

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPG-Biotec
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA – DMP**

Rosalia do Carmo Bisinotto

**Efeito anti-inflamatório do extrato etanólico da *Harpagophytum
procumbens* durante a inflamação intestinal de camundongos
infectados com *Salmonella* Enteritidis (ATCC13076)**

São Carlos

2013

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPG-Biotec
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA – DMP**

**Efeito anti-inflamatório do extrato etanólico da *Harpagophytum
procumbens* durante a inflamação intestinal de camundongos
infectados com *Salmonella* Enteritidis (ATCC13076)**

Rosalia do Carmo Bisinotto

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de São
Carlos, para a obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia.**

Orientadores: Prof.^a Dra. Fernanda de Freitas Anibal

Prof.^a Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

**São Carlos
2013**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B622ea Bisinotto, Rosalia do Carmo.
Efeito anti-inflamatório do extrato etanólico da
Harpagophytum procumbens durante a inflamação intestinal
de camundongos infectados com *Salmonella* Enteritidis
(ATCC13076) / Rosalia do Carmo Bisinotto. -- São Carlos :
UFSCar, 2014.
79 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2013.

1. Biotecnologia. 2. *Harpagophytum procumbens*. 3.
Salmonelose. 4. *Salmonella Enteritides*. 5. Atividade anti-
inflamatória. 6. Interleucina. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

ROSÁLIA DO CARMO BISINOTTO

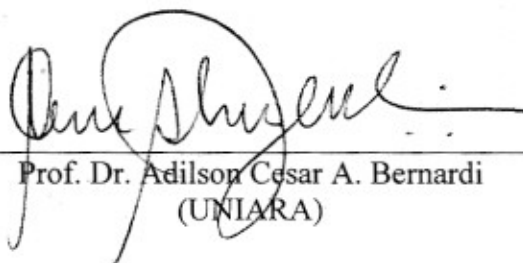
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 29/05/2013

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Clóvis Wesley de Oliveira Souza
(Universidade Federal de São Carlos)



Prof. Dr. Adilson Cesar A. Bernardi
(UNIARA)



Profª. Drª. Cristina Paiva de Sousa
(Universidade Federal de São Carlos)

PIPOCA.....

“...comidas, para mim, são entidades oníricas. Provocam a minha capacidade de sonhar. Nunca imaginei, entretanto, que chegaria um dia em que a pipoca iria me fazer sonhar. Pois foi precisamente isso que aconteceu.

A pipoca é um milho mirrado, sub-desenvolvido. Fosse eu agricultor ignorante, e se no meio dos meus milhos graúdos aparecessem aquelas espigas nanicas, eu ficaria bravo e trataria de me livrar delas. Pois o fato é que, sob o ponto de vista de tamanho, os milhos da pipoca não podem competir com os milhos normais. Não sei como isso aconteceu, mas o fato é que houve alguém que teve a idéia de debulhar as espigas e colocá-las numa panela sobre o fogo, esperando que assim os grãos amolecassem e pudessem ser comidos. Havendo fracassado a experiência com água, tentou a gordura. O que aconteceu, ninguém jamais poderia ter imaginado. Repentinamente os grãos começaram a estourar, saltavam da panela com uma enorme barulheira. Mas o extraordinário era o que acontecia com eles: os grãos duros quebra-dentes se transformavam em flores brancas e macias que até as crianças podiam comer. O estouro das pipocas se transformou, então, de uma simples operação culinária, em uma festa, brincadeira, molecagem, para os risos de todos, especialmente as crianças. É muito divertido ver o estouro das pipocas!

Mas a transformação só acontece pelo poder do fogo. Milho de pipoca que não passa pelo fogo continua a ser milho de pipoca, para sempre. Assim acontece com a gente. As grandes transformações acontecem quando passamos pelo fogo. Quem não passa pelo fogo fica do mesmo jeito, a vida inteira. São pessoas de uma mesmice e dureza assombrosa. Só que elas não percebem. Acham que o seu jeito de ser é o melhor jeito de ser. Mas, de repente, vem o fogo. O fogo é quando a vida nos lança numa situação que nunca imaginamos. Dor. Pode ser fogo de fora: perder um amor, perder um filho, ficar doente, perder um emprego, ficar pobre. Pode ser fogo de dentro. Pânico, medo, ansiedade, depressão - sofrimentos cujas causas ignoramos. Há sempre o recurso aos remédios. Apagar o fogo. Sem fogo o sofrimento diminui. E com isso a possibilidade da grande transformação.

Em Minas, todo mundo sabe o que é piruá. Falando sobre os piruás com os paulistas descobri que eles ignoram o que seja. Alguns, inclusive, acharam que era gozação minha, que piruá é palavra inexistente. Cheguei a ser forçado a me valer do Aurélio para confirmar. Com certeza tem uma explicação científica para os piruás. Mas, no mundo da poesia as explicações científicas não valem. Por exemplo: em Minas ‘piruá’ é o nome que se dá às mulheres que não conseguiram casar. Mas acho que o poder metafórico dos piruás é muito maior. Piruás são aquelas pessoas que, por mais que o fogo es quente, se recusam a mudar. Elas acham que não pode existir coisa mais maravilhosa do que o jeito delas serem. Ignoram o dito de Jesus: ‘Quem preservar a sua vida perde-la-á.’ A sua presunção e o seu medo são a dura casca do milho que não estoura. O destino delas é triste. Vão ficar duras a vida inteira. Não vão se transformar na flor branca macia. Não vão dar alegria para ninguém. Terminado o estouro alegre da pipoca, no fundo da panela ficam os piruás que não servem para nada. Seu destino é o lixo. Quanto às pipocas que estouraram, são adultos que voltaram a ser crianças e que sabem que a vida é uma grande brincadeira”. (Rubem Alves, O amor que acende a lua).

“O dia mais belo: hoje

A coisa mais fácil: errar

O maior obstáculo: o medo

O maior erro: o abandono

A raiz de todos os males: o egoísmo

A distração mais bela: o trabalho

A pior derrota: o desânimo

Os melhores professores: as crianças

A primeira necessidade: comunicar-se

O que traz felicidade: ser útil aos demais

O pior defeito: o mau humor

A pessoa mais perigosa: a mentirosa

O pior sentimento: o rancor

O presente mais belo: o perdão

o mais imprescindível: o lar

A rota mais rápida: o caminho certo

A sensação mais agradável: a paz interior

A maior proteção efetiva: o sorriso

O maior remédio: o otimismo

A maior satisfação: o dever cumprido

A força mais potente do mundo: a fé

As pessoas mais necessárias: os pais

A mais bela de todas as coisas: O AMOR!!!” Madre Tereza de Calcutá

Dedicatória:

A Deus pela minha vida, saúde, família, amigos e por me guiar nessa incrível tarefa chamada pós-graduação.

