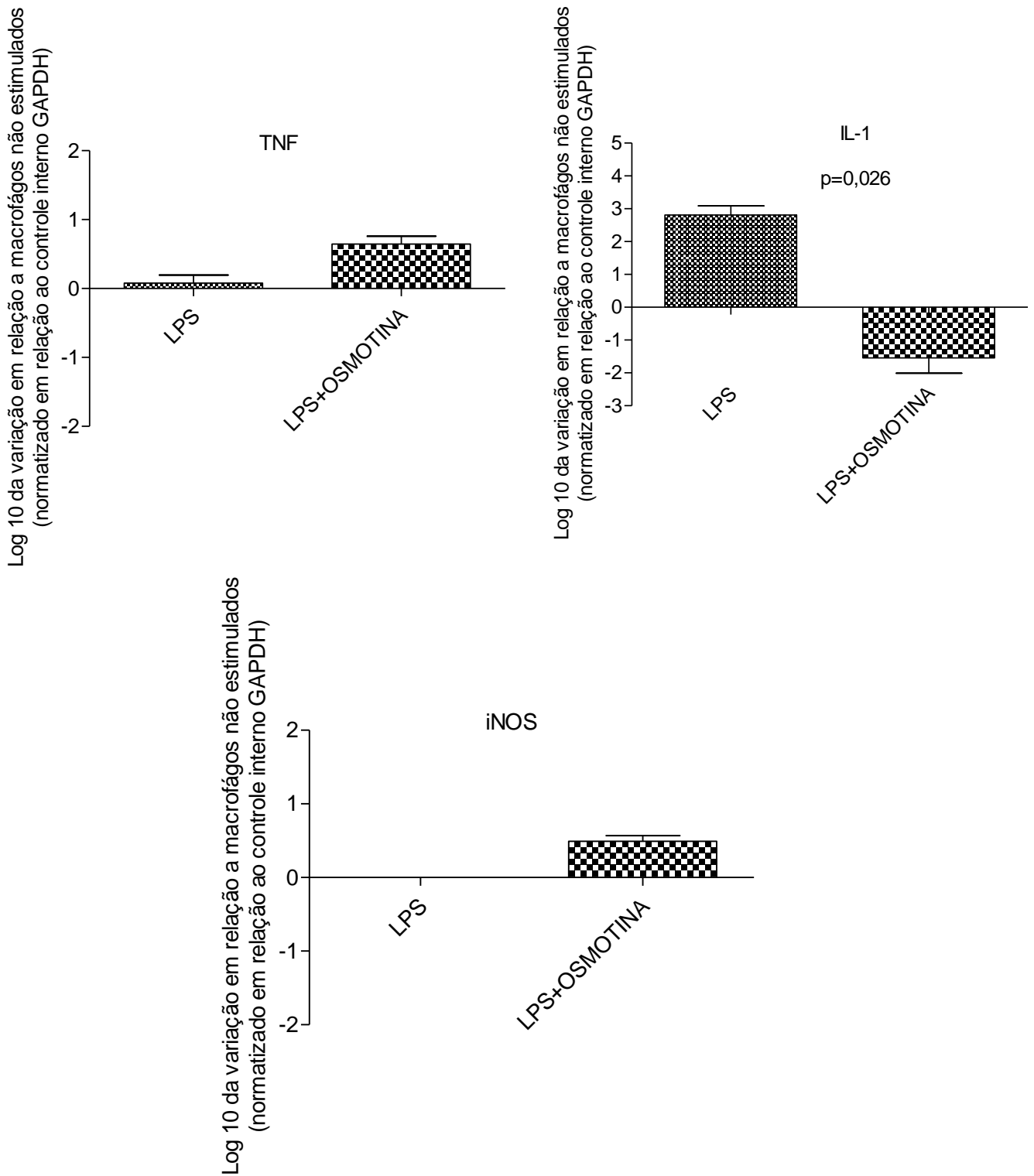


Figura 19 Expressão gênica das citocinas TNF, IL-1 e INOS em culturas de macrófagos estimuladas com LPS e tratadas com osmotina do látex de . A extração do RNA total foi feita 24 horas após o tratamento. Como controle interno da reação de rt-pcr foi utilizada a expressão gênica de GAPDH.

6. DISCUSSÃO

O investimento em identificação e caracterização de novas moléculas derivadas de plantas a serem empregadas na terapia de doenças inflamatórias e infecciosas é de grande importância para indústria farmacêutica e mostra-se crescente nos dias atuais. Particularmente, o látex de *Calotropis procera* tem sido investigado por nosso grupo de pesquisa considerando o conjunto de relatos na literatura de suas atividades biológicas, em especial, ações anti e pró-inflamatórias (KUMAR e ROY, 2007; RAMOS et al. 2009; NASCIMENTO et al. 2016).

Neste sentido, investigamos inicialmente a influência da fração proteica LP_{PII} em um modelo clássico de peritonite, sendo que neste caso, o estímulo inflamatório foi causado por *Salmonella* Typhimurium. Neste modelo, o tratamento com LP_{PII} foi administrado 30 minutos antes do desafio bacteriano. Os resultados demonstraram que a administração preventiva de LP_{PII} produziu relevante atividade anti-inflamatória, no entanto, tal atividade não foi associado a ação antimicrobiana direta de LP_{PII} contra a bactéria, uma vez que não inibiram o crescimento de *Salmonella in vitro*. O efeito anti-inflamatório também não foi associado ao estímulo do sistema fagocítico polimorfonuclear, uma vez que não houve maior clareamento de *Salmonella* nos principais órgãos afetados pela infecção em camundongos tratados com a fração LP_{PII}. Mesmo assim, podemos constatar que o tratamento preventivo com LP_{PII} não provocou nenhum prejuízo as taxas normais de eliminação de bactérias nos órgãos.

