



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

BRANDON FERRAZ E SOUSA

**EFEITO MODULADOR DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* NO
PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO EM ANIMAIS INFECTADOS COM
*Salmonella***

FORTALEZA
2020

BRANDON FERRAZ E SOUSA

EFEITO MODULADOR DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* NO
PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO EM ANIMAIS INFECTADOS COM
Salmonella

Dissertação apresentada a Coordenação
do Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica do Centro de Ciências da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S696e Sousa, Brandon Ferraz e.

Efeito modulador de proteínas do látex de *Calotropis procera* no processo inflamatório agudo em animais infectados com *Salmonella* / Brandon Ferraz e Sousa. – 2020.

55 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.

Coorientação: Prof. Dr. Ayrles Fernanda Brandão da Silva.

1. Citocinas. 2. Coagulação. 3. Hemostasia. 4. Óxido Nítrico. 5. Peritônio. I. Título.

CDD 572

BRANDON FERRAZ E SOUSA

EFEITO MODULADOR DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* NO
PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO EM ANIMAIS INFECTADOS COM
Salmonella

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ariclecio Cunha de Oliveira
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profa. Dra. Carolina de Araújo Viana
Centro Universitário UniFanor

Dra. Ayrles Fernanda Brandão da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Gerlane e Gerval.

As minhas tias, Sheila e Adriana.

A minha irmã, Deborah.

A mim

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo financiamento e manutenção da bolsa de mestrado.

Ao meu orientador, Dr. Márcio Ramos, por ter me aceitado, viabilizado e facilitado essa pesquisa.

Ao Dr. Pietro Mastroeni da Universidade de Cambridge, por ceder gentilmente a cepa bacteriana usada nesse estudo.

À Dra. Denise Oliveira, que aceitou fazer a análise histopatológica de tantos órgãos!

À minha coorientadora Dra. Ayrles Silva, pela enorme paciência e dedicação, em me orientar e auxiliar na execução dos experimentos. Nenhum agradecimento é suficiente.

Aos colegas de laboratório, que apesar de fazerem muito bagunça, auxiliaram com críticas, sugestões além de outros ensinamentos.

Aos meus familiares e círculo mais íntimo de amigos, apesar de que não há necessidade de reconhecer a ajuda de vocês aqui, pois agradeço diariamente.

O caminho trilhado até chegar aqui não foi fácil. Há quem diga que por nunca ser fácil, não há mérito nesta conquista, mas eu sabendo o quanto me esforcei para finalizar essa pesquisa, eu sei que tenho o mérito desta conquista.

Na verdade, pouco eu tenho a agradecer pela conclusão do meu Mestrado, porque agradecer significa retribuir, manifestar gratidão, e pouca gratidão foi me dada durante esse período para que eu possa retribuí-lo, com exceção dos que foram citados.

Costumo dizer para meus amigos mais próximos que não recomendo a experiência do meu mestrado para ninguém. Desde o começo os obstáculos impostos e cobranças fizeram eu duvidar da minha capacidade.

O medo de errar se desenvolveu em mim, me causou pânico, mudou meu estilo de vida e manchou esse período para mim.

Enfim, essa seção para mim seria mais de Reconhecimentos do que de Agradecimentos.