Ao meu marido Adalberto pelo amor incondicional, paciência, e principalmente por estar sempre ao meu lado, compartilhando dos meus sonhos. Amo você!

Ao meu pai Siadelino (*In memoriam*), e minha mãe Terezinha que não mediram esforços para a minha educação e formação.

Ao meu irmão Marcenal (*In memoriam*), meu segundo pai que tenho a certeza sempre esteve ao meu lado em todos os momentos difíceis de minha vida, e em todas as minhas decisões mesmo contrariando a todos.

Aos meus irmãos Eugênio, Aparecida, Dagmar, Regis e Stela, meus cunhados e cunhadas e sobrinhos pela amizade, carinho e compreensão nos momentos de ausência familiar.

A vocês com muito carinho!

Agradecimentos:

À UFSCar - São Carlos, representada pelo Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade e pela busca incessante de qualidade para o nosso curso e seu corpo docente, pela competência e conduta na transmissão de seus ensinamentos.

Ao Laboratório de Parasitologia - LAP, pela oportunidade da pesquisa científica.

À Capes (Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio durante o curso de mestrado, contribuindo para a conclusão de uma importante etapa da minha vida.

À Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal, pela amizade, carinho, sempre com uma palavra amiga nos momentos mais difíceis. Não posso te chamar de mãe, mas tenho a certeza que posso chamar de irmã e amiga. Obrigada pelo exemplo de luta, liderança e perseverança. Obrigado pela paciência, orientação, oportunidade e pelo crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Clovis Westey que me concedeu a oportunidade de realizar o mestrado, e que acreditou na minha capacidade diante dos momentos de vai e volta. O meu muito obrigado.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia desde a iniciação científica até o Doutorado, colegas agregados do LAP e demais colegas dos outros laboratórios do Departamento. Obrigado pela amizade e pela ótima convivência, por me escutarem e ajudarem nas dificuldades e desafios encontrados nessa etapa. Carrego comigo um pouquinho de cada um de vocês.

À Cynthia, muito obrigada por ajudar nos ensaios de Eliza e agora uma grande amiga.

À secretária do DMP Cidinha, obrigado pela amizade e sempre pronta a atender todas as solicitações.

Aos técnicos do DMP Zélia, Ivete e Carlos, a auxiliar de limpeza Luciana, e aos técnicos da manutenção Vanildo e Elias obrigado pela presteza e amizade.

Aos professores do DMP pela amizade e de alguma forma contribuíram para o meu crescimento.

À Secretária da Biotec Cláudia, obrigada pela amizade e que nunca mediu esforços para ajudar.

Às funcionárias do IPCClab (Araraquara) e IPCC(Araraquara) obrigada por tudo.

Ao Nicolino e Sr. Lelo pela amizade por ter realizado a Análise histopatológica.

Ao Prof. Dr. Wilton Rogério Lustrri, à Profa Dra Juliana Pfrimer Falcão que gentilmente cederam as cepas bacterianas para a realização deste mestrado, pois sem estas o mestrado não seria possível.

Ao Prof. Dr. Paulo César Vieira e o aluno de Doutorado Ricardo de Oliveira Correia, meu muito obrigado por ter fornecido o extrato da *Harpagophytum procumbens*, sem este o mestrado não seria possível.

Às amigas Dani e Rose (professora de inglês): por estarem ao sempre ao meu lado, por escutar, não apenas ouvir, por cada palavra e olhar de carinho, apoio e compreensão.....

RESUMO

A Salmonelose é uma doença causada pela bactéria entérica do gênero *Salmonella*, uma das principais doenças infecciosas em todo o mundo. Devido à importância dessa infecção frente aos hábitos alimentares, a busca de um novo composto que possa contribuir com a terapia atual contra a inflamação intestinal causada pela Salmonelose é de grande valia. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com o extrato etanólico da *Harpagophytum procumbens* (Hp) na salmonelose intestinal murina. Neste estudo foram realizadas contagens das células totais e diferenciais (leucócitos, neutrófilos e células mononucleares), dosagem de citocinas (TNF- α , IL-12, IL-10 e IL-4) e análise histopatológica do fígado e intestino delgado (3º e 7º dia após a infecção) em animais tratados ou não com Hp. Os animais foram divididos em grupos: somente infectado (SE), infectado e tratado com Hp (SE+HP) e controle (C). Camundongos Balb/c (fêmeas) foram infectados (v.o.) com *S. Enteritidis* ATCC 13076 (1×10^8 UFC – 100 μ L/animal). O grupo SE+HP foi tratado com 150 μ g/animal com Hp diariamente. O anatomopatológico do fígado e intestino delgado foi preparado e corado com HE. Nossos achados mostraram que, houve aumento de leucócitos, especificamente células mononucleares nos diferentes compartimentos analisados (sangue e LPC), aumento de neutrófilos no sangue nos animais infectados com SE no 7º dia após infecção. Entretanto, o tratamento com Hp foi capaz de modular negativamente o recrutamento de células mononucleares no 7º dia para a cavidade peritoneal e modulou negativamente o número de neutrófilos no sangue no mesmo período. Os níveis de TNF- α apresentaram diminuição no 7º dia após tratamento com Hp, sugerindo um efeito biológico - *down regulation* - do processo inflamatório nesses animais. Além disso, observamos também que, animais tratados com Hp e infectados com SE tiveram redução no número de neutrófilos e células mononucleares no sangue e diminuição de IL-12. A produção de IL-4 apresentou aumento no grupo SE+HP sugerindo que animais infectados por *S. Enteritidis* e tratados com *H. procumbens* parece favorecer um microambiente que direcione o perfil da resposta imune de Th1 para Th2, visto que a IL-12 apresentou diminuição. A IL-10 tem efeitos regulatórios importantes sobre as respostas imunológicas e inflamatórias, sendo predominantemente mediada por macrófagos. Nossos resultados mostram aumento de IL-10 nos animais infectados com SE, e esse aumento parece estar relacionado com a gravidade da salmonelose. O tratamento com Hp estimulou atividade inibitória de IL-10, favorecendo discreta inibição do processo inflamatório, no 7º dia após a infecção. Nas análises histopatológicas do fígado observamos que, não houve diferença entre os grupos, sugerindo uma infecção local, visto que a hemocultura foi negativa, portando não houve infecção sistêmica. No intestino delgado observou após 72 h no grupo SE discreto enrugamento deste epitélio, o que sugere a invasão da *S. Enteritidis*, sendo observado também hipertrofia da parede das vilosidades e discreto infiltrado inflamatório. Nos animais que receberam tratamento com Hp houve uma redução da hipertrofia das vilosidades com preservação da arquitetura intestinal 7 dias após a infecção. Assim, sugerimos um possível papel da Hp em modular fatores imunológicos envolvidos no recrutamento de células inflamatórias no intestino de animais infectados com SE, favorecendo discreta modulação do processo inflamatório neste modelo.