O processo inflamatório é uma resposta vital ao dano tecidual, infecção, trauma e outras ofensas ao organismo (HE et al. 2007). No entanto, a ausência de controle do processo inflamatório pode acarretar destruição do tecido e danos ao funcionamento de órgãos vitais. Tais complicações podem ser observadas nos casos de inflamação sistêmica, que podem culminar em choque séptico e levar o paciente a morte. Neste caso, faz-se o uso de anti-inflamatórios que, dentre outros efeitos, inibem a aderência e/ou migração de leucócitos através do endotélio durante o estado patológico (WAGNER e ROTH, 2000). No presente estudo, o tratamento prévio com a fração proteica LP_{PII} inibiu intensamente a migração de leucócitos para o sítio inflamatório, inclusive quando comparado aos

animais tratados com dexametasona. Ramos e colaboradores (2009) demonstraram, em um modelo de peritonite, que a redução do influxo leucocitário desencadeado por LP_{PII} aconteceu devido a inibição do rolamento e adesão dos leucócitos. Efeito semelhante foi observado durante o tratamento de um modelo de peritonite com bromelina (uma mistura natural de enzimas proteolíticas derivadas da haste do abacaxi), onde ficou claro que a redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi reflexo da inibição do processo de aderência (FITZHUGT et al. 2008). Diante disso, é possível que o efeito anti-inflamatório de LP_{PII} ocorra devido a inibição do rolamento e adesão de leucócitos, processos primordiais para a chegada de células de defesa ao foco inflamatório.

O látex de *C. procera* e, particularmente, a fração proteica LP_{PII} já foi reportado por sua riqueza em proteases cisteínicas (FREITAS et al. 2007, OLIVEIRA et al., 2007). Salas e colaboradores (2008) sugerem que alguns efeitos farmacológicos relacionados a proteases cisteínicas não ocorrem devido a atividade proteolítica destas enzimas, mas apenas a presença destas moléculas parece ser responsável pelo efeito imunológico observado. No entanto, neste estudo, a fração proteica LP_{PII} perdeu sua atividade anti-inflamatória quando tratada com iodoacetamida, um inibidor de proteases cisteínicas, sugerindo a necessidade de participação destas proteases na sua forma ativa para observação do efeito anti-inflamatório.

Ao penetrar no organismo do hospedeiro, as bactérias que sobrevivem ao ácido estomacal, migram para a lâmina própria. Neste local, ao serem fagocitadas, as bactérias estimulam células dendríticas e macrófagos para a produção de Interleucina 12 (IL-12) (RUBY et al., 2012). A IL-12 ativa células NK que, em contrapartida, produzem IFN- γ . Esta citocina ativa os macrófagos e induz o aumento da produção de compostos nitrosativos no interior dos fagócitos, o que leva à destruição da bactéria fagocitada (CHANDRASEKAR et al., 2013). A análise do perfil hematológico dos animais infectados revelou um aumento significativo no número de linfócitos no grupo tratado com LP_{PII} quando comparado aos grupos PBS e dexametasona, o que poderia ser benéfico no controle do processo infeccioso tendo em vista que estas células possivelmente são linfócitos NK. Estes dados são interessantes considerando a importância da

resposta de células naturais Killer no controle da infecção por *Salmonella*. Por outro lado, quando inativadas com IAA, as proteínas de LP_{PII} diminuíram significativamente o número de linfócitos quando comparado aos animais tratados com PBS. Estes dados mostram mais uma vez a influência decisiva de proteases cisteínicas no efeito demonstrado por LP_{PII}.

Anteriormente, a administração de proteínas do látex de *C. procera* protegeu camundongos contra *Salmonella*, por um mecanismo que envolve a regulação de citocinas pró-inflamatórias e liberação de óxido nítrico (LIMA-FILHO et al. 2010; OLIVEIRA et al. 2012). Neste estudo, foi investigado se a fração proteica LP_{PII} exercia alguma influência sobre a expressão gênica de citocinas refletindo assim no efeito anti-inflamatório observado. Realmente, tal efeito parece estar relacionado a regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias, tais como, TNF e IL-12 nos animais tratados com LP_{PII}. Estas citocinas aumentam a resistência do hospedeiro contra as infecções sistêmicas, mas altos níveis das mesmas podem ser correlacionados com o choque séptico (VAN DER POLL e SAUERWEIN, 1993; CASEY et al. 1993; GARDLUND et al, 1995). Além disso, sendo TNF um dos principais responsáveis pela indução da expressão de moléculas de adesão do processo de diapedese, a redução desta citocina pode está refletindo na redução da expressão de moléculas de adesão e conseqüentemente na diminuição da migração de leucócitos para o foco infeccioso. As alterações na expressão gênica destas citocinas poderiam afetar a produção de óxido nítrico (ON), que possui papel como bactericida no ambiente intracelular de macrófagos e também atua como anti-inflamatório, uma vez que reprime a expressão das moléculas de adesão de leucócitos quando em altas concentrações (ROSS E RESKE-KUNZ 2001; PACHER et al. 2007). Contudo, nossos resultados mostraram que o tratamento com as proteínas de *C. procera* não interferiu na expressão de iNOS, sugerindo que o efeito anti-inflamatório de LP_{PII} não está relacionado com alterações na produção de ON. A IL-10 também não demonstra ser decisiva no efeito anti-inflamatório observado.

