



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

LEANDRO WAGNER FIGUEIRA

**EFEITO DO EXTRATO DE *Curcuma longa* L. SOBRE INFECÇÕES
in vitro POR *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* E
Candida albicans EM MACRÓFAGOS MURINOS (RAW 264.7)**

2017

LEANDRO WAGNER FIGUEIRA

**EFEITO DO EXTRATO DE *Curcuma longa* L. SOBRE INFECÇÕES
in vitro POR *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* E
Candida albicans EM MACRÓFAGOS MURINOS (RAW 264.7)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira
Coorientador: Prof. Dr. Jonatas Rafael de Oliveira

São José dos Campos

2017

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2017]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Figueira, Leandro Wagner

Efeito do extrato de Curcuma longa L. sobre infecções in vitro por Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa e Candida albicans em macrófagos murinos (RAW 264.7) / Leandro Wagner Figueira. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.

46 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2017.

Orientador: Luciane Dias de Oliveira

Coorientador: Jonatas Rafael de Oliveira

1. Curcuma longa. 2. RAW (2647). 3. Staphylococcus aureus. 4. Pseudomonas aeruginosa. 5. Candida albicans. I. Oliveira, Luciane Dias de , orient. II. Oliveira, Jonatas Rafael de , coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Claudemir de Carvalho

Fundação Universitária Vida Cristã (FUNVIC)

Faculdade de Pindamonhangaba

Campus Dutra

Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 19 de dezembro de 2017.

DEDICATÓRIA

Primeiramente a DEUS e minha mãezinha NOSSA SENHORA APARECIDA, tudo foi feito para honra e GLÓRIA dos SENHORES.

A todos que se envolveram comigo na busca por esse sonho, por esse objetivo de vida que me torna cada dia mais vivo, mais humano.

A minha mãe Aparecida de Lourdez e ao meu pai Walter Donizette, cada um com sua contribuição, sem vocês nada disso seria possível.

A minha esposa Ana Paula por ter sonhado comigo, me ajudado a manter meus pés no chão, por ter chorado comigo, me apoiado, sem dúvidas nada disso seria possível sem você existir na minha vida meu AMOR.

Aos meus amigos, que me apoiaram e vibraram com cada etapa cumprida.

Ao meu amigo e Professor Jonatas Rafael de Oliveira, que contribuiu abundantemente na minha formação, não apenas profissional, porém para me tornar um ser humano melhor a cada dia de convívio. Muito obrigado por me carregar no colo quando precisei e me mostrar o caminho.

A minha Professora e orientadora, Luciane Dias de Oliveira, que teve uma enorme participação na minha formação profissional me dando liberdade e confiança para executar meu projeto.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS e NOSSA SENHORA APARECIDA.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Adj. Estevao Tomomitsu Kimpara e da vice-diretora Profa. Adj. Rebeca Di Nicoló.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira e do vice-coordenador Prof. Dr. Mauro Pedrine Santamaria.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

Aos discentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

À equipe da Secretaria do Programa de Pós-graduação por todas as vezes que me ajudaram. Bruno, Ivan e Sandra, muito obrigado por tudo.

“Algo só é impossível até que alguém duvide e resolva provar o contrário. A maioria de nós prefere olhar para fora e não para dentro de si mesmo”. Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	12
2.1 Objetivo específico.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Extrato Vegetal	13
3.2 Micro-organismos	13
3.3 Teste de micro diluição em caldo	13
3.4 Cultivo dos macrófagos.....	14
3.5 Modelo de Infecção <i>in vitro</i>	14
3.6 Ensaio de viabilidade dos macrófagos durante as infecções	16
3.7 Produção de citocinas pelos macrófagos durante as infecções	16
3.8 Geração de NO durante as infecções	17
3.9 Análise da fagocitose por coloração de Giemsa	17
3.10 Análise da fagocitose por microscópio eletrônico de varredura (MEV) ..	19
3.11 Análise estatística	21
4 RESULTADOS.....	22
4.1 Efeito antimicrobiano do extrato de <i>C. longa</i> L.	22
4.2 Fagocitose dos micro-organismos	22
4.3 Viabilidade celular dos macrófagos.....	24
4.4 Quantificação de citocinas	26
4.5 Geração de NO.....	30
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS.....	39

Figueira LW. Efeito do extrato de *Curcuma longa* L. sobre infecções *in vitro* por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* em macrófagos murinos (RAW 264.7) [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

RESUMO

Os seres humanos vivem em constante relação com micro-organismos, comensais e patogênicos, que podem ameaçar a homeostase do hospedeiro. Espécies patogênicas apresentam mecanismos capazes de contornar as barreiras de defesa do hospedeiro, facilitando sua disseminação e proliferação nos tecidos invadidos. Cepas resistentes aos antimicrobianos disponíveis surgem diariamente, por isso, é relevante encontrar métodos alternativos para controlá-las. Produtos de plantas medicinais vem sendo investigados para essa finalidade. No presente estudo, foi avaliada a capacidade do extrato de *C. longa* em controlar infecções *in vitro* por *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* em macrófagos murinos (RAW 264.7). Para isto, foram aplicadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) do extrato vegetal nas infecções e por meio de análise da fagocitose foi analisado a contribuição delas para a eliminação destes micro-organismos. A viabilidade dos macrófagos foi analisada por meio de teste colorimétrico com corante vermelho neutro. Foram checadadas a produção de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10) e óxido nítrico (NO), por ELISA e com reagente de Griess, respectivamente. Os resultados foram analisados por ANOVA e Tukey's Test ($P \leq 0.05$). Foi verificado que o extrato de *C. Longa* auxiliou de maneira efetiva os macrófagos na fagocitose dos micro-organismos avaliados, apresentando reduções significativas de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), e atuou na mediação da síntese de citocinas e NO. Os macrófagos apresentaram-se viáveis durante a infecção. Desta forma, foi constatado que o extrato de *C. longa* foi capaz de auxiliar *in vitro* os macrófagos na eliminação de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, além de proporcionar efeito imunomodulador na síntese de IL-1 β , TNF- α , IL-10 e NO, no intuito de controlar as infecções microbianas *in vitro*.

Palavras-chave: *Curcuma longa*. Infecção. RAW 264.7. *Staphylococcus aureus*. *Pseudomonas aeruginosa*. *Candida albicans*.

Figueira LW. *Effect of Curcuma longa L. extract on Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa and Candida albicans in vitro infections in murine macrophages (RAW 264.7) [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.*

ABSTRACT

Humans live in constant contact with microorganisms, commensals and pathogens, which may threaten host homeostasis. Pathogenic species present mechanisms able circumventing the host defense barriers, facilitating their dissemination and proliferation in invaded tissues. Antimicrobial-resistant strains emerge daily, then it is important finding an alternative method to control them. Medicinal plant products have been investigated for this purpose. In this study, the ability of C. longa extract to control *in vitro* infections by S. aureus, P. aeruginosa and C. albicans in murine macrophages (RAW 264.7) was evaluated. For this, the minimum inhibitory concentrations (MIC) of the plant extract were used in the infections. Phagocytosis was analyzed to check if they would contribute to eliminate these microorganisms. The viability of the macrophages was analyzed by colorimetric test using neutral red dye. Productions of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-10) and nitric oxide (NO) were verified during infection by ELISA and Griess's reagent, respectively. The results were analyzed by ANOVA and Tukey's Test ($P \leq 0.05$). C. Longa L. extract effectively assisted the macrophages in the phagocytosis of the evaluated microorganisms, presenting significant reductions of colony-forming units per milliliter (CFU/mL), and mediated the synthesis of cytokines and NO. In addition, macrophages were viable during infection. C. Longa L. extract assisted *in vitro* the macrophages in the elimination of S. aureus, P. aeruginosa, and C. albicans, promoting immunomodulatory effect in the synthesis of IL-1 β , TNF- α , IL-10 and NO, in order to control microbial infections *in vitro*.

Keywords: Curcuma longa; Infection; RAW 264.7; Staphylococcus aureus; Pseudomonas aeruginosa; Candida albicans.

1 INTRODUÇÃO

Os seres humanos vivem em constante relação com micro-organismos, tanto comensais como patogênicos que podem ameaçar a homeostase do hospedeiro. As espécies patogênicas apresentam mecanismos capazes de contornar as barreiras de defesa do corpo, facilitando sua disseminação e proliferação nos tecidos invadidos, prejudicando as funções normais do hospedeiro e consequentemente gerando quadros de infecção e processo inflamatório (Chaplin, 2010). Micro-organismos possuem fatores específicos que desafiam a imunidade durante uma infecção (Flannagan et al., 2015), como bloqueio de atividade de proteínas opsonizantes, capacidade de residir em vacúolos endossômicos, síntese de adesinas que possibilitam aderência em células epiteliais e de proteínas com efeito citotóxico (Wilkinson et al., 1979; Menzies, Kourteva, 1998; Bem-Haj et al., 2011).

No presente estudo foram analisadas cepas de relevância clínica, capazes de causar infecções em múltiplos sistemas, como *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Sabe-se que *S. aureus* é responsável por infecções hospitalares, porém pode também provocar doenças fora destes ambientes. É capaz de infectar os tecidos do corpo, provocando pequenas infecções cutâneas, além de bacteremia, endocardite, pneumonia necrotizante e síndrome de choque tóxico (Klein et al., 2007). A capacidade para formar biofilme também é considerada uma importante forma de sobrevivência e de virulência desta espécie (Moretro et al., 2003). Muitas formas de infecção por *S. aureus* estão associadas à formação de biofilme em tecidos ou em biomateriais implantados (Cassat et al., 2007). Esta bactéria é uma das constituintes da microbiota oral, sendo isolada em 24% a 84% em adultos saudáveis e 48% entre a incidência de desgaste de prótese dentária, além de ser responsável por doenças como queilite aguda, parotidites e mucosite oral estafilocócica (MacFarlane, Helnarska, 1976; Goldberg, 1981; Bagg et al., 1995; Tawara et al., 1996). Em adição também é sugerido que *S. aureus* pode ter um papel em falhas de implantes dentário (Kronström et al., 2001; Rokadiya, Malden, 2008).

P. aeruginosa pode ser isolada do trato intestinal e de outras superfícies mucosa. Nos dentes estão dispostas na forma de biofilme e são consideradas uma das principais causas de infecção hospitalar oportunista (Barbeau et al, 1998), além de causar infecções em pacientes imunocomprometidos e em indivíduos tratados com agentes antimicrobianos de amplo espectro (Morrison, Wenzel, 1984; Martin, 1987). Também é comum, a colonização deste micro-organismo no trato respiratório de pacientes que utilizam respiração mecânica, no trato gastrointestinal de pacientes em quimioterapia anticancerígena e na pele de pacientes queimados (Pollack et al., 2000). Na cavidade oral, podem causar periodontite pela presença de biofilme supragengival (da Silva-Boghossian et al., 2011). Além disso, esta bactéria pode causar infecção pulmonar grave quando células do biofilme dentário são dispersos na forma de aerossóis por brocas de alta velocidade na rotina odontológica (Barbeau et al., 1996).

C. albicans está presente na microbiota do trato gastrointestinal ou orofaringe de muitos indivíduos e pode ser considerada como um micro-organismo patogênico oportunista, uma vez que, formas comensais são inofensivas para indivíduos saudáveis (Holzheimer, Mannick, 2001; Calderone, 2002). Porém, quando as defesas imunológicas do hospedeiro estão enfraquecidas ou a microbiota local é perturbada, essa levedura pode causar infecções em mucosas, como vaginite e candidíase muco-cutânea aguda e crônica (Ruhnke, 2002; Parkin, 2006). Em pacientes imunocomprometidos por quimioterapia, vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou transplantes, *C. albicans* pode provocar infecção sistêmica potencialmente fatal e atingir órgãos, como rim, fígado e cérebro (Filler, Kullberg, 2002). A translocação deste fungo através da mucosa gastrointestinal para a corrente sanguínea é provavelmente o mecanismo mais comum pelo qual a colonização se torna sistêmica (Holzheimer, Mannick, 2001). Na cavidade oral essa levedura pode causar candidose pseudomembranosa e eritematosa (Parkin, 2006).