Palavras-chave: *Harpagophytum procumbens*, Salmonelose, *Salmonella* Enteritides, atividade anti-inflamatória, interleucina.

ABSTRACT

Salmonellosis is an illness caused by bacteria of the genus Salmonella, a leading infectious disease worldwide. Due to the importance of this infection forward to eating habits, the search for a new compound that can contribute to current therapy against intestinal inflammation caused by Salmonellosis is of great value. The goal of this research was evaluate of this treatment effect with extract of Harpagophytum procumbens (Hp) in murine intestinal salmonellosis . In this research were realized counting of total cells and differential cell (leukocytes, neutrophils and mononuclear cells) , dosages of cytokines (TNF- α , IL-12 , IL-10 and IL-4) and histopathological analysis of the liver and small intestine, at third and seventh day after the infection on animals treated with Hp and with animals didn't treated with. The animals were divided in: infected (SE) , infected and treated with Hp (SE + HP) and control group(C). Balb / c mice (female) were infected (v.o) with S. Enteritidis ATCC 13076 (1×10^8 UFC - 100 mL / animal) . The SE + HP group was treated with 150 mg / animal daily with Hp . The pathology of the liver and small intestine was prepared and stained with HE. Our results showed that there was an increase of leukocytes, specifically mononuclear cells analyzed in different compartments (blood and CSF) , increased neutrophils in the blood in animals infected with SE on day 7 after infection. However, treatment with Hp was able to down modulate the recruitment of mononuclear cells on day 7 into the peritoneal cavity and negatively modulates the number of neutrophils in the same period. The levels of TNF- α showed a decrease on day 7 after treatment with Hp, suggesting a biological effect - down regulation - the inflammatory process in these animals . Furthermore, we also observed that animals treated with Hp infected with SE had a reduction in the number of neutrophils and mononuclear cells in the blood and decrease of IL -12. The production of IL-4 showed an increase in the + SE group HP suggesting that animals infected with S. Enteritidis and treated with H. procumbens appears to favor a microenvironment that directs the immune response profile of Th2 to Th1, whereas IL- 12 showed a decrease. IL- 10 has important regulatory effects on immunological and inflammatory responses mediated predominantly by macrophages. Our results show an increase of IL-10 in animals infected with SE, and this increase seems to be related to the severity of salmonellosis. Treatment with Hp stimulated inhibitory activity of IL - 10, favoring slight inhibition of the inflammatory process, on day 7 after infection. In the histopathological analysis of the liver observed that there was no difference between the groups, suggesting a local infection, since the blood culture was negative, carrying no systemic infection. In the small intestine was observed after 72 h in the SE group discrete wrinkle this epithelium, suggesting the invasion of S. Enteritidis, which was also observed hypertrophy of the wall of the villi and mild inflammatory infiltrate. In animals that received treatment with Hp hypertrophy was reduced with preservation of the villi of the intestinal architecture 7 days after infection. Thus, we suggest a possible role of Hp in modulating immune factors involved in the recruitment of inflammatory cells in the intestine of animals infected with SE, favoring discrete modulation of the inflammatory process in this model.

Keywords: *Harpagophytum procumbens, Salmonellosis, Salmonella Enteritides, anti - inflammatory activity, interleukin.*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	IV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1 <i>Salmonella</i> sp - Breve histórico	2
2.1.1 O gênero <i>Salmonella</i>	2
2.1.2 Classificação da <i>Salmonella</i>	4
2.1.3 Salmonelose	6
2.1.4 Patogenia da Salmonelose.....	7
2.1.5 Epidemiologia da salmonelose.....	8
2.1.6 Resposta imune na salmonelose	11
3. <i>Harpagophytum procumbens</i> DC- Hp	21
3.1.1. Atividade anti-inflamatória e analgésica.....	25
3.1.2. Atividade antioxidante	26
3.1.3. Atividade anti-diabética	26
3.1.4. Atividade antimicrobiana	26
4. OBJETIVO GERAL	27
4.1-Objetivos Específicos.....	27
5. MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1-Preparo do extrato etanólico da <i>H. procumbens</i>	28
5.2 Padronização do inóculo	28
5.3 Animais	28
5.4 Delineamento experimental.....	29
5.5 Obtenções das células do lavado da cavidade peritoneal (LCP) e sangue	30
5.6 Contagem total de glóbulos brancos e diferencial das células do LCP e sangue	31
5.7 Hemocultura.....	31
5.8 Ensaio imunoenzimático (ELISA) - Citocinas IL-4, IL-10 IL-12 e TNF- α	32
5.9 Estudos histopatológicos e microfotografias.....	32
5.11 Análise estatística.....	33
6. RESULTADOS.....	34