Para avaliar se a anti-inflamação induzida por LP_{PII} poderia aumentar a sobrevivência de animais infectados por *Salmonella*, foi realizado um teste de sobrevivência com grupos controle e experimentais. Lima-Filho e colaboradores (2010) relatam que a fração LP impediu a morte de camundongos desafiados

com dose letal de *Salmonella*, quando administrada por via intraperitoneal 24 horas antes do desafio. Resultados semelhantes foram relatados quando camundongos desafiados com *Salmonella* foram pré-tratados com proteínas do látex de *Carica candamarcensis*, neste caso, houve um aumento da sobrevivência em até 60% quando comparado ao grupo controle (RALPH et al. 2014). Porém, neste trabalho foi observado que no modelo de tratamento preventivo, por via endovenosa, a administração de LP_{PII} ou LP_{PII}+IAA não aumentou a sobrevivência dos animais infectados. Os camundongos tratados morreram até o terceiro dia de infecção de forma semelhante ao grupo controle não tratado. Desta forma, é possível que a influência de proteínas laticíferas sobre a resposta imunológica seja capaz de variar de acordo com a via de inoculação, como já observado por outros autores (ALENCAR et al. 2006; NASCIMENTO et al. 2016).

Para avaliar a influência de LP_{PII} durante um processo de inflamação real e já estabelecido após infecção por *Salmonella* um modelo de tratamento curativo foi proposto. Neste caso, a administração da fração proteica foi realizada 24 e 28 horas após o desafio com *Salmonella*. Neste modelo, o tratamento com a fração proteica LP_{PII} também não foi capaz de aumentar a capacidade fagocítica nos animais tratados, uma vez que não foram observadas diferenças significativas no número de bactérias entre grupos controles e experimental.

A administração curativa de LP_{PII} reduziu significativamente a migração leucocitária para a cavidade peritoneal dos animais infectados, revelando mais uma vez seu potencial anti-inflamatório. Estes dados são bastante relevantes, tendo em vista a capacidade de LP_{PII} de diminuir a inflamação mesmo depois do processo infeccioso já estabelecido. Considerando que trabalhos anteriores demonstraram que LP_{PII} é rica em proteases cisteínicas (FREITAS et al. 2007, Oliveira et al., 2007), neste estudo tais proteases foram inativadas com iodoacetamida de forma a correlacionar o efeito anti-inflamatório observado com a presença de enzimas ativas. Os resultados deixaram claro que a ação anti-inflamatória de LP_{PII} é perdida após tratamento com IAA. Assim, apesar do mecanismo de ação anti-inflamatória envolvido não estar totalmente claro, estas proteases cisteínicas poderiam virtualmente degradar moléculas de adesão e afetar os processos de diapedese, diminuindo a presença de leucócitos no sítio infeccioso. Além disso, o tratamento curativo com LP_{PII} diminuiu a expressão

gênica de TNF, IL-12 e IFN- γ e como já mencionado, a inibição destes mediadores inflamatórios poderia estar diminuindo a expressão de moléculas de adesão, impedindo assim a migração de leucócitos para o sítio infeccioso. A administração de LP_{PII} após o início da infecção não foi capaz de aumentar a sobrevivência dos animais, apontando para o fato de que outros grupos de proteínas, particularmente, quitinases recentemente identificadas no látex de *C. procera* parecem exercer de forma exclusiva tal efeito protetor. Além disso, a via de inoculação também pode estar diretamente relacionada com estes resultados (OLIVEIRA et al. 2012; FREITAS et al., 2016).

Testes em culturas celulares de macrófagos e esplenócitos foram realizados para avaliar a citotoxicidade de LP_{PII}, bem como sua influência sobre a expressão gênica de citocinas em cultura de células. Além disso, experimentos preliminares foram feitos para analisar a influência de CpOsm na expressão gênica de citocinas.

Inicialmente, foram realizados testes de toxicidade em culturas de esplenócitos e pM \emptyset após estímulo com LP_{PII} e LP_{PII}+IAA. Os resultados sugeriram que as frações proteicas apresentaram ligeira toxicidade nas maiores concentrações testadas, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$. Desta forma, as concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$, consideradas não tóxicas por não diminuírem a viabilidade celular em menos de 95%, foram utilizadas para avaliar a influência de LP_{PII} sobre a expressão gênica de citocinas. Considerando o estímulo de esplenócitos e pM \emptyset com LP_{PII} e LP_{PII}+IAA por 4 horas, foi observado que LP_{PII} induziu aumento na expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1. Tais citocinas são geralmente liberadas por macrófagos em resposta à infecção e são essenciais para a ativação de outras células com consequente destruição do microrganismo, bem como da expressão de moléculas de adesão, potencializando o processo inflamatório (KAUFMANN, 1993; UNANUE, 1997; BENJAMIM, 2001). Por outro lado, a inativação das proteases de LP_{PII} com iodoacetamida inibiu o efeito pró-inflamatório observado na expressão destas citocinas, assim, as proteases cisteínicas de *C. procera* parecem ser responsáveis por induzir um aumento na expressão de TNF e IL-1. O estímulo com as proteínas de LP_{PII} induziu uma leve diminuição na expressão gênica de