Neste estudo, a ação do extrato de *C. longa* L. foi analisada sobre infecções *in vitro* induzidas em macrófagos murinos, uma vez que, tem sido comprovados os efeitos antimicrobiano (Singh et al., 2017) e anti-inflamatório (Chandrasekaran et al., 2013; Toden et al., 2017) deste vegetal. Em adição, foi demonstrado que *C. longa* L. também apresenta outras atividades biológicas, como antiparasitária (Filho et al., 2009), anticarcinogênica (Hashim et al., 2013) e ação

sobre lipoproteínas plasmáticas (Ganjali et al., 2017). Entretanto, ainda não foram relatados na literatura estudos sobre o efeito deste vegetal no controle de infecções *in vitro*.

C. longa L. é um vegetal perene que pertence à família Zingiberaceae, sendo encontrada em regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo amplamente cultivada em países como Índia e China (Eigner, Scholz, 1999). Tem sido utilizada como planta medicinal (Araújo, Leon, 2001), tempero e corante alimentício natural (Cecílio Filho et al., 2000).

A importância dos fagócitos no controle de infecções por micro-organismos tem sido relatada (Krysan et al., 2014; Anantharajah et al., 2015; Lopez, Hung, 2017), porém, estudos que analisam efeitos farmacológicos de plantas medicinais nestas infecções ainda são escassos. Em contrapartida, tem sido encontrados estudos que constataram as ações antimicrobiana e anti-inflamatória de diferentes extratos sobre algumas cepas microbianas (de Oliveira et al., 2013a; de Oliveira et al., 2013b; de Oliveira et al., 2014; Mostafa et al., 2017; Yuan et al., 2016).

Desta forma, podemos perceber a necessidade de demonstração da eficácia de produtos vegetais sobre micro-organismos em infecções, analisando a capacidade deles em melhorar a ação de células de defesa, seja por fagocitose ou pela produção de mediadores químicos inflamatórios. A utilização destes produtos pode complementar ou ser uma alternativa para controlar micro-organismos, uma vez que, tem sido constantemente relatado casos de resistência aos antimicrobianos disponíveis.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar a capacidade do extrato de *C. longa* L. em controlar infecções *in vitro* por *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* em macrófagos murinos (RAW 264.7), por análise dos processos de fagocitose e imunorregulação.

2.1 Objetivos específicos

- a) Determinar a CIM do extrato de *C. longa* L. por meio de teste de microdiluição em caldo;
- b) Promover infecção *in vitro*;
- c) Realizar ensaio de viabilidade dos macrófagos nas infecções;
- d) Verificar a produção de citocinas pelos macrófagos nas infecções;
- e) Verificar a geração de NO nas infecções;
- f) Analisar a fagocitose por coloração de GIEMSA;
- g) Analisar a fagocitose por microscopia eletrônica de varredura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extrato vegetal

O extrato de *C. longa* L. (Seiva Brazilis, São Paulo, Brasil), foi adquirido na concentração de 200 mg/mL em propilenoglicol, com os devidos laudos e especificações.

3.2 Micro-organismos

Foram utilizadas cepas de referência (ATCC - *American Type Culture Collection*) de *S. aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 15442) e *C. albicans* (ATCC 18804), provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (ICT/UNESP). As cepas foram mantidas a -80°C em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI – Himedia, Mumbai, Índia) com glicerol 20%, para as bactérias, e em caldo *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YPD – Himedia) com glicerol 16%, para *C. albicans*. A adição de glicerol evita a formação de cristais de gelo que podem comprometer a integridade da célula microbiana. Para os testes, as cepas foram reativadas em ágar BHI (Himedia) ou ágar Sabetouraud dextrose (SD – Himedia) por 24 h a 37°C.

3.3 Teste de microdiluição em caldo

A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato foi determinada por teste de microdiluição em caldo, de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2002, 2003, 2012). Para tanto, após cultivo de 24 h, suspensões microbianas foram preparadas separadamente em solução salina estéril (NaCl 0,9%), com turbidez ajustada para 10^6 UFC/mL em espectrofotômetro (Micronal, São

Paulo, Brasil). Poços de microplaca foram preenchidos com 100 µL de caldo, sendo Mueller Hinton (Himedia), para as bactérias, e RPMI 1640 com glutamina, sem bicarbonato e indicador vermelho de fenol (Himedia), tamponado com MOPS – ácido (3-[N-morfolino] - propanosulfônico) (Sigma-Aldrich) – a pH 7.0 ± 0.1 , para *C. albicans*. Em seguida, foram acrescentados 100 µL do extrato vegetal apenas no primeiro poço de onde foi iniciada a diluição seriada (1:2), com isso foram obtidas dez concentrações do extrato (de 50 a 0,09 mg/mL). Adicionalmente, foram acrescentados 100 µL do inóculo padronizado em todos os poços. A concentração final do inóculo bacteriano foi de 5×10^5 UFC/mL e do inóculo fúngico foi entre 5×10^2 e 2.5×10^3 UFC/mL .

3.4 Cultivo dos macrófagos

Macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 (Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) foram cultivados em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM – LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) suplementado com soro fetal bovino inativado 10% (SFB – Invitrogen, Nova York, EUA) e penicilina-estreptomicina 1% (5000 U/mL-5000 µg/mL, LGC Biotecnologia), a 37°C e CO₂ 5%, com umidade atmosférica, até subconfluência celular. As células viáveis foram quantificadas por meio do teste de exclusão com azul de Trypan (0,4% – Sigma-Aldrich) (de Oliveira, 2017).

3.5 Modelo de infecção *in vitro*

Macrófagos foram adicionados em placa de 24 poços, na proporção de 10^5 células em 300 µL de DMEM em cada poço, sendo cultivados por 24 h a 37°C e CO₂ 5%. Posteriormente, foram induzidas as infecções separadamente por *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, na proporção de 1:5 (macrófago:micro-organismo) (Koziel et al., 2009; Ponnusamy, Clinkenbeard, 2015). Suspensões microbianas a 10^7

UFC/mL foram preparadas em solução salina estéril (NaCl 0,9%), a partir de culturas de 24 h formadas em ágar. Em seguida, as soluções contendo os produtos a serem avaliados foram preparadas em DMEM livre de antimicrobianos e SFB, de maneira que, a concentração final correspondeu as suas CIM (Quadro 1), com isso, estas soluções foram preparadas 2X concentrada ($n = 6/\text{grupo}$).

Quadro 1 – Concentrações dos produtos analisadas nas infecções por *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*

Grupo Experimental	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
<i>C. longa</i> L.	25 mg/mL	25 mg/mL	12.5 mg/mL
Antimicrobiano*	1%	1%	1%
DMEM**	Puro	Puro	Puro

Legenda: *Penicilina-estreptomicina (5000 U/mL-5000 µg/mL) para *S. aureus* e *P. aeruginosa* e nistatina (100.000 UI/mL) para *C. albicans*. **Meio de cultura para os macrófagos livre de soro fetal bovino e antimicrobianos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi preparada uma solução de trabalho, contendo partes iguais da solução do inóculo padronizado e da solução de cada produto a ser avaliado. A infecção foi induzida por 30 min (Ponnusamy, Clinkenbeard, 2015; Tranchemontagne et al., 2015), sob incubação (37°C e CO₂ 5%), acrescentando sobre os macrófagos 1000 µL desta solução de trabalho. Posteriormente, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para posterior análise imunológica. Foram acrescentados 1000 µL/poço de tampão fosfato-salino (PBS) gelado (6°C) para paralisar a fagocitose (Kozziel et al., 2009), bem como, para descartar micro-organismos não fagocitados, este processo foi realizado por duas vezes.

A ação dos produtos sobre a fagocitose foi verificada a partir da lise dos macrófagos, no intuito de ser checada a quantidade de micro-organismos sobreviventes no interior das células após este processo. Para tanto, foram acrescentados 1000 µL/poço de água destilada estéril em temperatura ambiente. A lise foi induzida por 10 min sob agitação em *shaker* (Solab, Piracicaba, Brasil). Em seguida, 100 µL de cada suspensão foram semeados em ágar BHI ou SD. Após

incubação por 24 h, foi determinada a concentração de UFC/mL (de Oliveira et al., 2017).

3.6 Ensaio de viabilidade dos macrófagos durante as infecções

O teste de vermelho neutro (VN) foi utilizado para analisar a viabilidade de RAW 264.7 durante as infecções. O corante VN tem a capacidade de interagir apenas com lisossomos em células viáveis, sendo excluída portanto a chance dos resultados estarem relacionados com os micro-organismos ao invés dos macrófagos, devido os micro-organismos não apresentarem lisossomos. Para tanto, em microplacas foram acrescentados 200 μ L de DMEM contendo 4×10^4 células viáveis em cada poço, sendo $n = 10$ /grupo. Após 24 h de incubação (37°C e CO₂ 5%), os macrófagos foram infectados por 30 min como descrito anteriormente. Após lavagens dos poços com PBS, foram adicionados 100 μ L/poço de solução de VN (20 μ g/mL de PBS) e foi realizada incubação por 2 h sob proteção de luz. Em seguida, o sobrenadante foi substituído por etanol 100% (100 μ L/poço) e a microplaca foi agitada por 15 min em *shaker*. Em espectrofotômetro de microplacas (570 nm – Bio-Tek, Vermont, EUA) foi lida a absorbância dos poços e os valores de densidade óptica (DO) foram convertidos em percentual de viabilidade em relação ao grupo controle (DMEM puro). Adicionalmente, a viabilidade de macrófagos não infectados também foi checada, para fins comparativos

3.7 Produção de citocinas pelos macrófagos durante as infecções

Foram quantificados os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), responsáveis por iniciar a defesa contra agentes patogênicos exógenos, e anti-inflamatória (IL-10), responsável por manter a homeostase da resposta imune, a partir dos sobrenadantes de RAW 264.7 gerados nas infecções por *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Para tanto, foram utilizados kits comerciais (R&D Systems, Minneapolis, USA), sendo os catálogos DY401 (IL-1 β),

DY410 (TNF- α), DY406 (IL-6) e DY417 (IL-10), segundo orientação do fabricante. A absorbância dos poços da microplaca foi lida em espectrofotômetro (450 nm – BioTek) e os valores de DO foram convertidos em picogramas por mililitro (pg/mL), considerando a curva-padrão de cada citocina. Esta conversão foi realizada no programa GraphPad Prism 5.0. Para fins de comparação, os níveis destas citocina em sobrenadantes de RAW 264.7 livre de micro-organismos também foram analisados.