6.1 Avaliação do perfil celular durante a infecção por <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 após o tratamento com <i>H. procumbens</i>	34
6.1.2 Contagem total de leucócitos no sangue de camundongos infectados ou não por <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com <i>H. procumbens</i> , no 3º e 7º dia de infecção e tratamento	34
6.1.3 Contagem total de leucócitos no LPC de camundongos infectados ou não por <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com <i>H. procumbens</i> , no 3º e 7º dia de infecção e tratamento	36
6.1.4 Contagem de Neutrófilos no sangue de camundongos infectados ou não por <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com <i>H. procumbens</i> , no 3º e 7º dia de infecção e tratamento	38
6.1.5 Contagem de Neutrófilos no LPC de camundongos infectados ou não por <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com <i>H. procumbens</i> , no 3º e 7º dia de infecção e tratamento.....	40
6.1.6 Contagem de células mononucleares no sangue de camundongos infectados ou não por <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com <i>H. procumbens</i> , no 3º e 7º dia de infecção e tratamento.....	42
6.1.7 Contagem de células mononucleares no LPC de camundongos infectados ou não por <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com <i>H. procumbens</i> , no 3º e 7º dia de infecção e tratamento	44
6.2 Hemocultura.....	46
6.3 Quantificação de citocinas no plasma durante a infecção por <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 após o tratamento com <i>H. procumbens</i>	46
6.3.1 Quantificação de TNF- α no plasma de camundongos infectados ou não por <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com <i>H. procumbens</i> , no 3º e 7º dia de infecção e tratamento	46
6.3.2 Quantificação de IL-12 no plasma de camundongos infectados ou não por <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com <i>H. procumbens</i> , no 3º e 7º dia de infecção e tratamento.....	48
6.3.3 Quantificação de IL-4 no plasma de camundongos infectados ou não por <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com <i>H. procumbens</i> , no 3º e 7º dia de infecção e tratamento.....	50
6.3.4 Quantificação de IL-10 no plasma de camundongos infectados ou não por <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com <i>H. procumbens</i> , no 3º e 7º dia de infecção e tratamento.....	52
6.4 Anatomopatológico - Análise histopatológica do fígado e intestino desde camundongos infectados ou não por <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com <i>H. procumbens</i>	54
6.4.1 Análise histopatológica do fígado de camundongos infectados ou não por <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com <i>H. procumbens</i>	54

6.4.2 Análise histopatológica do intestino delgado de camundongos infectados ou não por <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com <i>H. procumbens</i>	56
7. DISCUSSÃO.....	58
8. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas antigênicas da <i>Salmonella enterica</i>	06
Figura 2. Agentes etiológicos identificados por surto no Brasil entre os anos de 2000 e 2011.....	10
Figura 3. Relação de alimentos envolvidos nos surtos alimentares no Brasil entre os anos de 2000 e 2011.....	10
Figura 4. Estratégias que permitem a <i>Salmonella</i> atravessar a barreira intestinal, sobreviver nos tecidos intestinais e espalhar sistemicamente.....	13
Figura 5. <i>Salmonella</i> x células intestinais.....	15
Figura 6. Sinalização do <i>Toll-like receptor 4</i> no macrófago.....	17
Figura 7. Citocinas, sinais e resistência durante a infecção por <i>Salmonella</i>	18
Figura 8A . Frutos da <i>Harpagophytum procumbens</i>	22
Figura 8B. Flores e Folhas da <i>Harpagophytum procumbens</i>	23
Figura 8C. Tubérculos da <i>Harpagophytum procumbens</i>	23
Figura 9. Fluxograma experimental.....	29
Figura 10. Contagem de Leucócitos totais no sangue no 3º (A) e 7º (B) dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	35
Figura 11. Contagem de Leucócitos totais no LPC no 3º (A) e 7º (B) dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076.....	37
Figura 12. Contagem de Neutrófilos no sangue no 3º (A) e 7º (B) dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	39
Figura 13. Contagem de Neutrófilos no LPC no 3º (A) e 7º (B) dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	41
Figura 14. Contagem de Células mononucleares no sangue no 3º (A) e 7º (B) dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	43
Figura 15. Contagem de Células mononucleares no LPC no 3º (A) e 7º (B) dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	45

Figura 16. Quantificação da citocina TNF- α no plasma no 3 ^o (A) e 7 ^o (B) dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	47
Figura 17. Quantificação da citocina IL-12 no plasma no 3 ^o (A) e 7 ^o (B) dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	49
Figura 18. Quantificação da citocina IL-4 no plasma no 3 ^o (A) e 7 ^o (B) dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	51
Figura 19. Quantificação da citocina IL-10 no plasma no 3 ^o (A) e 7 ^o (B) dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	53
Figura 20. Fotomicrografia do parênquima do fígado de camundongo infectado ou não por <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 tratado ou não com o extrato etanólico da <i>H. procumbens</i>	55
Figura 21. Fotomicrografia do epitélio do intestino delgado de camundongo infectado ou não por <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 tratado ou não com o extrato etanólico da <i>H. procumbens</i>	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de sorotipos presentes em cada espécie e subespécie de <i>Salmonella</i>	03
Tabela 2. Classificação para as principais espécies de <i>Salmonella</i> sp pelo esquema Kaffman-White-Le Minor.....	05
Tabela 3. Grupos experimentais.....	30
Tabela 4. Contagem de Leucócitos totais no sangue no 3º e 7º dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	34
Tabela 5. Contagem de Leucócitos totais no LPC no 3º e 7º dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	36
Tabela 6. Contagem de Neutrófilos no sangue no 3º e 7º dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	38
Tabela 7. Contagem de Neutrófilos no LPC no 3º e 7º dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	40
Tabela 8. Contagem de Células mononucleares no sangue no 3º e 7º dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	42
Tabela 9. Contagem de células mononucleares no sangue no 3º e 7º dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	44
Tabela 10. Quantificação da citocina TNF- α no plasma no 3º e 7º dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	46
Tabela 11. Quantificação da IL-12 no plasma no 3º e 7º dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	48
Tabela 12. Quantificação da IL-4 no plasma no 3º e 7º dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	50
Tabela 13. Quantificação da IL-10 no plasma no 3º e 7º dia de tratamento com <i>H. procumbens</i> e após a infecção com <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076.....	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag - antígeno

Ag H - antígeno “H” – Hauch

Ag K- antígeno K – Kunin

Ag O - antígeno “O” – Ohne

APC – “*Antigen-presenting cell*”

ATCC - *American Type Culture Collection*

CD80 ou B7.1 - Cluster de diferenciação 80

CD86 ou B7.2 - Cluster de diferenciação 86

Balb/c - Camundongo albino de linhagem isogênica

BHI- *Brain Heart Infusion*

CD14, 15 ... - Cluster de diferenciação 14, 15

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

COX-2- Ciclooxygenase 2

DCs - Células dendríticas

DMSO - Dimetil-sulfoxido

ELISA - Ensaio imunoenzimático

EPM - Erro Padrão da Média

g - grama

GALT - tecido linfóide associado ao intestino

Grupo C - grupo controle

Grupo SE - grupo infectado e não tratado

Grupo SE+HP - grupo infectado e tratado com *H. procumbens*

h - hora(s)