iNOS tanto na cultura de esplenócitos quanto de macrófagos. No entanto, nos esplenócitos este efeito foi revertido com o tratamento de LP_{PII} com iodoacetamida. Em baixas concentrações, o ON é pró-inflamatório induzindo vasodilatação e o recrutamento de neutrófilos. Entretanto, em altas concentrações reprime a expressão das moléculas de adesão, suprime a ativação de leucócitos e induz a apoptose de células inflamatórias, atuando como anti-inflamatório (ROSS e RESKE-KUNZ 2001). Desta forma, apesar do aumento na expressão de TNF e IL-1, citocinas que estimulam a produção de ON, as proteases cisteínicas de LP_{PII} podem ter equilibrado a produção de ON, de maneira a corroborar o efeito pro-inflamatório demonstrado em cultura celular. Recentemente, Nascimento e colaboradores (2016) demonstraram que o estímulo de macrófagos com LP causou uma indução na expressão gênica de TNF e IL-1, não sendo efetiva em estimular INOs. In vivo, a administração de LP_{PII} por via endoveso também não apresentou nenhuma influência sobre a produção de óxido nítrico em animais com peritonite (RAMOS et al., 2009).

Recentemente, uma osmotina (CpOsm) abundante em resíduos de aminoácidos do tipo cisteína foi isolada a partir de LP_{PII} (FREITAS et al., 2011a). A osmotina é uma proteína vegetal com diversas funções na planta, e tem apresentado interessante atividade anti-inflamatória em alguns estudos (ARSENESCU et al., 2011; BRADSHAH et al., 2016). Desta forma, entende-se que a CpOsm pode também estar diretamente ligada ao efeito anti-inflamatório observado em LP_{PII}. Porém, nenhum estudo havia sido realizado anteriormente avaliando a ação imunológica de CpOsm. Diante disso, e considerando os resultados promissores de LP_{PII} como fração proteica anti-inflamatória, um modelo de inflamação em cultura de macrófagos peritoneais foi proposto para avaliar a influência de CpOsm sobre um processo inflamatório decorrente do estímulo com LPS.

As células foram expostas ao LPS por 2 horas e em seguida, o grupo experimental foi exposto por mais 24 horas a osmotina. Os dados revelaram que o grupo exposto a osmotina apresentou um leve aumento na expressão de TNF e iNOS, no entanto não houve diferenças significativas entre os grupos LPS e LPS+Osmotina, mostrando que o tratamento com a osmotina não foi elemento

decisivo para produção destes mediadores inflamatórios. A IL-1 β tem como principal fonte macrófagos estimuladas por TNF ou LPS bacteriano e é responsável por promover o recrutamento de leucócitos para o local de infecção (BENJAMIM, 2001) , por outro lado, o acúmulo de IL-1 na corrente sanguínea está correlacionados com o grau de severidade da infecção sistêmica e pode ter como principal consequência o choque séptico (JONES, 1996; Gardlund et al., 1995). O estímulo dos macrófagos com CpOsm diminuiu consideravelmente a expressão de IL-1 quando comparado ao grupo não tratado, este efeito pode ser benéfico durante o processo inflamatório tendo em vista que, em altas concentrações, esta citocina provoca febre no indivíduo, além de outra consequência grave já citada, o choque séptico (ABBAS et al., 2008). Li e colaboradores (1995) demonstraram que camundongos deficientes na produção de IL-1 são resistentes ao choque séptico. Diante disso, nota-se que a CpOsm pode ser detentora de interessantes propriedades imunomoduladoras, no entanto, estudos sequencias mais aprofundados devem ser realizados para elucidar tal efeito.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo foi demonstrado que a fração proteica LP_{PII}, do látex de *C. procer*, apresentou atividade anti-inflamatória no modelo murino de infecção por *Salmonella*. Tal efeito foi associado a redução da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e confirmado com a inibição da migração de leucócitos para o foco infeccioso. Os resultados também fornecem evidências de que a osmotina presente em LP_{PII} seja um componente essencial para a propriedade anti-inflamatória observada. Embora os mecanismos envolvidos neste efeito não estejam completamente elucidados, a fração proteica LP_{PII} mostrou ser uma boa fonte de biomoléculas com promissoras propriedades anti-inflamatórias.

Especificamente observamos que:

1. A fração proteica LP_{PII} não apresenta atividade anticabteriana contra, *S. Typhimurium*.
2. Durante os tratamentos preventivo e curativo, a quantificação de bactérias viáveis no baço, fígado, sangue e fluido peritoneal dos animais não apresentou diferença significativa entre os grupos controles e o grupo experimental tratado com LP_{PII}.
3. Os dois esquemas de tratamento com LP_{PII} foram capazes de reduzir intensamente o influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal dos animais infectados. Porém, tal efeito foi revertido com o tratamento de LP_{PII} com Iodoacetamida.
4. Após o tratamento com LP_{PII}, os animais infectados com *Salmonella* apresentaram uma diminuição na expressão gênica da citocina TNF, IL-12 e IFN- γ . Não foi observada produção de Inos, IL-6 e IL-1 .
5. O pré-tratamento ou o pós tratamento com as proteínas de *C. procera* não protegeu os animais contra infecção por *Salmonella*.
6. As frações protéicas apresentaram baixa toxicidade em culturas de macrófagos e esplenócitos.
7. O estímulo de culturas primárias de macrófagos e esplenócitos com LP_{PII} induziu um aumento significativo na expressão de IL-1 e TNF.
8. O tratamento da cultura de macrófago com osmotina após o estímulo com LPS reduziu significativamente a expressão gênica de IL-1 .

8. AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação cedeu uma bolsa de estudo de doutorado para Maria Taciana Ralph. Agradecemos também a Dr. Maria Helena Ribeiro pelo fornecimento dos animais utilizados no presente estudo.

9. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. et al. *Imunologia celular e molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2008. p. 341-345.

AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology and evolution plant defense against herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 40, p. 311-331, 2009.

AKDIS, M. Et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming, growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. **Fundamentals of allergy and immunology**, 2016.

ALDHEBIANI, A., Jury, S. Anatomical studies on the genus *Euphorbia* L. SaudiArabia (Subgenera: *Triucalli*, *Ermophyton*, *Esula* and *Chamaesyce*). **Int. Res. J.Plant Sci.** v. 6, p. 168–191, 2013.

ALENCAR, N. M. N. et al. Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in three different experimental models: peritonitis, paw edema and hemorrhagic cystitis. **Planta Med**, v. 70, p. 1144-1149, 2004.

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

ALI, A. et al. Antibacterial potential of *Calotropis procera* (flower) extract against various pathogens. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v. 27, N .5, 2014.

ALLER, M. A. et al. The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12, n. 10, p. 225 – 234, 2006.

AGRAWAL, A. A.; KONNOR, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology and evolution plant defense against herbivory. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 40, p. 311-331, 2009.

ARSENESCU, V. et al. Adiponectin and Plant-Derived Mammalian Adiponectin Homolog Exert a Protective Effect in Murine Colitis Digestive. **Diseases and Sciences**, v. 56, p. 2818, 2011.

ARYA, S.; KUMAR, V.L. Antiinflammatory Efficacy of Extracts of Latex of *Calotropis procera* Against Different Mediators of Inflammation. **Mediators of Inflammation**, Nova lorque, v.4, p. 228-232, 2005.

ARSENESCU, V. et al. Adiponectin and Plant-Derived Mammalian Adiponectin Homolog Exert a Protective Effect in Murine Colitis Digestive. **Diseases and Sciences**, v. 56, p.2818, 2011.

- BAUMLER, A .J. et al. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella* typhimurium. **Infection and Immunity**, v. 64, p.1862–65. 1996.
- BENJAMIM C. F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.34, p. 18-26, 2001.
- BENENSON, A. S. J.; CHIN, A.S. Control of Communicable Diseases Manual. **American Public Health Association**, Washington, DC. 1995.
- BIEDZKA-SAREK, M.; SKURNIK, M. How to outwit the enemy: dendritic cells face *Salmonella*. **APMIS**, v. 114, p. 589–600. 2006.
- BOROWSKY, L.M. et al. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodoform. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p.1474-1479, 2006.
- BADSHAH, H., Ali, T., KIM, M. O. Osmotin attenuates LPS-induced neuroinflammation and memory impairments via the TLR4/NFκB signaling pathway. **Scientific Reports – Nature**. v. 6, p. 24493- 2016.
- BILATE, A.M.B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. *Temas de reumatologia clínica*. v. 8, n. 2. p. 47-51. 2007.
- BITTAR, R. TARPLEY, J. Intestinal perforation in typhoid fever: a historical and state-of-the-art review. **Review of infectious Diseases**, v.7, n. 2, p. 257-271, 1985.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Brasília, 2016.
- BROZ, P.; OHLSON, M.B.; MONACK, D.M. Innate immune response to *Salmonella* Typhimurium, a model enteric pathogen. **Gut Microbes**. v. 3, n. 2, p. 62–70. 2012.
- BSAVA. Salmonellosis. BSAVA News Scientific Information Document. **J. Small Animal Pract.**, v. 38, p. 375-376, 1997.
- BUGAREL, M. et al. A multiplex real-time PCR assay targeting virulence and resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **BMC Microbiology**. v.11, n.151, p.1-11. 2011.
- BUTTLE, J. D. et al. Oral dosing with papaya latex is an effective anthelmintic treatment for sheep infected with *Haemonchus contortus*. **Parasites e Vectors**, v. 4, p. 1-11, 2011.

- BUAGAREL M., et al. A multiplex real-time PCR assay targeting virulence and resistance genes in *Salmonella* enterica serotype Typhimurium. **BMC Microbiology**, v.11, n.151, p. 1-11, 2011.
- CASELLI, C. Role of adiponectin system in insulin resistance. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 113, n. 3, p, 155-160, 2014
- CASEY, L.C. et al. Plasma cytokine and endotoxin levels correlates with survival in patients with the sepsis syndrome. **Ann Intern Med**, v. 119, p. 771-778, 1993
- CAVAILLON, J. M. et al. Cytokine cascade in sepsis. **Scand. J. Infect. Dis**, v.35, p.535–544, 2003.
- CLINARD, F. S. C. et al. Association between concomitant use of several systemic NSAIDs and as excess risk of adverse drug reaction. A case/non case study from the French Pharmacovigilance system database. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.60, n.4, p 279-83, 2004
- CHANDRASEKAR, B.; DEOBAGKAR-LELE, M.; VICTOR, E.S.; NANDI, D. Regulation of Chemokines, CCL3 and CCL4, by Interferon γ and Nitric Oxide Synthase 2 in Mouse Macrophages and During *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium Infection. *J Infect Dis*. v. 207, n.10, p.1556-1568. 2013.
- CHAUDHARY, P. et al. Protective Effect of High Molecular Weight Protein Subfraction of *Calotropis procera* Latex in Monoarthritic Rats. **Pharmacognosy Magazine**. V. 12, n. 2, p. 147–151, 2016.
- CHEN, H. M. et al. Nontyphoid *Salmonella* infection: Microbiology, clinical features, and antimicrobial Therapy. **Pediatrics and neonatology**, V. 54, P. 147-152, 2013
- CHOEDON, T. et al. Anticancer and cytotoxic properties of the *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 12, n.16, p. 2517-2522, 2006.
- COBURN, B et al. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, p. 112–118, 2007.
- COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. v. 420, p. 19-26. 2002.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Patologia Estrutural e Funcional*. 7^a ed. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan**, 2006.
- CRUMP J. A. et al. The global burden of typhoid fever. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 82, n. 5, p.346-353, 2004.