3.8 Geração de NO durante as infecções

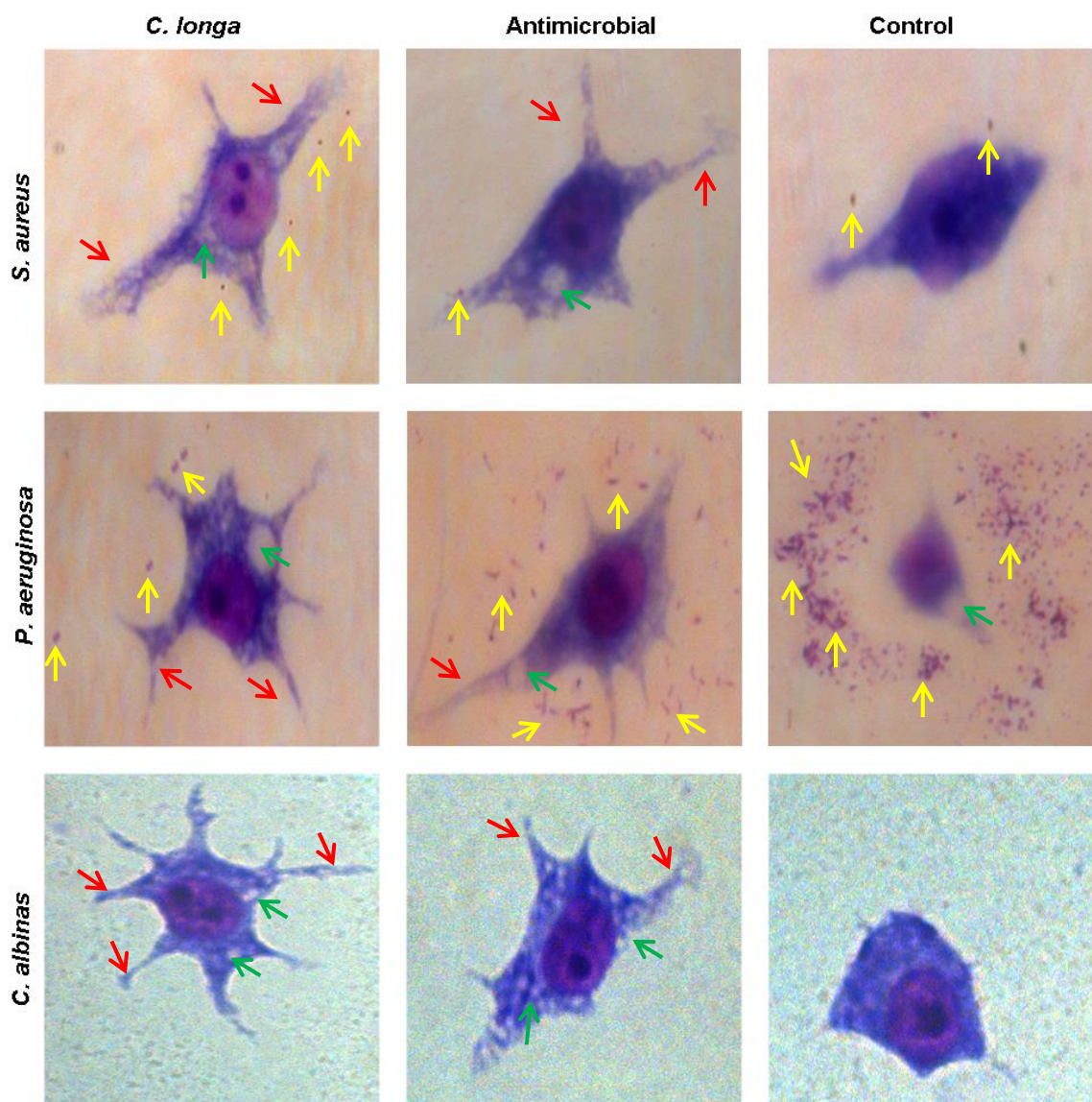
Em microplaca foram acrescentados 100 μ L/poço de cada sobrenadante e 100 μ L/poço de reagente de Griess. Em seguida, a microplaca foi levada ao *shaker* por 10 min e posteriormente ao espectrofotômetro de microplacas (570 nm – Bio-Tek). As DO foram convertidos em μ M (micromolar), de acordo com a curva-padrão de nitrito entre 100 e 0 μ M (0.1 M NO_2^- – Sigma-Aldrich), utilizando para isso o programa GraphPad Prism 5.0. A concentração de nitrito observada em grupos de macrófagos não infectados também foi verificada, para fins comparativos.

3.9 Análise da fagocitose por coloração de Giemsa

Os macrófagos foram cultivados sobre lâminas de vidro estéreis, sendo 10^6 células/lâmina. As lâminas foram acomodadas em câmara de poliestireno estéril com tampa e quatro compartimentos (Nunc, Roskilde, Dinamarca). As células foram cultivadas por 24 h (37°C e CO_2 5%) em 3000 μ L de DMEM. Em seguida, foram induzidas as infecções como descrito anteriormente. Foi utilizado PBS gelado para lavagem das lâminas e as células foram fixadas com metanol 100% por 10 min. Após descarte do álcool, foi adicionado 3000 μ L/lâmina de corante Giemsa composto por 1000 μ L de metanol 100% (pH 6,8), 500 μ L de glicerol e 8 mg do corante em pó (Merk, Darmstadt, Alemanha), diluído 2X em água destilada. Após 10 min de exposição ao corante, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas em temperatura ambiente para secagem. Em seguida, foram analisadas

em microscópio óptico com lente de imersão (1000X). A análise da interação dos micro-organismos com os macrófagos, por meio desta técnica, foi apresentada na Figura 1.

Figura 1 - Coloração de Giemsa aplicada nos grupos infectados e tratados com extrato de *C. longa* L., antimicrobianos (penicilina-estreptomicina para as bactérias e nistatina para a levedura) ou DMEM livre de SFB e antimicrobianos (controle)



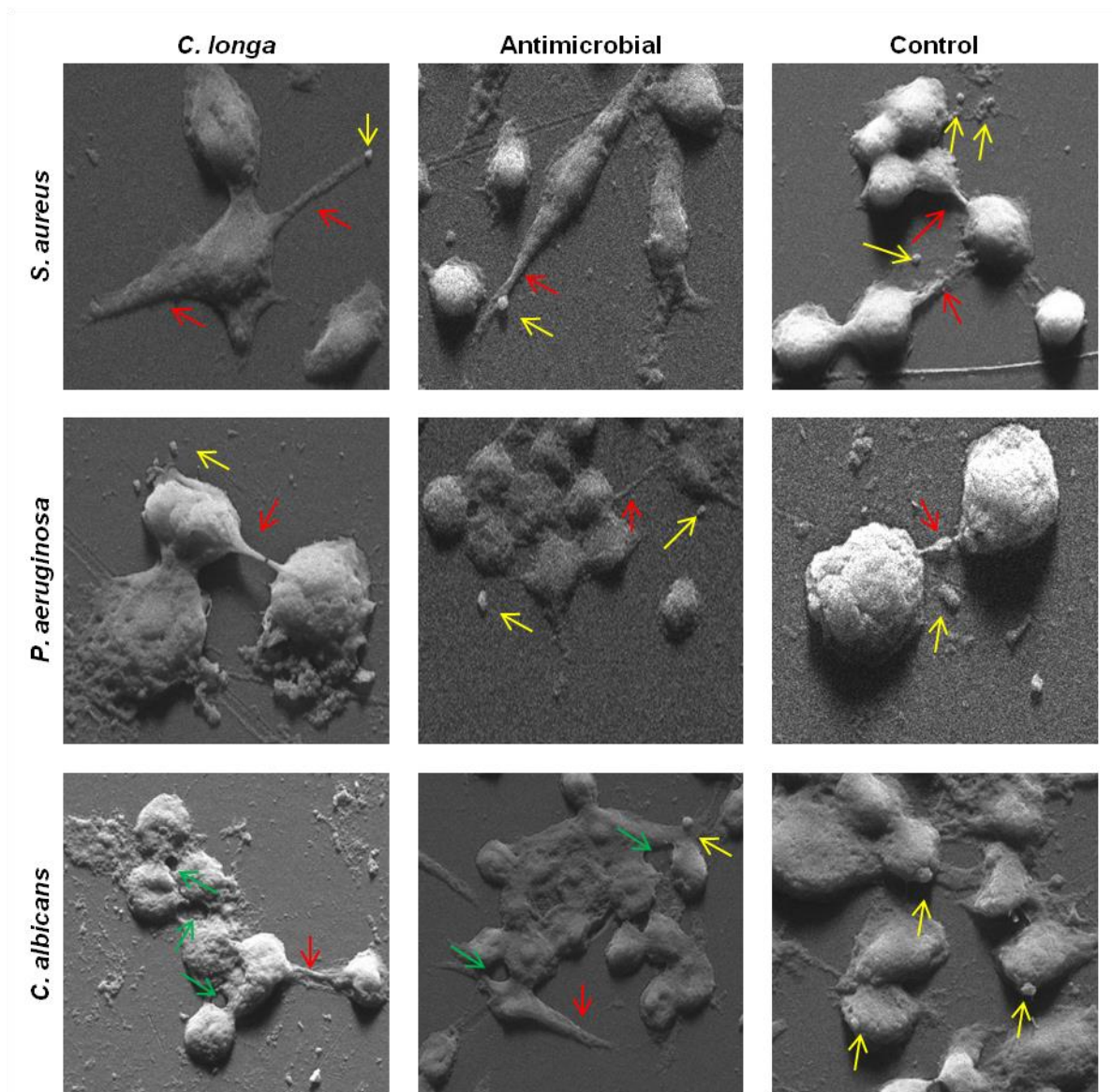
Legenda: Setas amarelas indicam a interação dos micro-organismos com os macrófagos murinos (RAW 264.7); Setas vermelhas apontam a emissão de pseudópodes pelos macrófagos, indicando a ativação destas células; Setas verdes mostram a presença de vacúolos digestivo, que podem sugerir atividade enzimática dos macrófagos durante a fagocitose no intuito de eliminar micro-organismos fagocitados. Visualização por microscopia óptica (1000x).

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.10 Análise da fagocitose em microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Para esta análise, foram utilizados corpos de prova em poliestireno (5 mm²) contidos em placa de 24 poços, os quais foram previamente esterilizados com glutaraldeído 2% *overnight*. Nos poços, foram adicionados 800 µL de DMEM contendo 10⁵ células e após 24 h de incubação (37°C e CO₂ 5%) foi induzida cada infecção, como descrito anteriormente. Lavagens com PBS gelado foram realizadas e os macrófagos foram fixados por 20 min com solução de glutaraldeído 0,25%, paraformaldeído 4% e PBS (proporção por mL: 125:400:475 µL). Em seguida, os corpos de prova foram lavados com PBS e expostos à diferentes soluções desidratantes, como álcool 70% (10 min), álcool 90% (10 min), álcool 100% (10 min) e novamente álcool 100% (20 min). As amostras foram deixadas em temperatura ambiente *overnight*, para total secagem. Posteriormente, os corpos de prova foram metalizadas com pó de ouro a vácuo (Emitech SC7620 Sputter Coater, UK) e analisados em MEV (Inspect S50, Oregon, USA). As interações realizadas pelos micro-organismos com os macrófagos e obtidas no MEV podem ser verificadas na Figura 2.

Figura 2 – Análise da interação de micro-organismos com macrófagos murinos (RAW 264.7) nos grupos infectados e tratados com extrato de *C. longa* L., antimicrobianos (penicilina-estreptomicina para as bactérias e nistatina para a levedura) ou DMEM livre de SFB (controle)



Legenda: Setas amarelas indicam a interação dos micro-organismos com os macrófagos murinos (RAW 264.7); Setas vermelhas apontam a emissão de pseudópodes pelos macrófagos, indicando a ativação destas células; Setas verdes mostram a presença de vacúolos digestivos, que podem sugerir atividade enzimática dos macrófagos durante a fagocitose no intuito de eliminar micro-organismos fagocitados. Visualização em microscópio eletrônico de varredura (3000x).

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.11 Análise estatística

Os resultados foram apresentados em valores médios (\pm desvio-padrão), sendo analisados por ANOVA e Tukey's Test, considerando diferença estatística significativa quando $P \leq 0,05$. Para tanto, foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0.