H. procumbens - *Harpagophytum procumbens*

H. zeyheri - *Harpagophytum zeyheri*

HE - Hematoxilina-Eosina

ICMSF- *International Commission on Microbiological Specification for Foods*

IFN- γ – Interferon gama

IgA – Imunoglobulina A

IgE - – Imunoglobulina E

IL-1, 2, 3, 4, 5,...13 Interleucina (citocina)

iNOS - enzima óxido nítrico sintase induzida

IP - Ilha de Patogenicidade

LCP- Lavado da cavidade peritoneal

LPB - proteína ligadora de LPS plasmática

LPB- proteína plasmática ligadora

LPS - lipopolissacarídeo

MHC II - Complexo de histocompatibilidade classe II

mL - mililitros

mm - milímetros

mm³ - milímetros cúbicos

mRNA - ácido rubonucléico mensageiro

MyD88 - *Myeloid Differentiation Primary-Response Gene 88*

NF- κ B – Fator de transcrição nuclear NF-kappa B

NK – “*Natural Killer cells*”

NO - Óxido nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde

p <- nível de significância estatística

PAMPs - padrões moleculares associados à patógenos

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PG - prostaglandina

PGE2- Prostaglandina E2

PGN - peptidoglicano

PRRs - receptores de reconhecimento padrão

S. typhimurium - *Salmonella typhimurium*

Salmonella Enteritidis ATCC 13076 - *Salmonella enterica* sub.*enterica* sorovar
Enteritidis American Type Culture Collection 13076

sg - sangue

sp – espécie

SPF – “*Specific Pathogen Free*”

SPI - Ilha de Patogenicidade da *Salmonella*

Th - Linfócito T helper

TLR 4, 5... - Toll-like Receptors 4, 5.....

TMB - tetrametilbenzidina

TNF α - fator de necrose tumoral alfa

TTSS - sistema de secreção do tipo III

UFC - unidade formadora de colônia

v.o. - via oral

x - vezes

μg – micrograma

μL - microlitro

μm – micrometro

1. INTRODUÇÃO

A globalização da economia originou a mobilização intensa das populações em viagens internacionais e importação de vários produtos. A importação de alimentos de origem animal propiciou a partir dos anos 80 a disseminação de uma bactéria, relacionada a ovos e aves, a *Salmonella* (Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar – Centro de Vigilância Epidemiológica, 2008). No Brasil há relatos de contaminação por *Salmonella* variando de 9,15% a 86,7%, o que provavelmente ocorreu devido às deficiências de saneamento básico, aliadas ao precário controle de qualidade de algumas indústrias alimentícias e de pequenos abatedouros de aves (KEHL, 2007). Embora muitos estudos sobre a virulência e resistência da *Salmonella*, estejam sendo realizados, notamos a falta de investimento na descoberta de novos antimicrobianos contra essa bactéria (Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar – Centro de Vigilância Epidemiológica, 2008).

Curiosamente, de todos os fármacos disponíveis na terapêutica, em torno de 25 – 30% são produzidos a partir de produtos naturais (plantas, micro-organismos e animais) ou derivados destes. Evidências de companhias farmacêuticas mostram que, para algumas doenças complexas, os produtos naturais representam uma fonte extremamente valiosa para a produção de novas entidades químicas (CALIXTO & SIQUEIRA, 2008). Dentre as plantas estudadas mundialmente, a *Harpagophytum procumbens* vem sendo utilizada por diferentes povos ao redor do mundo. Sendo que, seu uso foi iniciado pelos povos indígenas da África há séculos, por apresentar uma notável atividade anti-inflamatória (WEGENER, 2000). Após estudo foi sugerido que esta planta possui um efeito antibacteriano (WECKESSER, 2007), o que estimula a investigação sobre seus princípios ativos nesta área, favorecendo assim a escolha desta planta para as nossas pesquisas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Salmonella* sp - Breve histórico

A história da *Salmonella* pode ser contada desde 1643, quando Thomas Willis descreveu de uma forma rudimentar o agente patogênico que causava a febre tifóide (LEDERMANN, 2003). Mas somente no século XIX, com a descoberta do *Bacterium typhi* por Eberth e Gaffky foi descrita sua verdadeira etiologia. A *Salmonella* foi descrita pela primeira vez em 1880 por Eberth e cultivados em 1884 por Gaffky (CORRÊA & CORRÊA, 1992; MILLER *et al.*, 1995; DARWIN & MILLER, 1999).

Em 1885, o bacteriologista e veterinário, Dr. Daniel Elmer Salmon, isolou e descreveu um bacilo em suínos, que erroneamente foi denominado de “bacilo da peste suína” (*Bacillus cholerae suis*). Em 1888, Gartner isolou uma bactéria de um indivíduo morto por gastrenterite, que possivelmente tenha ingerido carne crua de uma vaca doente. Mais tarde, essa bactéria foi denominada de *Bacillus enteridis* (MERCHANT & PARKER, 1980).

No século XX, as investigações de Schotmuller e, logo em seguida, de Bryon e Kayser, iniciaram a separação dos agentes causadores das febres tifóides, incorporando e diferenciando outras espécies. Foi durante este século que outras descobertas foram acrescentando mais espécies ao gênero *Salmonella* (LEDERMANN, 2003), e em 1900, Lignières propôs o nome genérico *Salmonella* em homenagem a Dr. Salmon (MERCHANT & PACER, 1980).

2.1.1 O gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e é caracterizado pela morfologia de bastonete, medindo de 0,7 a 1,5 µm por 2 a 5 µm, capazes de fermentar glicose, reduzir nitratos em nitritos e não produz citocromo oxidase (BOPP, 1999; MACFADDIN, 2000; FORBES, 2002). No teste de coloração de Gram reage negativamente. Em geral, apresenta motilidade através de flagelos peritriquios, seu comportamento é anaeróbio facultativo e a temperatura de crescimento fica em torno de 37° C. O processo de replicação ocorre de modo mais satisfatório na faixa de pH entre

4,5 e 9,5, além de apresentar mecanismos de adaptação a condições ambientais adversas (D'AOUST, 2001). As salmonelas são capazes de resistir por até nove meses sob solos úmidos, na água e em insumos. Todavia são sensíveis à luz solar e aos desinfetantes mais utilizados nas indústrias, tais como: fenóis, clorados e iodados. Entretanto, são inativadas quando ficam pelo menos por cinco minutos a 60° C (OLIVEIRA, 1995).