RESUMO

Calotropis procera é uma planta cujas partes têm sido utilizadas na medicina alternativa, no auxílio ao tratamento de diversas patologias, tais como: dores em articulações, asma, malária, eczema, lepra, sangramentos bucais, queimaduras na pele e quadros de inflamação. O processo de diálise e centrifugação do látex de *C. procera* resulta em frações proteicas com efeitos diferenciados sob a imunidade celular. A fração proteica (LP) e suas subfrações (LP_{PI}, LP_{PII} e LP_{PIII}), administradas por diferentes vias em modelos animais, geram efeitos diferentes sobre o organismo. Tendo isso em vista, o presente trabalho visa avaliar a capacidade moduladora das frações proteicas LP_{PII} e LP_{PIII} do látex de *Calotropis procera* em um modelo de inflamação induzida pela infecção letal de *Salmonella* Typhimurium. A fração proteica do látex (LP) obtida foi fracionada por cromatografia de troca iônica para a obtenção de três frações: LP_{PI}, LP_{PII} e LP_{PIII}. Camundongos receberam LP_{PII} e LP_{PIII} (5 e 10 mg/kg), por via intraperitoneal, e em seguida foram desafiados com *S. Typhimurium* em injeções letais (10⁶ U.F.C./ mL). Todos os tratamentos protegeram os animais em diferentes níveis, mas a dose de 5 mg/kg induziu o maior percentual de sobrevivência e, conseqüentemente, foi utilizada para avaliação dos seguintes parâmetros: 1- contagem bacteriana no sangue, fluido peritoneal, baço e fígado dos animais; 2- análise histopatológica; 3- contagem total e diferencial de leucócitos no sangue e fluido peritoneal; 4- efeito sobre a coagulação plasmática; 5- modulação dos níveis de citocinas e óxido nítrico. A fração LP_{PIII} (5 mg/kg) foi capaz de proteger 70 % dos animais contra a infecção letal. Esse efeito protetor foi devido ao controle da inflamação decorrente da infecção, através da modulação da liberação de IL-1 β , IL-10 e NO, instaurando um estímulo inflamatório prévio à infecção, constituído principalmente pelo aumento no infiltrado neutrofílico. Observou-se também a manutenção da hemostasia das vias de coagulação durante o processo infeccioso severo. Esses resultados demonstram o potencial biotecnológico presente no látex de *Calotropis procera*, corroborando e expandindo os conhecimentos sobre o mecanismo de proteção de LP contra infecção por *Salmonella* Typhimurium.

Palavras-chave: Citocinas. Coagulação. Hemostasia. Óxido nítrico. Peritônio.

ABSTRACT

Calotropis procera is a plant whose parts have been used in alternative medicine, aiding in treatment of various pathologies, such as: joint pain, asthma, malaria, eczema, leprosy, bleeding, skin burns and inflammation. The process of dialysis and centrifugation of the latex of *C. procera* results in protein fractions with differentiated effects over the cell immunity. The protein fraction LP and its subfractions (LP_{PI}, LP_{PII} and LP_{PIII}), administered by different routes in animal models, induce different effects over cell mediated immunity in the organism. The current study aimed to evaluate the modulatory capacity of protein fractions LP_{PII} and LP_{PIII} from *Calotropis procera* latex in a model of inflammation induced by lethal infection by *Salmonella* Typhimurium. The latex protein fraction (LP) obtained was fractionated by ion-exchange chromatography to obtain three fractions: LP_{PI}, LP_{PII} and LP_{PIII}. Swiss mice were treated with LP_{PII} and LP_{PIII} (5 and 10 mg/kg), by intraperitoneal route, and then were challenged with *S. Typhimurium* in lethal injections (10⁶ UFC/ml). All treatments protected the animals in different degrees, but LP_{PIII} the dose of 5 mg/kg exhibited a bigger survival rate and, consequently, were used to evaluate the following parameters: 1- bacterial enumeration in blood, peritoneal fluid, spleen and liver; 2- histopathological analysis; 3- total and differential count of leukocytes in peripheral blood and peritoneal cavity; 4- effect over the total plasma coagulation; 5- modulation of cytokines and nitric oxide. The fraction LP_{PIII} (5 mg/kg) was capable of protection 70 % of animals against lethal infection. This protective effect was due to the control of the onset inflammation, through modulation of IL-1 β , IL-10 and NO release, inducing an inflammatory stimulus prior to the infection, mainly by increasing the neutrophilic infiltration in the infection locus. It was also observed the maintenance of hemostasis of the coagulation pathways. These results demonstrate the biotechnological potential present in the latex of *Calotropis procera*, it also corroborates and expands upon the knowledge regarding the mechanism of protection against *Salmonella* Typhimurium infection reported for LP.