4 RESULTADOS

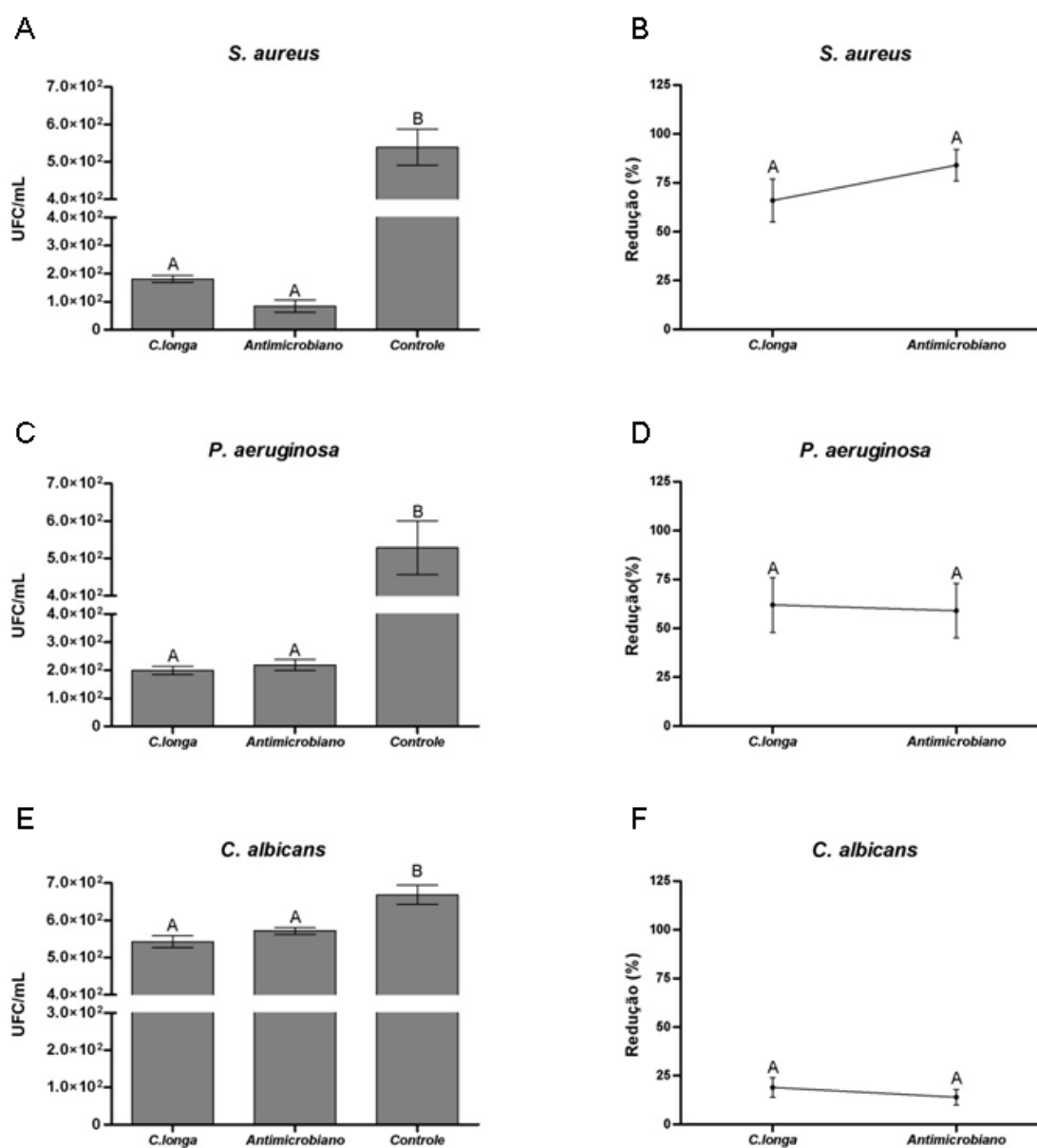
4.1 Efeito antimicrobiano do extrato de *C. longa* L.

O extrato de *C. longa* L. apresentou CIM de 25 mg/mL para *S. aureus* e *P. aeruginosa* e de 12,5 mg/mL para *C. albicans*.

4.2 Fagocitose dos micro-organismos

Na infecção por *S. aureus*, foi identificada redução significativa de UFC/mL, nos grupos tratados com o extrato de *C. longa* L. ($66,33 \pm 4,38\%$) e antimicrobiano ($84,4 \pm 3,2\%$), em comparação ao grupo controle. (Figura 3A-B), porém demonstraram efeito semelhante para controlar esta infecção. O extrato vegetal, também apresentou redução significativa de UFC/mL na infecção por *P. aeruginosa*, de cerca de $62,33 \pm 5,5\%$, em relação ao grupo controle (Figura 3C-D), atuando de forma semelhante ao antimicrobiano ($58,5 \pm 5,6\%$). Na infecção por *C. albicans*, o tratamento com extrato, vegetal proporcionou redução significativa da levedura de forma semelhante ao antifúngico, sendo $18,8 \pm 1,9\%$ e $14,47 \pm 1,54\%$, respectivamente (Figura 3E-F).

Figura 3 – Análise da Fagocitose. (A, C, E) Valores médios (\pm desvio-padrão) de UFC/mL obtidas da lise de macrófagos murinos RAW 264.7 infectados por *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* e tratados com extrato de *C. longa* L., antimicrobianos (penicilina-estreptomicina para as bactérias e nistatina para a levedura) ou DMEM livre de SFB e antimicrobianos. (B, D, F) Valores médios (\pm desvio-padrão) de percentuais de redução de UFC/mL



Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($P \leq 0,05$; ANOVA, Tukey's Test).

Fonte: Elaborada pelo autor.

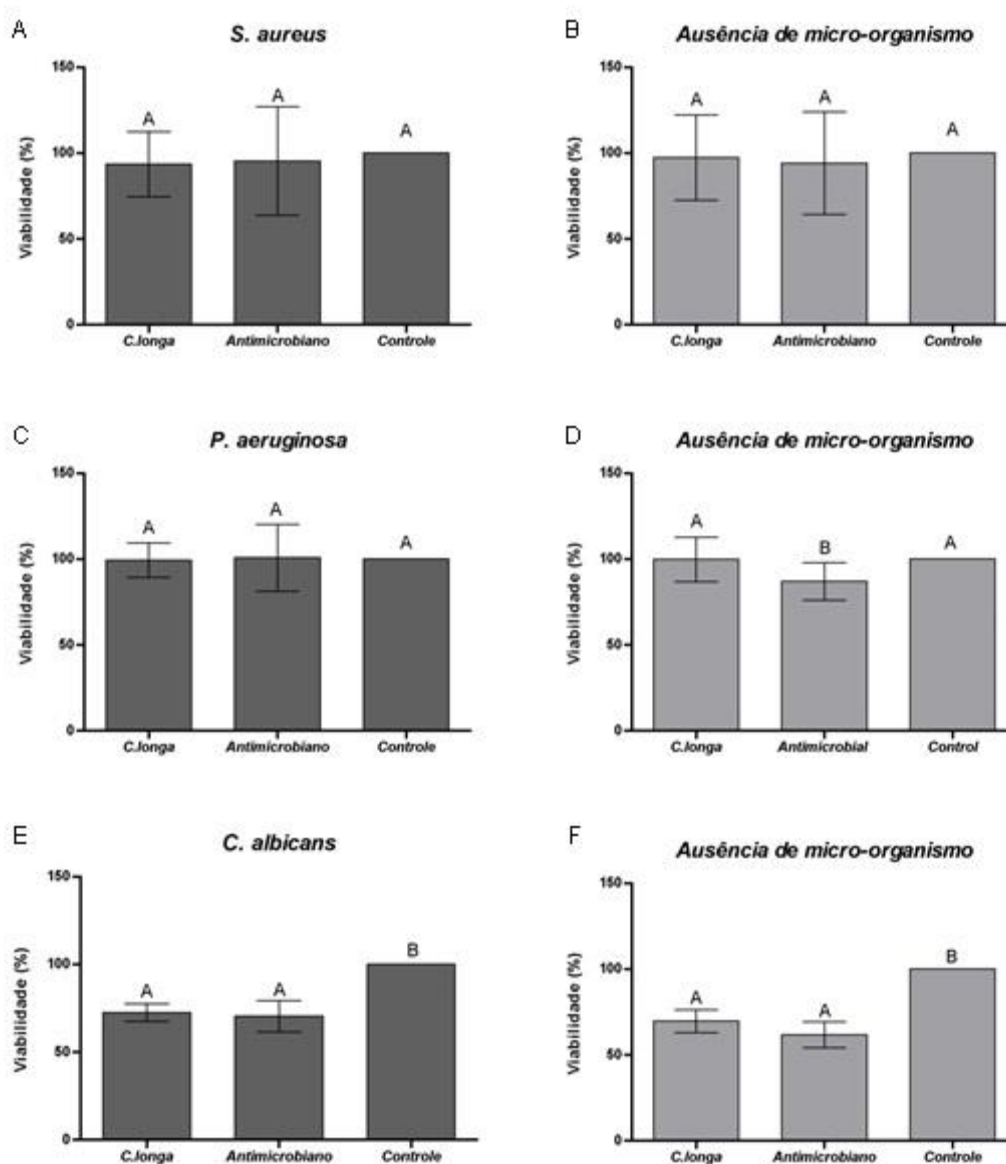
4.3 Viabilidade celular dos macrófagos

Na infecção por *S. aureus* e tratamento com extrato de *C. longa* L. foi verificada viabilidade de RAW 264.7 similar ao grupo controle (100% viável) e também ao grupo tratado com o antimicrobiano (Figura 3A). Nos grupos não infectados também não foi observada redução de viabilidade dos macrófagos (Figura 3B), quando comparados ao grupo controle, demonstrando que durante a infecção a atividade lisossomal dos macrófagos esteve similar aos grupos não infectados.

Na análise da infecção por *P. aeruginosa* foi verificado que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 3C). Na ausência da bactéria, o grupo tratado com extrato vegetal apresentou viabilidade celular semelhante ao grupo controle (100% viável), contudo foi observada redução significativa de viabilidade no grupo exposto ao antimicrobiano, apresentando viabilidade de $87 \pm 6\%$, como pode ser observada na Figura 3D. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos infectados e livres da bactéria.

Na infecção por *C. albicans*, foi constatada redução na viabilidade de RAW 264.7 nos tratamentos com o extrato ($72.5 \pm 1.7\%$) e antimicrobiano ($70 \pm 3.1\%$) quando comparada ao grupo controle (Figura 3E). Estas reduções foram semelhantes entre estes dois grupos. Na ausência de infecção (Figura 3F), este mesmo cenário foi encontrado, sendo obtidos os percentuais de $72,5 \pm 4,93$ e $70,38 \pm 8,98$, respectivamente. Em adição, foi observado que a viabilidade dos macrófagos foi similar entre os grupos com presença e ausência da levedura.

Figura 4 – Viabilidade celular dos macrófagos. Valores médios (\pm desvio-padrão) do percentual de viabilidade dos macrófagos murinos RAW 264.7 infectados por *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* (A, C, E) ou livres de micro-organismos (B, D, F) e tratados com extrato de *C. longa* L., antimicrobianos (penicilina-estreptomicina para as bactérias e nistatina para a levedura) ou DMEM livre de SFB e antimicrobianos



Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($P \leq 0,05$; ANOVA, Tukey's Test).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Quantificação de citocinas

Foi constatado que os níveis de IL-1 β , na infecção por *S. aureus*, foram mais elevados no grupo tratado com extrato de *C. longa* L., em relação ao grupo exposto ao antimicrobiano, bem como, ao grupo controle (Figura 5A-I).