Atualmente a Organização Mundial de Saúde (OMS), através do Centro de Colaboração da Organização Mundial da Saúde (OMS-Salm) tem como classificação moderna, baseada no estudo do DNA, três espécies de *Salmonella*: *Salmonella enterica*, subdividida em 6 subespécies: *S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizone*, *S. houtenae* e *S. indica*; *Salmonella bongori* (POPOFF & LE MINOR, 1997) e *Salmonella subterranea* (SHELOBOLINA *et al.*, 2004) (Tabela 1).

Tabela 1. Número de sorotipos presentes em cada espécie e subespécie de *Salmonella*.

Espécie	Subespécie	Nº de Sorotipos
<i>Salmonella enterica</i>		2.557
	<i>enterica</i>	1.531
	<i>salamae</i>	505
	<i>arizonae</i>	99
	<i>diarizone</i>	336
	<i>houtenae</i>	73
	<i>indica</i>	13
<i>Salmonella bongori</i>		22
<i>Salmonella subterranea</i>		1
Total		2.580

Fonte: GRIMONT & WEILL (2007); MARTINS, (2010).

Com relação à nomenclatura oficial, os nomes devem ser colocados em itálico e a primeira letra deve ser escrita em letra maiúscula. Ex: *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Enteridis ou apenas *Salmonella* Enteritidis (HOLT *et al.*, 1994; POPOFF & LE MINOR, 1997).

2.1.2 Classificação da *Salmonella*

Em meados do século XX, a classificação das bactérias do gênero *Salmonella* era bastante confusa. Foi a partir de 1925, com a utilização de provas sorológicas, as bactérias do gênero *Salmonella* passaram a ser mais estudadas. Neste período, foram descritos aproximadamente 900 sorotipos de *Salmonella*, classificados através da terminologia de White, dando origem ao esquema de Kaffmann-White - reconhecido a partir de 1932 - o qual propõe um esquema de classificação com base na identificação sorológica (sorotipos ou sorovares) dos antígenos (Ag): O (somático/ LPS), designados por números arábicos; H (flagelos) designados por letras minúsculas e por números arábicos; K (capsular) com apenas um tipo imunológico encontrado na *Salmonella* Typhy, *Salmonella* Dubin e *Salmonella* Hirschfeldii (CORRÊA & CORRÊA, 1992; HOLT *et al.*, 1994; FRANCO & LANDGRAF, 1996; POPOFF & LE MINOR, 1997; CAFFER & TERRAGNO, 2001; POPPOF, 2001; CAMPOS, 2002).

As fórmulas antigênicas da *Salmonella* que se descrevem atualmente como pertencentes ao esquema de Kauffmann-White- Le Minor, pois Le Minor descreveu a maioria dos sorovares existentes (MARTINS, 2010) (Tabela 2).

Tabela 2- Classificação para as principais espécies de *Salmonella* sp pelo esquema Kaffmann-White - Le Minor.

Grupo	Sorotipo	Antígeno "O"	Antígeno H	
			Fase 1	Fase 2
A	Paratyphi A	1, 2, 12	A	[1, 5]
	Abortus equi	4, 12	-	e, n, x
	Abortus ovis	4, 12	C	1, 6
B	Typhimurium	1, 4, [5], 12	I	1, 2
	Paratyphi B	1, 4, 5, 12	B	1, 2
C1 E C4	Choleraesuis	6, 7	C	1, 5
	Typhi-suis	6, 7	C	1, 5
C1 E C3	Newport	6, 8, 20	e, h	1, 2
	Typhi	9, 12	D	-
	Enteritidis	1, 9, 12	g, m	-
D1 E D2	Dublin	1, 9, 12, [Vi]	g, p	-
	Gallinarum	1, 9, 12	-	-
	Pullorum	9, 12	-	-

Fonte: GRIMONT & WEILL (2007); MARTINS (2010).

De acordo com Tizard (1985), as principais estruturas antigênicas da superfície bacteriana são: parede celular, cápsula e flagelos. A parede celular de organismos Gram-negativos é uma estrutura polissacarídica-lipídica-proteica; os antígenos da parede celular são tóxicos (endotoxinas) e coletivamente classificados como antígeno O; e os flagelos bacterianos consistem em proteínas totalmente antigênicas conhecidas como antígeno H (Figura 1).