Keywords: Cytokines. Coagulation. Hemostasis. Nitric oxide. Peritoneal cavity.

FIGURE LIST

Figure 1	– <i>Calotropis procera</i> in field before latex collection	14
Figure 2	– The immune response.....	17
Figure 3	– Chromatography and SDS-PAGE of <i>C. procera</i> LP and its fractions .	29
Figure 4	– Gelatin zymogram of LP and its fractions with and without IAA	30
Figure 5	– Survival of animals treated with LP fraction against infection.....	31
Figure 6	– Leukocyte counts of animals treated with LP fractions.....	32
Figure 7	– Neutrophil counts of animals treated with LP fractions.....	33
Figure 8	– Leukocyte enumeration in animals treated with LP _{P111} and submitted to infection challenge.....	34
Figure 9	– Neutrophil numbers in animals treated with LP _{P111} and submitted to infection challenge.....	35
Figure 10	– Bacterial enumeration in fluid and organs of treated and infected..... animals.....	36
Figure 11	– Histological analysis of liver	38
Figure 12	– Histological analysis of spleen	39
Figure 13	– Histological analysis of kindey.....	40
Figure 14	– Cytokines dosages.....	42
Figure 15	– Nitric oxide measurement.....	43
Figure 16	– Coagulation time assays: total, PT and aPTT	45

TABLE LIST

Table 1	– Examples of drugs developed from natural products	12
Table 2	– Specific azocaseinolytic activity of LP and is fractions	30
Table 3	– Hematological profile of healthy and infected mice treated with LP _{P111}	46

SUMMARY

1	INTRODUCTION	12
1.1	Natural products and biotechnological agents	12
1.2	Latex and laticifer proteins	13
1.3	<i>Calotropis procera</i>	13
1.4	<i>Calotropis procera</i> laticifer proteins	14
1.5	The immune response	15
1.6	Pathogenesis of <i>Salmonella</i> Typhimurium infection	16
1.7	<i>C. procera</i> LP against <i>Salmonella</i> infection	19
2	OBJECTIVES	21
2.1	General Objectives	21
2.2	Specific Objectives	21
3	MATERIALS AND METHODS	22
3.1	Latex extraction and processing	22
3.2	Chromatography fractionation	22
3.3	Protein profile analysis by SDS-PAGE	23
3.4	Dosage of soluble protein concentration	23
3.5	Azocaseinolytic activity assay	23
3.6	Gelatin zymography	24
3.7	Microorganisms	24
3.8	Ethics and animals	24
3.9	Survival evaluation	25
3.10	Experimental design	25
3.11	Bacterial enumeration	26
3.12	Influence of protein fractions on neutrophil infiltration into peritoneal cavity	26
3.13	Histological analysis	26
3.14	Measuring cytokines in plasma and peritoneal fluid	27
3.15	Measuring of nitric oxide in plasma and peritoneal fluid	27
3.16	Plasma coagulation time	27
3.17	Hematological analysis	28
3.18	Statistical analysis	28
4	RESULTS	29

4.1	Latex collection, processing, fractionation and proteolytic assays.....	29
4.2	Survival evaluation and immunological assessments of LP _{P_{II}} and LP _{P_{III}} inoculums.....	31
4.3	Effect of treatment with LP _{P_{III}} over cell immunity and in face of bacte- rial infection	33
4.4	Histopathology of liver, spleen and kidney	37
4.4.1	<i>Liver pathologies</i>	37
4.4.2	<i>Spleen pathologies</i>	37
4.4.3	<i>Kidney pathologies</i>	37
4.4.4	<i>Histopathological report</i>	38
4.5	Measurement of cytokines levels	41
4.6	Nitric oxide dosage.....	43
4.7	Plasma coagulation assays	44
4.8	Hematological profile	46
5	DISCUSSION	47
6	CONCLUSION.....	51
	REFERENCES	52