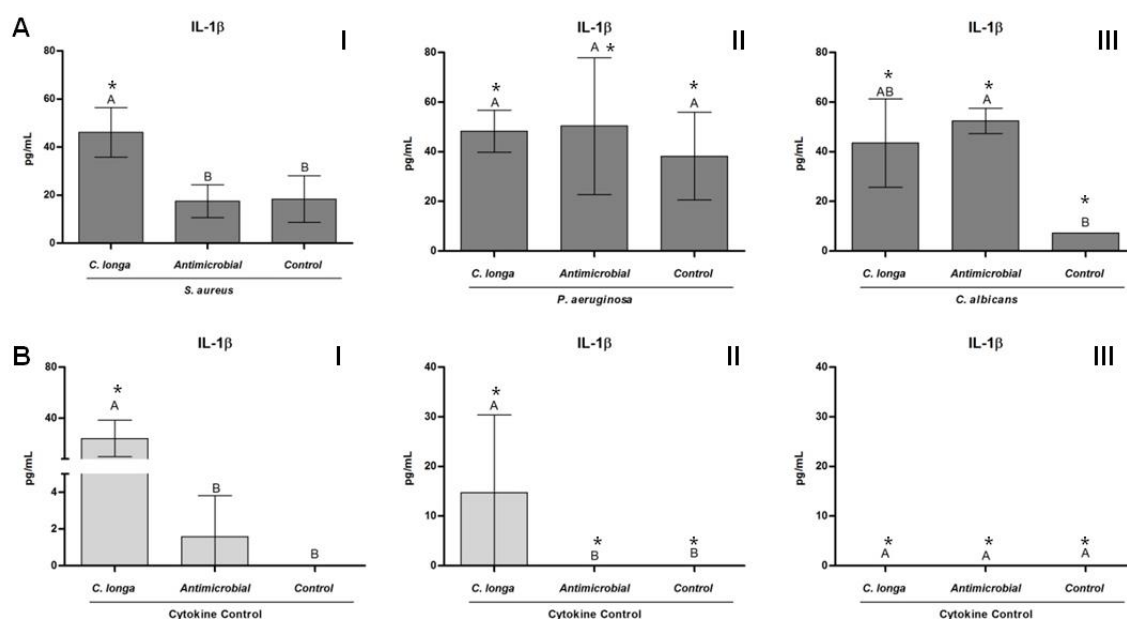
Na infecção por *P. aeruginosa*, foi verificado que houve produção semelhante desta citocina em todos os grupos experimentais (Figura 5A-II).

Quanto à infecção de *C. albicans*, foi constatada maior síntese no grupo tratado com o antimicrobiano, o tratamento com o extrato proporcionou produção de forma semelhante ao grupo controle (Figura 5A-III).

Na ausência de infecção, os níveis de IL-1 β foram maiores no grupo tratado com extrato, em comparação aos grupos tratados com antimicrobiano e controle (Figura 5B-I e B-II). Ausência de produção desta citocina também foi verificada (Figura 5B-III).

Adicionalmente, foi observado que os níveis de IL-1 β estavam mais elevados no tratamento com o extrato vegetal em todas as infecções, bem como, na exposição ao antimicrobiano e no grupo controle, nas infecções por *P. aeruginosa* e *C. albicans* (vide asteriscos).

Figura 5 – Quantificação de citocina. Valores médios (\pm desvio-padrão) da concentração de IL-1 β (pg/mL) produzida por macrófagos murinos RAW 264.7 infectados (A) por *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* ou livres de micro-organismos (B) e tratados com extrato de *C. longa* L., antimicrobiano (penicilina-estreptomicina para as bactérias e nistatina para a levedura) ou DMEM livre de SFB e antimicrobianos



Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($P \leq 0,05$; ANOVA, Tukey's Test). *Diferença estatística significativa na comparação entre os grupos com infecção e livres de micro-organismos em cada tratamento.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em relação à produção de TNF- α , foi observado que os níveis desta citocina foram semelhantes em todos os grupos experimentais, na infecção por *S. aureus* (Figura 6C-I).

Na infecção por *P. aeruginosa*, houve maior produção desta citocina no grupo tratado com o extrato que no grupo exposto ao antimicrobiano e grupo controle (Figura 6C-II).

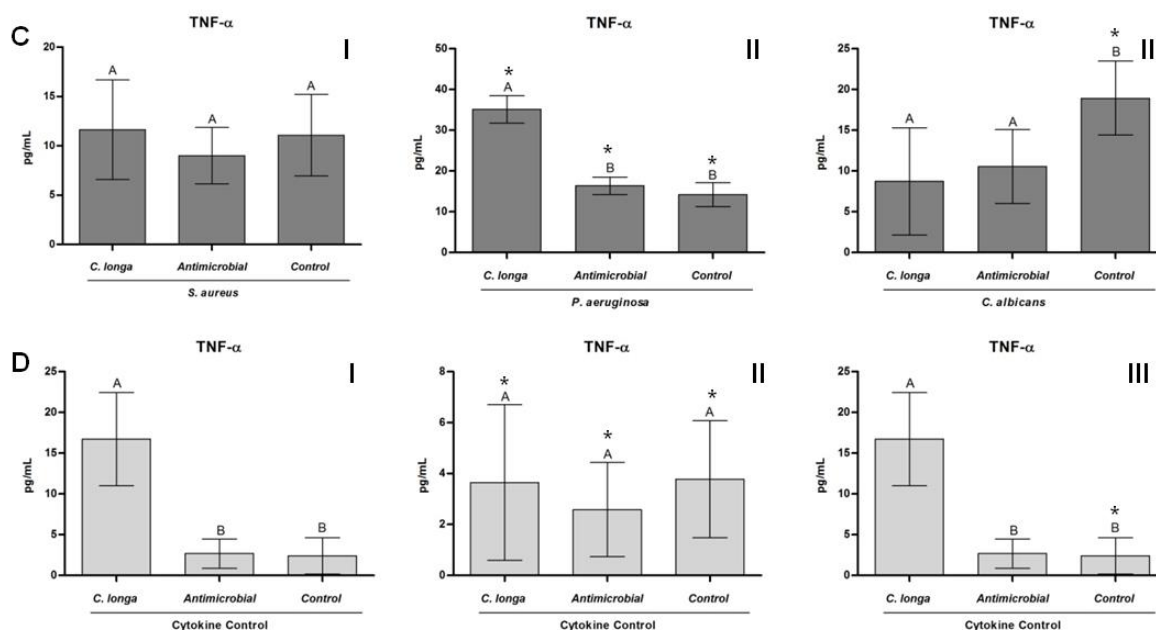
Na infecção por *C. albicans*, os níveis desta citocina nos grupos tratados com extrato ou antimicrobiano foram inferiores ao grupo controle (Figura 6C-III).

Na ausência de infecção, houve maior produção de TNF- α no grupo tratado com o extrato em relação aos grupos exposto ao antimicrobiano e controle (Figura 6

D-I e D-III), além de produção semelhante entre os grupos experimentais (Figura 6D-II).

Houve maior produção de TNF- α em todos os grupos experimentais, durante infecção por *P. aeruginosa*, em relação aos grupos não infectados pela bactéria, além de ter ocorrido maior síntese desta citocina no grupo controle infectado por *C. albicans* que no grupo livre da levedura (vide asteriscos).

Figura 6 – Quantificação de citocina. Valores médios (\pm desvio-padrão) da concentração de TNF- α (pg/mL) produzida por macrófagos murinos RAW 264.7 infectados (C) por *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* ou livres de micro-organismos (D) e tratados com extrato de *C. longa* L., antimicrobiano (penicilina-estreptomicina para as bactérias e nistatina para a levedura) ou DMEM livre de SFB e antimicrobianos



Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($P \leq 0,05$; ANOVA, Tukey's Test). *Diferença estatística significativa na comparação entre os grupos com infecção e livres de micro-organismos em cada tratamento.

Fonte: Elaborada pelo autor.

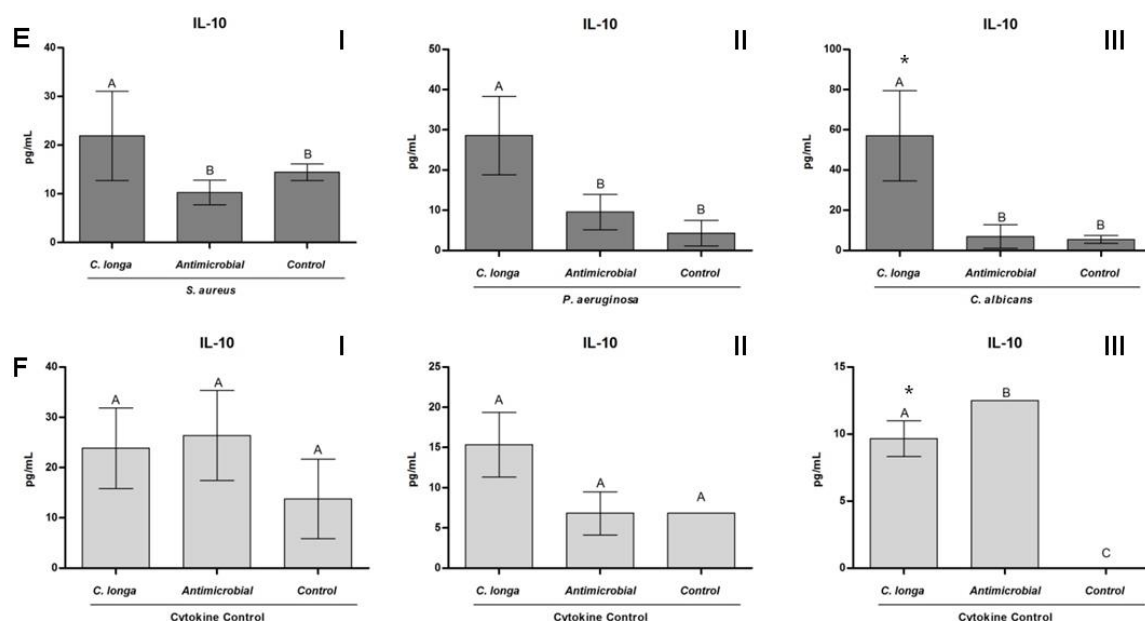
Os níveis de IL-10 foram maiores em grupos tratados com extrato de *C. longa* L. que em grupos expostos ao antimicrobiano, bem como, em grupos não

tratados, nas infecções por *S. aureus* (Figura 7E-I), *P. aeruginosa* (Figura 7E-II) e *C. albicans* (Figura 7E-III).

Na ausência de micro-organismos, foi observada produção semelhante de IL-10 em todos os grupos (Figura 7F-I e F-II), além de síntese superior nos grupos tratados com extrato ou antimicrobiano em relação ao grupo controle (Figura 7F-III).

Em adição, foi constatada maior produção de IL-10 somente no grupo tratado com o extrato vegetal durante infecção por *C. albicans* (vide asteriscos).

Figura 7 – Quantificação de citocina. Valores médios (\pm desvio-padrão) da concentração de IL-10 (pg/mL) produzida por macrófagos murinos RAW 264.7 infectados (E) por *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* ou livres de micro-organismos (F) e tratados com extrato de *C. longa* L., antimicrobiano (penicilina-estreptomicina para as bactérias e nistatina para a levedura) ou DMEM livre de SFB e antimicrobianos



Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($P \leq 0,05$; ANOVA, Tukey's Test). *Diferença estatística significativa na comparação entre os grupos com infecção e livres de micro-organismos em cada tratamento.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na análise dos níveis de IL-6, não foi observada produção significativa desta citocina em nenhum grupo experimental, tanto na presença como na ausência de infecção.