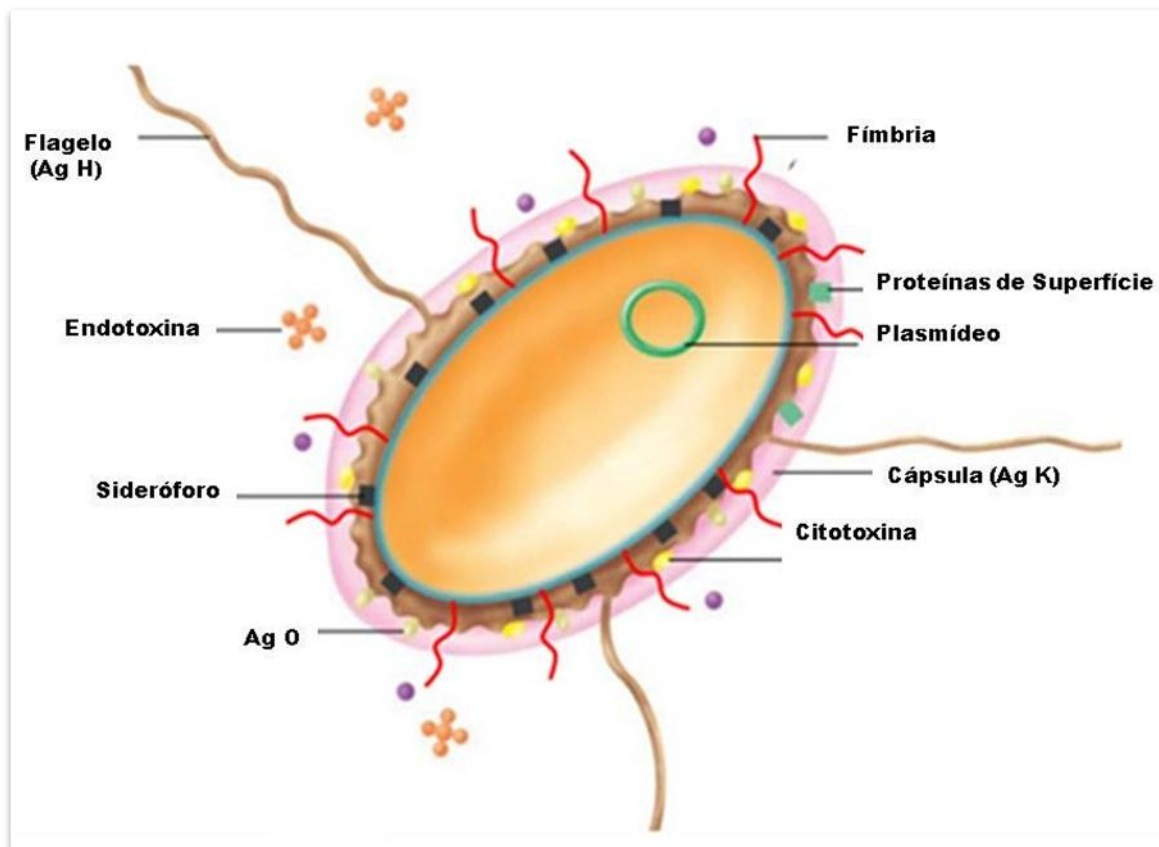


Figura 1- Estruturas antigênicas da *Salmonella enterica*: Flagelo (Ag H): antígenos flagelares; Ag O: antígeno de parede ou antígeno somático; Cápsula (Ag K) antígeno de “Kunin”; Fímbrias: estão associadas à adesão em diferentes células epiteliais; Proteínas de superfície: esta proteína liga-se aos tecidos humanos; Endotoxina: LPS; Sideróforos: são capazes de retirar o ferro das proteínas carreadoras.

Fonte: Imagem adaptada MADINGAN (2004).

2.1.3 Salmonelose

A Salmonelose é uma doença causada pela bactéria entérica *Salmonella*, sendo uma das principais causas de doenças infecciosas em todo o mundo (CASADESÚS, 2011). Infecções por diferentes sorotipos de *Salmonella* podem resultar em manifestações clínicas variadas, além de complicações como febre entérica, gastroenterite, bacteremia, infecção vascular, osteomielite, artrite, cistite, meningite, endocardite, pericardite e pneumonia (GILLIGAN, 1992; THRELFALL *et al.*, 1992; GUERRANT *et al.*, 2001; MILLER, 1995; SCHELD & SANDE, 1995; LINDSAY, 1997; DARWIN & MILLER, 1999; BUTLER, 2000; KAYE, 2000; MAHON & MANUSELIS, 2000; VIDAL *et al.*, 2003).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) divide o gênero *Salmonella* em dois grupos, de acordo com sintomas e doenças que essas promovem. O primeiro grupo inclui a febre tifóide e as febres entéricas causadas por *Salmonella Typhi* e *Salmonella Paratyphi* (A, B e C), respectivamente. O segundo grupo constitui doenças causadas pelas *Salmonella* não tifóides, ou seja, enterocolites ou salmoneloses (ICMSF, 2000; TRABULSI *et al.*, 2008).

Na infecção causada por *Salmonella* não tifóide, a gastroenterite com diarreia é o principal sintoma e a manifestação clínica mais freqüente (DARWIN & MILLER, 1999; KAYE, 2000; MAHON & MANUSELIS, 2000). O período de incubação, geralmente, é de 12 a 36 horas e os sintomas incluem dor abdominal, náusea e diarreia aquosa, raramente com muco ou sangue, e com aumento de leucócitos nas fezes diarreicas. Outros sintomas como anorexia, vômito e dores de cabeça também podem ocorrer, assim como febre baixa de curta duração (menos de 48 horas), freqüentemente acompanhada de gastroenterite. A diarreia geralmente é auto limitada, com redução gradativa dos sintomas em cerca de cinco dias, podendo se agravar em crianças, idosos e indivíduos imunossuprimidos, devido à maior variabilidade de atividade na resposta imunológica nestes (D'AOUST, 1991; MILLER *et al.*, 1995).

2.1.4 Patogenia da Salmonelose

A contaminação com *Salmonella* pode ocorrer geralmente pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados (QUINN, 1994). Após atravessar a barreira epitelial, as bactérias infectam preferencialmente fagócitos no interior da lâmina própria (MONAK *et al.*, 2004), continuam a se multiplicar e são seqüestradas nos linfonodos regionais e, após a invasão, as extremidades das vilosidades contraem e são invadidas por neutrófilos (FRANCO & LANDGRAF, 1996). Se a espécie da *Salmonella* provocar apenas gastroenterite, a infecção pode ser auto-limitada e não prosseguir para além da lâmina própria. No entanto, na febre tifóide, a *Salmonella* infecta fagócitos e tem acesso ao sistema linfático e a corrente sanguínea, o que permite que se disseminem para o fígado e baço (VASQUEZ-TORRES *et al.*, 1999), além de poder persistir na vesícula biliar e medula óssea (SINNOTT & TEALL, 1987; WAIN *et al.*, 2001).

2.1.5 Epidemiologia da salmonelose

A história da *Salmonella* já demonstra sua importância há séculos, sendo relatada como causadora de doença há muitos anos (LAX *et al.*, 1995). A entrada de *Salmonella* Enteritidis no Brasil provavelmente ocorreu no final da década de 80, através da importação de matrizes de animais contaminadas dos Estados Unidos e União Européia (BARROW, 1993; IRINO, 1996; HUMPHREY, 2004). Até o início de 1990, a *Salmonella* Enteritidis era uma bactéria, raramente encontrada em amostras humanas. Em 1993 respondeu por cerca de 10% dos sorotipos de *Salmonella* isolados de amostras humanas e a partir de então passou a predominar tanto em fontes humanas como não-humanas (TAUNAY *et al.*, 1996). Em 1994 e 1995 a *Salmonella* Enteritidis correspondeu respectivamente, a 43% e 65% dos sorotipos de *Salmonella* isolados de humanos em São Paulo (TAUNAY *et al.*, 1996).

A ocorrência de surtos de salmonelose relacionadas a restaurantes foram frequentemente relacionadas ao uso de ovos contaminados na preparação dos alimentos nesses estabelecimentos (GIRAUDON *et al.*, 2008; PERESI *et al.*, 1998). Foram descritos surtos de salmonelose ocorridos entre julho de 1993 e 1997 na região noroeste do estado de São Paulo. No período anteriormente citado ocorreram 906 casos com 295 hospitalizações. O principal alimento associado à ocorrência dos surtos foram ovos, representando 41,7% dos alimentos envolvidos. Um estudo realizado pelo Centro de Vigilância Epidemiológica - SES/SP com base em notificações de surtos e levantamento de diagnóstico laboratorial no período de 1999 a 2007, mostrou que grande parte dos surtos de diarreia causados por bactéria no Estado de São Paulo é devido a *Salmonella* sp, sendo que a *Salmonella* Enteritidis representa 43,2% desses surtos. Em estudos laboratoriais, a partir de testes moleculares, observou-se que mais de 70% das *Salmonella* sp são *Salmonella* Enteritidis, mostrando que essa bactéria é a principal responsável pelos surtos bacterianos detectados nas doenças intestinais (Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar - Centro de Vigilância Epidemiológica, 2008). WELKER *et al* (2010) analisaram 186 surtos de doenças veiculadas por alimentos, novamente a *Salmonella* sp foi o principal micro-organismo identificado (37%), ao avaliar os alimentos relacionados, verificaram que os produtos cárneos foram os principais envolvidos nos surtos investigados.