CRUMP, J. A. et al. Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive *Salmonella* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 4, 2015.

DHIAF, A.; ABDALLAH, F. B.; BAKHROUF, A. Resuscitation of 20-year starved *Salmonella* in 409 seawater and soil. **Annals of microbiology**, v. 60, p.157-60, 2010.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*. v.112, p.321–329. 1997.

DINARELLO, C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* v. 27, p. 519–550. 2009.

DUBEY, V.K., JAGANNADHAM, M.V. Procerain, a stable cysteine Protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, 62:1057–1071, 2003.

DUSSAULT, A. A., POULIOT, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. **Biol Proced Onlinel**, v. 8, p. 1-10, 2006.

FARREL, B. D.; DUSSOURD, D.E. & MITTER, C. Escalation of Plant Defense: Do Latex and Resin Canals Spur Plant Diversification? **The American Naturalist**, v. 138, n. 4, p. 881-900, 1991.

FANG, F. C.; FIERER. J. Human infection with *Salmonella dublin*. **Medicine (Baltimore)**, v. 70 p. 198–207, 1991

FEASEY, N.A. et al. Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. **Lancet**. v. 379, n. 9835, p. 2489-2499. 2012

FIGUEIREDO, I. S. T. et al. Efficacy of a membrane composed of polyvinyl alcohol as a vehicle for releasing of wound healing proteins belonging to latex of *Calotropis procera*. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 512–519, 2014.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. **Cellular Microbiology**, v. 9, p. 2562–2570, 2007

FRACASSO, J.F. Contribuição ao entendimento da patogenia da sepse. *Revista de Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada*, v. 29, n.2, p. 119-127, 2008.

FRANCHI, L. Role of inflammasomes in *Salmonella* infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 2 Article 8 . Pag: 1-6. 2011

FREITAS, C.D.T. et al. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**; 45:781-789, 2007

FREITAS, C. D .T. et al. Anti-oxidative and proteolytic activities and protein profile of laticifer cells of *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra* and *Euphorbia tirucalli*. **Brazilian Society of Plant Physiology**, v. 22, n.1, p. 11-22, 2010.

FREITAS, C.D.T. et al. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: Biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 7, p. 738-743, 2011a.

FREITAS, C.D.T. et al. Osmotin from *Calotropis procera* latex: New insights into structure and antifungal properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 10, p. 2501-2507, 2011.

FREITAS, A. P. F. et al. Protein fraction of *Calotropis procera* latex protects against 5-fluorouracil-induced oral mucositis associated with downregulation of pivotal pro-inflammatory mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, 2012.

FITZHUGH, D. J. et al. Bromelin treatment decreases neutrophil migration to sites of inflammation. **Clinical Immunology**, v. 128, p. 66-74, 2008

GARDLUND, B. et al. Plasma levels of cytokines in primary septic shock in humans: correlation with disease severity. **J Infect Dis**, v. 172, p.296-301, 1995

GAUGHRAN, E. R. L. Ficin: History and present status. **Quarterly Journal of Crude Drug Research**, v. 14, p. 1-21, 1976.

GORDON, M.A. et al.; Epidemics of invasive *Salmonella* enterica serovar Enteritidis and *S. enterica* serovar Typhimurium infection associated with multidrug resistance among adults and children in malawi. **Clin. Infect. Dis.** v. 46, p. 963-969. 2008.

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

HAGEL, J. M. et al. Got milk: The secret life of laticifers. **Trends in Plant Science**, v. 13, n.12, p.631-639, 2008.

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

HE, M. et al. Chemokines in acute inflammation: regulation, function and therapeutic strategies. **International Journal of Integrative Biology**, v.1, n.1, p. 18-27, 2007