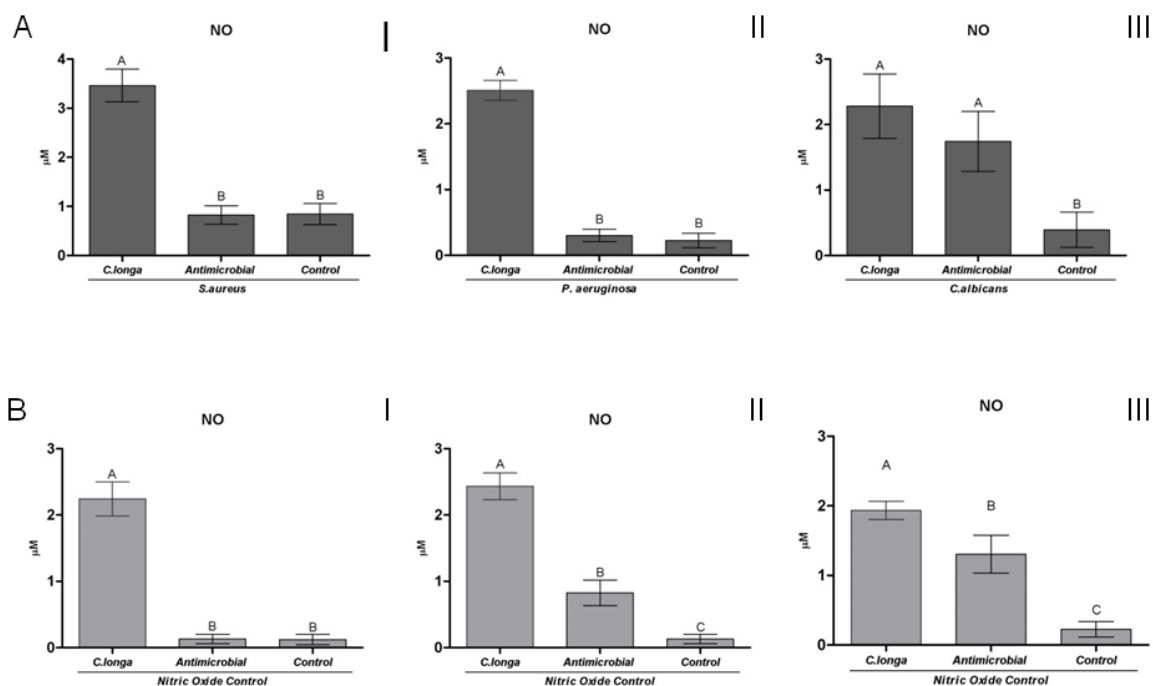
4.5 Geração de NO

Nas infecções por *S. aureus* (Figura 8A-I) e *P. aeruginosa* (Figura 8A-II) a geração de NO foi superior no grupo tratado com extrato de *C. longa* L., em relação ao grupo exposto ao antimicrobiano e grupo controle. Porém, na infecção por *C. albicans* ocorreu maior síntese de NO nos grupos tratados com extrato e antimicrobiano, em comparação ao grupo controle (Figura 4A-III).

Na ausência de infecção, foi observada maior produção de NO em grupos tratados com extrato em relação aos grupos expostos ao antimicrobiano ou não tratados (Figura 8B-I, B-II e B-III).

Na análise realizada entre grupos infectados e livres de micro-organismos, não foi encontrada diferença estatística significativa.

Figura 8 – Óxido nítrico (NO). Valores médios (\pm desvio-padrão) da concentração de NO (μM) produzida por macrófagos murinos RAW 264.7 infectados (A) por *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* ou livres de micro-organismos (B) e tratados com extrato de *C. longa* L., antimicrobiano (penicilina-estreptomicina para as bactérias e nistatina para a levedura) ou DMEM livre de SFB e antimicrobianos



Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($P \leq 0,05$; ANOVA, Tukey's Test). *Diferença estatística significativa na comparação entre os grupos com infecção e livres de micro-organismos em cada tratamento.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, por meio de análise da fagocitose, foi verificado que nas infecções por *S. aureus* e *P. aeruginosa*, o extrato de *C. longa* L. teve efeito significativo, auxiliando os macrófagos a controlar as infecções *in vitro*, como mostram as reduções de UFC/mL nos grupos que foram tratados com o extrato vegetal (Figura 3A a 3D).

S. aureus apresenta patogenicidade considerável, uma vez que, conta com alguns fatores que propiciam escape de elementos da imunidade do hospedeiro durante uma infecção (Flannagan et al., 2015). Algumas de suas moléculas, utilizadas para o reconhecimento por fagócitos, deixam de ser expressas em sua superfície, permitindo sua ocultação para as células de defesa e impossibilitando sua eliminação por elas (Wilkinson et al., 1979). Uma vez fagocitado, *S. aureus* pode se livrar da degradação proporcionada pelo fagolisossomo e ser capaz de sobreviver em vacúolos endossômicos, e a partir destes, alcançar o citoplasma e induzir a morte da célula por apoptose (Bayles et al., 1998; Menzies, Kourteva 1998; Nuzzo et al., 2000). No presente estudo, o extrato de *C. longa* L. teve a capacidade de proporcionar auxílio aos macrófagos para eliminar este micro-organismo, por meio de fagocitose. Em adição, possivelmente possa permitir a síntese de citocinas, fatores de crescimento, lisozimas, proteases, componentes do complemento, fatores de coagulação e prostaglandina (Woods et al., 2000), na tentativa de eliminar ou inibir o acúmulo deste patógeno (Kong et al., 2014).

Também foi possível verificar que o extrato de *C. longa* L. auxiliou os macrófagos a controlar a infecção por *P. aeruginosa*, uma bactéria capaz de vencer a resposta imune inata e sobreviver no hospedeiro (Cigana et al., 2016). Foi relatado que esta bactéria possui adesinas (pili e exoenzima S) que permitem sua aderência em células epiteliais, dificultando assim o processo de fagocitose pelos macrófagos (Bem Haj Khalifa et al., 2011). Foi demonstrado que a perda de motilidade de *P. aeruginosa* em cepas mutantes e resistentes pode resultar em dificuldade de seu reconhecimento por células da resposta imune inata (Amiel et al., 2010). Adicionalmente, a exoenzima S pode causar interrupção da organização normal do citoesqueleto, destruição de imunoglobulinas G e A, além de despolimerização de

filamentos, contribuindo para resistência à ação de macrófagos (Ben Haj Khalifa et al., 2011). No entanto, células fagocíticas são capazes de interagir com receptores promotores de fagocitose, como porção Fc de anticorpos, receptor 3 do complemento e receptor de manose que induz a emissão de pseudópodos, buscando eliminar a bactéria do sítio de infecção (Speert et al., 1998)

Na infecção por *C. albicans* foi observada redução significativa de UFC/mL após tratamento com o extrato de *C. longa* L., bem como, com o antimicrobiano (Figura 3E-F), demonstrando que o extrato foi efetivo no auxílio aos macrófagos para controlar a infecção fúngica. A eliminação de patógenos fúngicos em uma infecção pode depender do comportamento de células fagocíticas, uma vez que, a forma com que estas células reconhecem, englobam e eliminam estes patógenos dependerá do tamanho, da forma e composição das células fúngicas, bem como, do sucesso dos mecanismos fúngicos para sobrepor o sistema imunológico (Erwig, Gow, 2016). *C. albicans* possui diversos fatores de virulência e atributos diversificados para infectar o hospedeiro e escapar da fagocitose, incluindo transição morfológica entre as formas de levedura e hifa; presença de adesinas e invasinas na superfície celular: formação de biofilme; comutação fenotípica; e secreção de enzimas hidrolíticas. Em adição, a adaptação rápida às alterações de pH ambiental, a flexibilidade metabólica e as formas de aquisição de nutrientes são alguns atributos que podem favorecer a sobrevivência desta levedura e diminuir o potencial dos macrófagos na fagocitose (Nicholls et al., 2011).

A atividade lisossomal dos macrófagos esteve ativa tanto nas infecções por *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* como fora delas, como pode ser observado na Figura 4. Nos grupos infectados por *S. aureus* (Figura 4A) ou livres de infecção (Figura 4B) pode ser observado que a viabilidade dos macrófagos expostos ao extrato vegetal e ao antimicrobiano não sofreu redução significativa, apresentando percentuais semelhantes ao grupo controle (100% viável). Analisando o grupo infectado por *P. aeruginosa* (Figura 4C), também não foi observada redução de viabilidade, ocorrendo queda apenas no grupo exposto ao antimicrobiano livre de infecção (Figura 4D). No caso de infecção por *C. albicans*, foi verificado que houve diminuição da viabilidade dos macrófagos nos grupos tratados com extrato vegetal e antimicrobiano (Figura 4E). Este mesmo cenário foi observado nos grupos não infectados (Figura 4F). Dessa forma, é possível sugerir que a atividade lisossomal

dos macrófagos não foi afetada significativamente. Os lisossomos ocupam um papel crucial na fagocitose de patógenos por contribuir para eliminação de invasores intracelulares; homeostase celular; degradação, reciclagem ou secreção de resíduos celulares; reparo da membrana plasmática; sinalização e metabolismo energético (Settembre et al., 2013).

Em relação a produção de IL-1 β , foi verificado que durante as infecções por *S. aureus* (Figura 5A-I) seus nível no grupo tratado com extrato de *C. longa* L. foi superior em relação ao grupo não infectado (Figuras 5B-I), indicando a capacidade do extrato vegetal em contribuir para a produção de IL-1 β , no intuito de buscar a eliminação do agente que estimulou a sua síntese. Esta citocina é conhecida como um potente mediador ou regulador da inflamação, atuando no recrutamento de fatores celulares de defesa para o local da infecção, bem como, na facilitação da passagem de leucócitos da circulação para os tecidos (Lawrence, Gilroy, 2007) e na resposta inflamatória antimicrobiana (LaRock et al, 2016).

Na infecção por *P. aeruginosa*, foi verificado que houve produção semelhante de IL-1 β em todos os grupos experimentais (Figura 5A-II). Entretanto, houve produção mais acentuada desta citocina no grupo com presença de infecção, quando comparado ao grupo ausente de micro-organismo (Figura B-II). Com isso, pode ser verificado que o extrato auxiliou os macrófagos na eliminação de *P. aeruginosa* por meio da síntese deste mediador inflamatório. Esta bactéria possui uma potente enzima, conhecida como exotoxina A, capaz de entrar em células eucariontes por endocitose e provocar inibição da síntese proteica e indução de morte celular instantânea, facilitando sua disseminação para outros locais (Beattie, Merrill, 1996; Yates, Merrill, 2001). Além disso, possui um sistema de secreção do tipo III (T3SS) que permite injetar exotoxinas (ExoU e ExoS) no citoplasma da célula hospedeira, provocando morte celular rápida por rompimento da membrana. Estas toxinas podem provocar inibição da fagocitose e indução de necrose celular e apoptose, porém são capazes de estimular a síntese de IL-1 β (Miao et al., 2003; Sawa, 2014).

Na infecção por *C. albicans*, o nível de IL-1 β (Figura 5 A-III) no grupo tratado com extrato de *C. longa* foi semelhante ao grupo controle e também ao grupo exposto ao antimicrobiano. Nos grupos livre da levedura, não houve produção de IL-1 β em nenhum grupo experimental (Figura 5B-III). Embora esta citocina não possua

atividade antifúngica direcionada, ela tem sido citada como um fator importante na defesa do hospedeiro contra infecções por essa levedura (Bellocchio et al., 2004, Vonk et al., 2006). Contudo, o tipo de resposta que os macrófagos podem realizar contra infecções por *C. albicans* dependerá da morfologia e outros fatores como receptores de reconhecimento de patógenos (Levitz, 2010; Lionakis, Netea, 2013). A formação de hifas tem sido um forte gatilho no estímulo da síntese de IL-1 β (Joly, Sutterwala, 2010; Gow et al., 2011).

Em relação à produção de TNF- α , foi observado que seus níveis foram semelhantes em todos os grupos experimentais infectados por *S. aureus* (Figura 6C-I). Porém, no grupo ausente de infecção e tratado com extrato vegetal, os níveis desta citocina estavam mais elevados em relação ao grupo tratado com antimicrobiano e grupo controle. Esta citocina é capaz de estimular a síntese de múltiplos mediadores pró-inflamatórios em macrófagos no estágio inicial do processo de infecção (Parameswaran, Patia, 2010).

Em grupos infectados por *P. aeruginosa*, foi observada maior produção de TNF- α no grupo tratado com o extrato, em relação aos grupos tratado com antimicrobiano e controle (Figura 6C-II), contudo os níveis desta citocina foram semelhantes nos grupos livres de infecção (Figura 6D-II). Em adição, foi verificado que a concentração de TNF- α estava maior nos grupos infectados, demonstrando que o extrato vegetal é um considerável produto para auxiliar no controle infecções por *P. aeruginosa*. Em adição, foi relatado que defeitos na produção desta citocina tornam a infecção por *P. aeruginosa* mais susceptível (Feldman et al., 1998).

Na presença de *C. albicans*, a produção de TNF- α por macrófagos tratados com extrato de *C. longa* L. foi inferior, em relação ao grupo controle, no entanto, foi semelhante ao grupo tratado com o antimicrobiano (Figura 6 C-III). Nos grupos livre da levedura, houve produção superior de TNF- α no grupo tratado com o extrato vegetal, em comparação com os grupos tratado com antimicrobiano e controle (Figura 6D-III). Entretanto, foi observada maior produção de TNF- α na presença de *C. albicans*. Foi citado que os constituintes mano-protéicos da parede celular desta levedura são capazes de induzir a produção de TNF- α (Vecchiarelli et al., 1991; Netea et al., 1999). Por outro lado, foi relatado que alguns agentes farmacológicos podem neutralizar o estímulo da produção desta citocina nesta infecção fúngica (Steinshamn, Waage, 1992; Netea et al., 1995). Desta forma, a utilização de

produtos que não interfiram na síntese de TNF- α , em casos de infecções, é fundamental para controlar o agente que estimulou sua produção. No presente estudo, foi observado que o extrato não proporcionou esta interferência, mantendo semelhança aos níveis basais deste citocina.

Em relação a produção de IL-10, foi possível verificar que seus níveis em grupos infectados por *S. aureus* e tratado com extrato de *C. longa* L. foi superior ao grupo controle (Figura 7E-I), sendo semelhante ao grupo não infectado (Figura 7F-I). Esta citocina é responsável pelo desfecho e imunomodulação do processo inflamatório (Leng, Denkers, 2009). Vários agentes patogênicos apresentam mecanismos capazes de regular seletivamente a síntese de IL-10 durante o curso de uma infecção; atenuar a produção de citocinas pró-inflamatórias; e intensificar a produção desta citocina, na tentativa de criar um ambiente mais favorável a sua sobrevivência (Othieno et al., 1999). No presente estudo, o extrato poderia ter atuado como agente anti-inflamatória, devido os resultados exibidos.

Na infecção por *P. aeruginosa*, foi verificado que o nível de IL-10 foi superior no grupo tratado com extrato de *C. longa* L., em comparação ao grupo controle e o grupo tratado com antimicrobiano (Figura 7E-II). No entanto, nos grupos com ausência de infecção, a síntese de IL-10 manteve-se semelhante entre os grupos experimentais avaliados (Figura 7F-II). Adicionalmente, foi constatado que os níveis de IL-10 tanto nos grupos infectados como livres de infecção foram semelhantes, além de ser comprovado que o extrato vegetal contribuiu efetivamente para imunomodulação do processo inflamatório gerado na infecção por *P. aeruginosa*. No decorrer de uma infecção, IL-10 pode atuar na inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias. Em macrófagos ativados, esta citocina pode suprimir a produção de IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α na tentativa de conter o processo inflamatório após controle do agente que estimulou a síntese destes mediadores químicos (de Waal Malefyt et al., 1991; Bogdan et al., 1992; Wang et al., 1994; Fiorentino et al., 2016), além de inibir a produção de NO (James, 1995).

Na infecção por *C. albicans*, o nível de IL-10 no grupo tratado com extrato de *C. longa* L., foi superior ao grupo controle (Figura 7E-III). Nos grupos livre de infecção também foi observada produção superior desta citocina, em relação ao grupo controle, tanto no grupo tratado com extrato vegetal como no grupo tratado com antimicrobiano (Figura 7F-III). Sabe-se que essa levedura é capaz de expressar

vários fatores de virulência que contribuem para sua patogenicidade no hospedeiro (Calderone, 2002), além de propiciar estímulo à produção de IL-10, no intuito de promover sua sobrevivência no tecido invadido, devido diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias que contribuem para a eliminação deste patógenos em uma resposta imune (Groux et al., 1999).

Quanto à geração de NO, macrófagos infectados por *S. aureus* (Figura 8A-I), *P. aeruginosa* (Figura 8A-II) e *C. albicans* (Figura 8A-III) apresentaram produção de NO no grupo tratado com extrato de *C. longa* L. superior ao grupo controle, ocorrendo de forma semelhante nos grupos não infectados (Figuras 8B-I, B-II e B-III). Desta forma, pode ser notado que o extrato vegetal contribuiu efetivamente para a produção de NO, em ambas as situações. Óxido nítrico, participa ativamente na resposta inflamatória, no intuito de controlar uma infecção, além de ser responsável pela regulação da expressão de proteínas inflamatórias, como, ciclo-oxigenase-2, (COX-2), TNF- α e óxido nítrico sintetase induzida (*iNOS*) (Sheffler et al., 1995; Perkins, Kniss, 1999).

6 CONCLUSÃO

Foi constatado que o extrato de *C. longa* L. auxiliou efetivamente os macrófagos murinos (RAW 264.7) no controle de infecções *in vitro* por *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, como analisado nos processos de fagocitose e imunorregulação. Além disso:

- a) A CIM do extrato vegetal foi capaz de contribuir para a fagocitose dos micro-organismos pelos macrófagos durante as infecções;
- b) A viabilidade dos macrófagos não foi alterada, tanto na ausência como na presença de micro-organismos, como comprovado pela constante atividade lisossomal apresentada pelas células durante a fagocitose;
- c) O extrato de *C. longa* L. também atuou efetivamente como imunorregulador da síntese de citocinas pró- (IL-1 β e TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10);
- d) Da mesma forma, o extrato vegetal colaborou para a imunorregulação da produção de NO.

REFERÊNCIAS*

- Amiel E, Lovewell RR, O'Toole GA, Hogan DA, Berwin B. *Pseudomonas aeruginosa* evasion of phagocytosis is mediated by loss of swimming motility and is independent of flagellum expression. *Infect Immun*. 2010 Mai;78(7):2937-45. doi:10.1128/IAI.00144-10.
- Anantharajah A, Buyck JM, Faure E, Glupczynski Y, Rodriguez-Villalobos H, De Vos D, et al. Correlation between cytotoxicity induced by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from acute infections and IL-1 β secretion in a model of human THP-1 monocytes. *Pathog Dis*. 2015 Jul;73(7). doi: 10.1093/femspd/ftv049.
- Araújo CC, Leon LL. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 Jul;96(5):723-8.
- Bagg J, Sweeney MP, Harvey-Wood K, Wiggins A. Possible role of *Staphylococcus aureus* in severe oral mucositis among elderly dehydrated patients *Microb Ecol Health Dis*. 2009 Jul;8(2):51-6. doi: 10.3109/08910609509141382.
- Barbeau J, Gauthier C, Payment P. Biofilms, infectious agents, and dental unit waterlines: a review. *Can J Microbiol*. 1996 Jan;44(11):1019-28.
- Barbeau J, Tanguay R, Faucher E, Avezard C, Trudel L, Côté L, et al. Multiparametric analysis of waterline contamination in dental units. *Appl Environ Microbiol*. 1998 Jan;62(11):3954-9.
- Bayles KW, Wesson CA, Liou LE, Fox LK, Bohach GA, Trumble WR. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun*. 1998;66:336-42.
- Beattie BK, Merrill AR. *In vitro* enzyme activation and folded stability of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin a and its C-terminal peptide. *Biochemistry*. 1996;35:9042-51. doi: 10.1021/bi960396k.
- Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Rossi G, Mambula SS, et al. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens *in vivo*. *J Immunol*. 2004;172:3059-69.
- Ben Haj Khalifa A, Moissenet D, Vu Thien H, Khedher M. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2011 Fev;69(4):393-403. doi: 10.1684/abc.2011.0589.
- Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y, Nathan C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J Biol Chem*. 1992 Nov;267(32):23301-8.
- Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001 Nov;9(7):327-35.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Calderone RA. *Candida* and Candidiasis. ASM Press. ed Calderone: ASM Press. 2002 Aug;8(8):876. doi: 10.3201/eid0808.020059

Cassat JE, Lee CY, Smeltzer MS. Investigation of biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol*. 2007 Jul;391:127-44.

Castro-Lopez N, Hung CY. Immune response to coccidioidomycosis and the development of a vaccine. *Microorganisms*. 2017 Mar;16;5(1). pii: E13. doi: 10.3390/microorganisms5010013.

Cecílio-Filho AB, Souza RJ, Braz LT, Tavares M. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. *Cienc Rural*. 2000 Abr;30(1):171-5. doi: 10.1590/S0103-84782000000100028.

Chandrasekaran C, Sundarajan K, Edwin JR, Gururaja GM, Mundkinajeddu D, Agarwal A. Immune-stimulatory and anti-inflammatory activities of *Curcuma longa* extract and its polysaccharide fraction. *Pharmacognosy Res*. 2013 Abr;5(2):71-9. doi: 10.4103/0974-8490.110527.

Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb; 125(2):S3–23. doi:10.1016/j.jaci.2009.12.980.

Cigana C, Lorè NI, Riva C, De Fino I, Spagnuolo L, Sipione B, et al. Tracking the immunopathological response to *Pseudomonas aeruginosa* during respiratory infections. *Sci Rep*. 2016;6:21465. doi:10.3390/pathogens4040826.

da Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Luiz RR, Colombo AP. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. *Arch Oral Biol*. 2011 Mar;56(9):899-906. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.02.009.

de Oliveira JR, de Aguiar ARB, das Graças FVP, de Oliveira FE, da Rocha RF, Jorge AO, et al. Control of microorganisms of oral health interest with *Arctium lappa* L. (burdock) extract non-cytotoxic to cell culture of macrophages (RAW 264.7). *Arch Oral Biol*. 2014;59(8):808-14. doi: 10.1016/j.archoralbio.

de Oliveira JR, de Castro VC, das Graças FVP, Camargo SE, Carvalho CA, Jorge AO, et al. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *BMC Complement Altern Med*. 2013a Aug;13:208. doi: 10.1186/1472-6882-13-208.

de Oliveira JR, Figueira LW, Sper FL, Meccatti VM, Camargo SEA, Oliveira LD. *Thymus vulgaris* L. and thymol assist murine macrophages (RAW 264.7) in the control of *in vitro* infections by *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*. *Immunol Res*. 2017 Aug; 65(4):932-43. doi: 10.1007/s12026-017-8933-z.

de Oliveira JR, Vilela PGF, de Oliveira FE, Belato KK, Carvalho CAT, Jorge AOC, et al. Antifungal effect of plant extracts on *Candida albicans* biofilm on acrylic resin. *Braz Dent Sci*. 2013b Jul/Set;16(2):77-83. doi: 10.14295/bds.2013.v16i3.909.

de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991 Nov;174(5):1209-20.

Eigner D, Scholz D. *Ferula asa-foetida* and *Curcuma longa* in traditional medical treatment and diet in Nepal. *J Ethnopharmacol*. 1999 Oct;67(1):1-6.

Erwig LP, Gow NAR. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev Microbiol*. 2016 mar;14:163-76. doi: 10.1038/nrmicro.2015.2.

Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, Tang H, et al. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun*. 1998 Jan;66:43-51.