- HIBBS JR., J. B. et al. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 157, p. 87- 94, 1988.
- HURST, S.M. et al. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment. **Immunity**; v. 14, p.705–714, 2001
- IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat Immunol**.v. 5, p. 987–995, 2004
- JONG, H.K.et al. Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis. **PLoS Pathog**. v. 8, n. 10, e1002933. 2012.
- JORENS, P. G.; MATTHYS, K. E.; BULT, H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. **Mediators of Inflammation**. V. 4, n. 2, p. 75–89, 1995
- KATSUKI, S. A. et al. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. **Journal of Cyclic Nucleotide Research**. v. 3, p. 23-5, 1977.
- KHAN, A. Plant Anatomy and Physiology. **Gyan Publishing House**. 2001
- KIECHLE, F.L.; MARLINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology and detection. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 100, p. 567- 75, 1993.
- KONEMAN, E.W. et al. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. Rio de Janeiro: MEDSI, 2008.
- KNOOP, K. A. et al. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. **Journal of Immunology**, v.183, p. 5738–5747.
- KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**; 72:1510–1530, 2011.
- KONNO, K. et al. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **The plant journal**. v. 37, n. 3, p. 370-378, 2004
- KUMAR, V.L., ROY,S. *Calotropis procera* latex extract affords protection against inflammation and oxidative stress in Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis in rats. **Mediators of inflammation**, p. 47523-47529, 2007.
- KUMAR, V. L. et al. Proteins Derived From in Vitro Culture of the Callus and Roots of *Calotropis procera* Ameliorate Acute Inflammation in the Rat Paw. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 175, n. 3, p. 1724-1731, 2014

- KUTA, F.A. Antifungal effect of *Calotropis procera* stem bark on Epidermophyton floccosum and Trichophyton gypseum. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n.13, p. 2116-2118, jul, 2008.
- LI, P et al. Mice deficient in IL- 2beta-converting enzyme are deficient in production of mature IL-1beta and resistant to endotoxic shock. **Cell**, v. 80, p. 401- 411, 1995
- LIMA, A.B. et al. Estudos preliminares da *Calotropis procera* S. W. na dieta de ovinos. **Agropecuária Científica no Semi-árido**, N. 1 p. 15-24, 2005
- LIMA-FILHO, J. V. M. et al. Effect of the Escherichia coli EMO strain on experimental infection by *Salmonella* enterica serovar Typhimurium in gnotobiotic mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n.7, p.1005-1013, 2004.
- LIMA-FILHO, J. V. et al. Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella* entérica serovar Typhimurium. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 327-334, 2010.
- LOPES, K. L. B. et al. Articulated laticifers in the vegetative organs of Mandevilla atroviolacea (Apocynaceae, Apocynoideae). **Botany**, v. 87, p. 202–209, 2009.
- LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil – terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3. ed. São Paulo Nova Odessa: **Plantarum**, 608 p. 2000.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: **Instituto Planatarum**; 512 p. 2002.
- MADIĆ, J. et al. An outbreak of abortion in mares associated with *Salmonella* abortusequi infection. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 3, p. 230-3. 1997.
- MAJOWICZ, S. E. et al. The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastroenteritis. *Clin Infect Dis*, v. 50, n.6, 2010.
- MAUSETH, J.D. Plant Anatomy. Benjamin/Cummings Publishing Company,U.S.A. 1988.
- MEAD, P. S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Dis**, v. 5, p. 607–625, 1999
- MEGID, J. et al. Salmonelose em cães de experimentação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 38, n. 1, p. 4445, 2001.
- MELLO, M.M. et al. Estudo fitoquímico da *Calotropis procera* Ait., sua utilização na alimentação de caprinos: efeitos clínicos e bioquímicos séricos. **Revista Brasileira de Saúde Prod**, V.2, n.1, p.15-20, Bahia, 2001.

- METCALFE, C.R. Distribution of latex in the plant kingdom. **Economic Botany**, v. 21, p. 115-127, 1967
- MIELE, M., COSTANTINI, S., COLONNA, G. Structural and functional similarities between osmotin from *Nicotiana tabacum* seeds and human adiponectin. **PLoS One**, v. 6, 2011.
- MOUSTAFA, M. F. M. et al. In vitro antifungal activity of Argemone ochroleuca Sweet latex against some pathogenic fungi. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 10, p. 1132-1137, 2013
- NASCIMENTO, D. C. O. et al., Latex protein extracts from *Calotropis procera* with immunomodulatory properties protect against experimental infections with *Listeria monocytogenes*. **Phytomedicine**, v. 23, n. 7, 2016
- NARASIMHAN, M. L. et al. Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of a mammalian adiponectin receptor. **Mol. Cell**, v. 17, p. 171–80, 2005
- OLIVEIRA, J. S. et al. In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait) R. Br. **Toxicology in vitro**, v. 21, p. 1563-1573, 2007.
- OLIVEIRA, R. S. B. et al. Inflammation induced by phytomodulatory proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against *Salmonella* infection in a murine model of typhoid fever. **Inflammation Research**, v. 61, n. 7, p. 689–98, 2012
- OHL, M. E.; MILLER, S. I. *Salmonella*: A Model for Bacterial Pathogenesis. **Annual Review of Medicine**, v. 52, p. 259–74. 2001
- PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev**, v. 87, n. 1, p. 315 – 424, 2007
- PADHY, B. M. et al. Inhibition of *Calotropis procera* latex-induced inflammatory hyperalgesia by oxytocin and melatonin. **Mediators of inflammation**, v. 6, p. 360-365, 2005.
- PAVLOV, V. A., et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. **Mol Med**, v. 8, p.125–134, 2003
- PERELLÓ, M. et al. Proteolytic enzymes from latex of *Ficus pumila* L. (Moraceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 19, n. 1, p. 257-262, 2000.
- POLL, T.V.D.; OPAL, S.M. Host-pathogen interactions in sepsis. **The Lancet Infectious Diseases**, 8: 32-43, 2008

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

RALPH, M. T. Peptidases from Latex of *Carica candamarcensis* Upregulate COX-2 and IL-1 mRNA Transcripts against *Salmonella* enterica ser. Typhimurium-Mediated Inflammation. **Mediators of Inflammation**, p. 1-8, 2014.

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

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

RAMOS, M. V. et al. Potential of laticifer fluids for inhibiting *Aedes aegypti* larval development: evidence for the involvement of proteolytic activity. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 805-812, 2009b.

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

RAZAK, A., BAHRI, S.B. Development and Distribution of Laticifers in Plants, PhD theses. Durham University. 2000

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

ROEDIGER, B. et al. IL-2 is a critical regulator of group 2 innate lymphoid cell function during pulmonary inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 136, p. 1653-1663, 2015.

ROSS, R.; RESKE-KUNZ, A. B. The role of nitric oxide in contact hypersensitivity. **International Immunopharmacology**; 1:1469–1478, 2001

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

SALAS C. E. et al. Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity. **Phytochemistry**, v. 69, n. 12, p. 2263-2269, 2008.

SANGRAULA, H. et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of latex of *Calotropis procera* in different models of inflammation. **Inflammopharmacology**, v. 9, p. 257-264, 2001.

SANTOS, R.L. et al. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. **Microbes**. Infect. v. 3, p. 1335–1344. 2001.

SAPHRA, I.; WASSERMANN, M. *Salmonella cholerae* suis. A clinical and epidemiological evaluation of 329 infections identified between 1940 and 1954 in the New York Salmonella Center. **Am. J. Med. Sci.** v. 228, p. 525–533, 1954.

SCHOTTE, U. et al. *Salmonella* Montevideo outbreak in military kennel dogs caused by contaminated commercial feed, which was only recognized through monitoring. **Veterinary Microbiology**, v. 119, p. 316–323, 2007.

SEHGAL, R. et al. Inhibitory effect of extracts of latex of *Calotropis procera* against *Candida albicans*: A preliminary study. **Indian Journal of pharmacology**, v. 37, n. 5, p. 334-335, 2005.

SETTY, S. R. et al. Hepatoprotective activity of *Calotropis procera* flowers against paracetamol induced hepatic injury in rats. **Fitoterapia**, v. 78, p. 451-454, 2007.

SHIVKAR, Y.M.; KUMAR, V.L. Histamine mediates the pro-inflammatory effect of latex of *Calotropis procera* in rats. **Mediators of Inflammation**, v.12, n.5, p.299-302, 2003.

SIGAUQUE, B. et al. Community-acquired bacteremia among children admitted to a rural hospital in mozambique. **Pediatr. Infect. Dis. J.** v. 28, n. 2, p.108-113. 2009

SINGH, H. et al. Inflammation induced by latex of *Calotropis procera* – a new model to evaluate anti-inflammatory drugs. **Jornal of Pharmacological Toxicological Methods**, v. 43, p. 219-224, 2000.

SINGH, A.N. et al. Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to procerain. **Process Biochemistry**, 45: 399–406, 2010.

SOARES, P.M. et al. Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Londres, v. 99, p.125–129, mai, 2005.

SOUZA, G.E.P., FERREIRA, S.H. Blockade by anti-macrophages serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agente and Actions**, v.17, p. 97-103, 1985.

SOUZA, D. P. Caracterização molecular e correlações estruturais com adiponectina humana de uma proteína purificada do látex de *Cryptostegia grandiflora* R. Br. Tese. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará, 2014.

- SU, L.H. et al., Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. **Clin Infect Dis**, v.39, p. 546-51, 2004
- SZCZEKLIK, A. and STEVENSON, D. D. Aspirin-induced asthma: Advances in pathogenesis, diagnosis, and management. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.111, p.913-21, 2003
- TAUXE, R. V. *Salmonella*: A postmodern pathogen. **Journal of Food Protection**, v.54, p. 563–568. 1991
- The Plant List. A working list of all plants species. Disponivel em: <http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-2693668>. Acesso em: 24 de fev. de 2017.
- TITHERADGE, M. A. Nitric oxide in septic shock. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1411, p. 437-55. 1999.
- TORTORA, G .J. et al. Microbiologia, 10^a Ed. Porto Alegre. **Artmed**, 934 p. 2012.
- TRACEY K. J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. **J Clin Invest.**, v. 117, p.289–296, 2007
- UNANUE, E.R. Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and T-cell response. *Immunological reviews*, 158:11-25, 1997
- VAN DER POLL, T.; OPAL, S.M. Host-pathogen interactions in sepsis. **Lancet Infect Dis**. v. 8, p. 32–43. 2008
- VAN-DER-VELDEN, A. W. M. et al. *Salmonella* Rapidly Kill Dendritic Cells via a Caspase-1-Dependent Mechanism. **The Journal of Immunology**, v.22, p. 67426749, 2003.
- WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**, v.52, p. 349- 374, 2000
- WALKER, J.A.; BARLOW, J.L.; MCKENZIE, N.J. Innate lymphoid cells — how did we miss them? **Nat. Rev. Immunol.**, v. 13, n. 2, p. 75-87. 2013.
- WASANO, N.; KONNO, K. A unique latex protein, MLX56, defends mulberry trees from insects. **Phytochemistry**, v. 70, p. 880-88, 2009.
- YADAV, S. K.; NAGORI, B. P.; DESAI, P. K. Pharmacological characterization of different fractions of *Calotropis procera* (*Asclepiadaceae*) in streptozotocin induced experimental model of diabetic neuropathy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, n.2, p. 349-357, 2014.

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