Filho CRMS, Souza AG, Conceição MM, Silva TG, Silva TMS, Ribeiro APL. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. *Rev Bras Farmacogn*. 2009 Out-Dez;19(4):919-23. doi: 10.1590/S0102-695X2009000600022.

Filler SG, Kullberg BJ. Deep-seated candidal infections. In: Calderone RA. editor. *Candida and Candidiasis*. ASM Press. 2002. p. 341-8.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. Pillars Article: IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*. 2016 Dec;197(5):1539-46.

Flannagan RS, Heit B, Heinrichs DE. Antimicrobial mechanisms of macrophages and the immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*. 2015 Dec;4:826-68; doi:10.3390/pathogens4040826.

Ganjali S, Blesso CN, Banach M, Pirro M, Majeed M, Sahebkar A. Effects of curcumin on HDL functionality. *Pharmacol Res*. 2017 May;119:208-18. doi: 10.1016/j.phrs.2017.02.008.

Goldberg M. Infections of the salivary glands. In: R.G. Topazian RG, Goldberg M, editors. *Oral and Maxillofacial Infections*. Philadelphia, PA: WB Saunders Co;1981:293-311.

Gow NAR, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2011;10(2):112-22. doi: 10.1038/nrmicro2711.

Groux H, Cottrez F, Rouleau M, Mauze S, Antonenko S, Hurst S, et al. A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells. *J Immunol*. 1999 Feb;162(3):1723-9.

Hashim FJ, Shawkat MS, Al-Rikabi AAN. The role of *Curcuma longa* rhizomes ethanolic extract on human lymphocytes treated by bickel by using g banding

technique and karyotyping – malaysian. Mal J Fund Appl Sci. 2013 Mar;9(2):105-9. doi: <http://dx.doi.org/10.11113/mjfas.v9n2.92>

Holzheimer RG, Mannick JA. Surgical treatment: evidence-based and problem-oriented. Munich: Zuckschwerdt. 2001.

James SL. Microbiological Reviews. ASM.1995;59(4):533-47.

Joly S, Sutterwala FS. Fungal pathogen recognition by the NLRP3 inflammasome. Virulence. 2010 Jan;1(4):276-80. doi: 10.4161/viru.1.4.11482.

Klein E, Smith DL, Laxminarayan R. Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005. Emerg Infect Dis. 2007 Dez;13(12):1840-6. doi:10.3201/eid1312.070629.

Kong C, Yehye WA, Abd Rahman N, Tan MW, Nathan S. Discovery of potential anti-infectives against *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* infection model. BMC Complement Altern Med. 2014 Jan;14:4. doi: 10.1186/1472-6882-14-4.

Koziel J, Maciag-Gudowska A, Mikołajczyk T, Bzowska M, Sturdevant DE, Whitney AR, et al. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by macrophages exerts cytoprotective effects manifested by the upregulation of antiapoptotic factors. PLoS One. 2009 Abr;4(4):e5210. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005210>.

Kronström M, Svenson B, Hellman M, Persson GR. Early implant failures in patients treated with Brånemark System titanium dental implants: a retrospective study. Int J Oral Maxillofac Implants. 2001;16(2):201-7.

Krysan DJ, Sutterwala FS, Wellington M. Catching fire: *Candida albicans*, macrophages, and pyroptosis. PLoS Pathog. 2014 Jun;10(6):e1004139. doi: 10.1371/journal.ppat.1004139.

LaRock CN, Todd J, LaRock DL, Olson J, O'Donoghue AJ, Robertson AA, et al. IL-1 β is an innate immune sensor of microbial proteolysis. Sci Immunol. 2016 Aug;1(2). pii: eaah3539. doi: 10.1126/sciimmunol.aah3539.

Lawrence T, Gilroy DW. Chronic inflammation: a failure of resolution? Int J Exp Pathol. 2007 Apr;88(2):85-94. doi: 10.1111/j.1365-2613.2006.00507.x.

Leng J, Denkers EY. *Toxoplasma gondii* inhibits covalent modification of histone H3 at the IL-10 promoter in infected macrophages. PLoS ONE. 2009 Oct;4(10):e7589. doi: 10.1371/journal.pone.0007589.

Levitz SM. Innate recognition of fungal cell walls. PLoS Pathog. 2010 Apr;6(4):e1000758. doi: 10.1371/journal.ppat.1000758.

Lionakis MS, Netea MG. *Candida* and host determinants of susceptibility to invasive candidiasis. PLoS Pathog. 2013 Jan;9(1):e1003079. doi: 10.1371/journal.ppat.1003079.

Lopez NC, Hung CY. Immune response to coccidioidomycosis and the development of a vaccine microorganisms. *Microorganisms*. 2017 Mar; 5(1):13. pii: E13. doi:10.3390/microorganisms5010013.

MacFarlane TW, Helnarska SJ. The microbiology of angular cheilitis. *Br Dent J*. 1976 Jun;140(12):403-6.

Martin MV. The significance of the bacterial contamination of dental unit water systems. *Br Dent J*. 1987 Set;163(5):152-4.

Menzies BE, Kourteva I. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immun*. 1998 Dez;66:5994–8.

Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, Bonneau R, Lorang CG, Warren SE, et al. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Fev;107(7):3076-80. doi: 10.1073/pnas.0913087107.

Moretro T, Hermansen L, Holck AL, Sidhu MS, Rudi K, Langsrud S. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Set;69(9):5648-55. doi: 10.1128/AEM.69.9.5648-5655.2003.

Morrison AJ Jr, Wenzel RP. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis*. 1984 Sep-Oct;6(3):S627-42.

Mostafa AA, Al-Askar AA, Almaary KS, Dawoud TM, Sholkamy EN, Bakri MM. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi J Biol Sci*. 2017 Feb;1-6. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.02.004>.

Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014 Jul;41(1):14-20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.

Netea MG, Blok WL, Kullberg BJ, Bemelmans M, Vogels TEM, Buurman WA, et al. Pharmacologic inhibitors of tumor necrosis factor production exert differential effects in lethal endotoxemia and in infection with live microorganisms in mice. *J Infect Dis*. 1995 Feb;171(2):393-9.

Netea MG, van Tits LJ, Curfs JH, Amiot F, Meis JF, van der Meer JW, et al. Increased susceptibility of TNF-alpha lymphotoxin-alpha double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*. *J Immunol*. 1999 Aug;163(3):1498-505.

Nicholls S, MacCallum DM, Kaffarnik FA, Selway L, Peck SC, Brown AJ. Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol*. 2011 Mar;48:297–305. doi: 10.1016/j.fgb.2010.08.010.

Nuzzo I, Sanges MR, Folgore A, Carratelli CR. Apoptosis of human keratinocytes after bacterial invasion. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000 Mar;27(3):235–40.

Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008 Feb;132:631-44. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.025.

Othieno C, Hirsch CS, Hamilton BD, Wilkinson K, Ellner JJ, Toossi Z. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis*-induced transforming growth factor beta1 and interleukin-10. *Infect Immun*. 1999 Nov; 67(11):5730-5.

Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2010;20(2):87-103.

Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 2006 Jun;118(12):3030-44. doi: 10.1002/ijc.21731.

Perkins DJ, Kniss DA. Blockade of nitric oxide formation down regulates cyclooxygenase 2 and decreases PGE2 biosynthesis in macrophages. *J Leukoc Biol*. 1999 Jun;65(6):792-9.

Pollack M, Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Pseudomonas aeruginosa* principles and practice of infectious diseases. In: Mandell GL, Dolan R, Bennett JE, editors. Principles and practices of infectious diseases. 5. ed. New York: Churchill Livingstone; 2000. p. 2310-35.

Ponnusamy D, Clinkenbeard KD. Role of tellurite resistance operon in filamentous growth of *Yersinia pestis* in macrophages. *PLoS One*. 2015 Nov;10(11):e0141984.

Rokadiya S, Malden NJ. An implant periapical lesion leading to acute osteomyelitis with isolation of *Staphylococcus aureus*. *Br Dent J*. 2008 Nov; 205:489-91. doi:10.1038/sj.bdj.2008.935.

Ruhnke M. Skin and mucous membrane infections. In: Calderone R, Clancy C, editors. *Candida and Candidiasis*. 2. ed. Washington, DC: Calderone RA; 2002. p. 307–25. doi: 10.1128/9781555817176.ch26

Sawa T. The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas aeruginosa*: from bacterial pathogenesis to host response. *J Intensive Care*. 2014 Feb;2(1):10. doi: 10.1186/2052-0492-2-10.

Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A. Signals for the lysosome: a control center for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 May;14(5):283-96. doi: 10.1038/nrm3565.

Sheffler LA, Wink DA, Melillo G, Cox GW. Exogenous nitric oxide regulates IFN-gamma plus lipopolysaccharide induced nitric oxidesynthase expression in mouse macrophages. *J Immunol*.1995 Jul;155(2):886-94.

Singh N, Gupta S, Rathore V. Comparative antimicrobial study of ethanolic extract of leaf and rhizome of *Curcuma longa* Linn. *Pharmacogn J*. 2017 Mar-Apr;9(2):208212. doi:10.5530/pj.2017.2.35

Speert DP, Wright SD, Silverstein SC, Math B. Functional characterization of macrophage receptors for *in vitro* phagocytosis of unopsonized *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Invest*. 1988 Sep;82:872–9. doi:10.1172/JCI113692.

Steinshamn S, Waage A. Tumor necrosis factor and interleukin 6 in *Candida albicans* Infection in normal and granulocytopenic mice. *Infect Immun*. 1992 Oct;60(10):4003-8.

Tawara Y, Honma K, Naito Y. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* on denture surfaces. *Bull Tokyo Dent Coll*. 1996 Ago; 37:119-28.

Toden S, Theiss AL, Wang X, Goel A. Essential turmeric oils enhance antiinflammatory efficacy of curcumin in dextran sulfatesodium-induced colitis. *Science Report*. 2017 Mar;814(7);1-12. doi:10.1038/s41598-017-008126.

Tranchemontagne ZR, Camire RB, O'Donnell VJ, Baugh J, Burkholder KM. *Staphylococcus aureus* strain USA300 perturbs acquisition of lysosomal enzymes and requires phagosomal acidification for survival inside macrophages. *Infect Immun*. 2015 Oct;84(1):241-53. doi: 10.1128/IAI.00704-15.

Vecchiarelli A, Puliti M, Torosantucci A, Cassone A, Bistoni F. *In vitro* production of tumor necrosis factor by murine splenic macrophages stimulated with mannoprotein constituents of *Candida albicans* cell wall. *Cell Immunol*. 1991 Apr;134(1):65-76.

Vonk AG, Netea MG, van Krieken JH, Iwakura Y, van der Meer JW, Kullberg BJ. Endogenous interleukin (IL)-1 alpha and IL-1 beta are crucial for host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis*. 2006 May;193:1419-26. doi: 10.1086/503363.

Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol*. 1994 Jul;153(2):811-6.

Wilkinson BJ, Sisson SP, Kim Y, Peterson PK. Localization of the third component of complement on the cell wall of encapsulated *Staphylococcus aureus* M: implications for the mechanism of resistance to phagocytosis. *Infect Immun*. 1979 Dec;26(3):1159-63.

Woods J, Lu Q, Ceddia MA, Lowder T. Exercise-induced modulation of macrophage function. *Immunology and Cell Biology*. 2000 Jun;78:545-53. doi: 10.1111/j.1440-1711.2000.t01-9-.x

Yates SP, Merrill AR. A catalytic loop within *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A modulates its transferase activity. *J Biol Chem*. 2001 Sep;276 (37):35029–36. doi: 10.1074/jbc.M105002200.

Yuan G, Wahlqvist ML, He G, Yang M, Li D. Natural products and anti-inflammatory activity. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2006 Mar;15(2):143-52.