O órgão responsável pela vigilância epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) é a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). O último relatório da Secretaria de Vigilância Sanitária (2000-2011) apontou a *Salmonella* como o principal micro-organismo associado a surtos alimentares (Figura 2), ovos e produtos a base de ovos e alimentos mistos em alimentos envolvidos nos surtos alimentares (Figura 3) (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011).

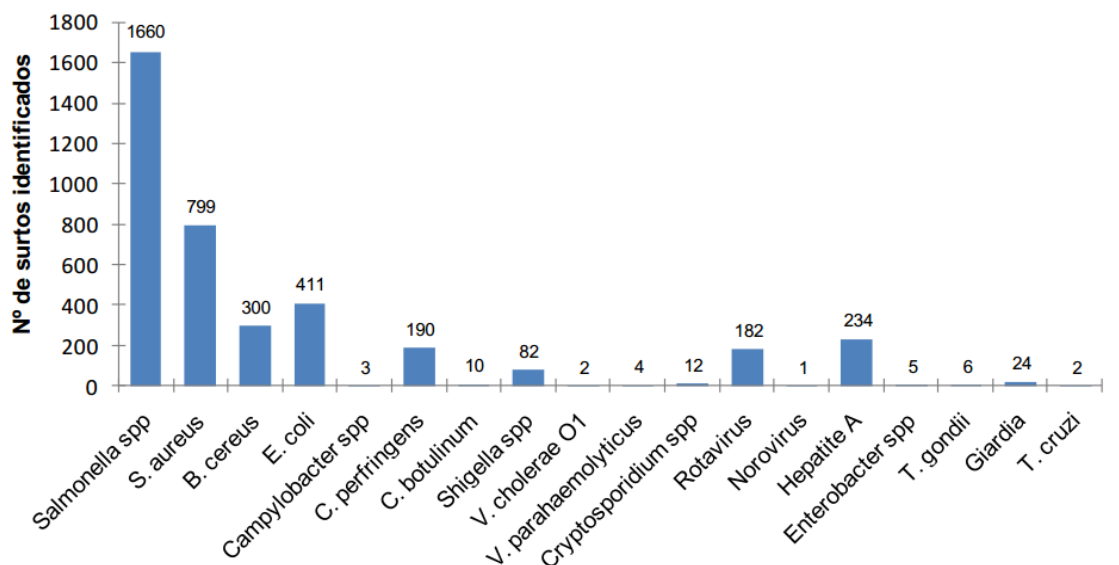


Figura 2 - Agentes etiológicos identificados por surto no Brasil entre os anos de 2000 e 2011.

Fonte: UHA/CGDT/DEVEP/SVS/MS, 2011.

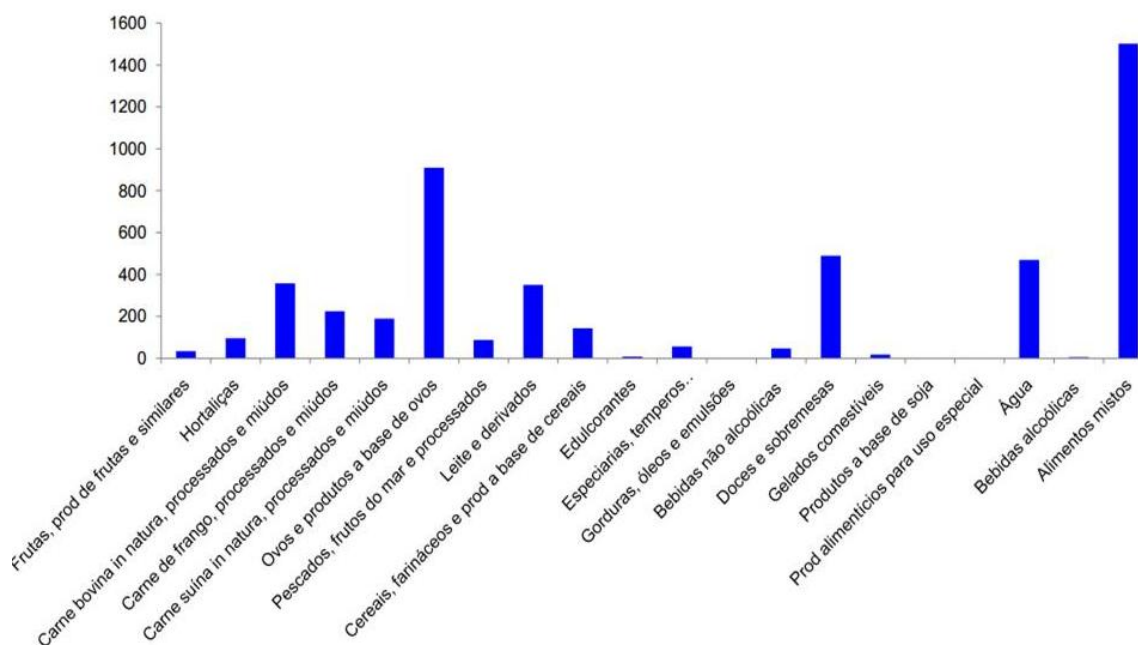


Figura 3 - Relação de alimentos envolvidos nos surtos alimentares no Brasil entre os anos de 2000 e 2011.

Fonte: UHA/CGDT/DEVEP/SVS/MS, 2011

Devido à vasta extensão territorial, o Brasil apresenta o sistema de notificação de doenças transmitidas por alimento ainda insuficiente e os números totais de notificação de casos de infecção por *Salmonella* não são reais (KAKU *et al.*, 1995; JAKABI *et al.*, 1999). A identificação precoce de surtos, de sua epidemiologia e fatores que contribuem para sua ocorrência, é uma prioridade na investigação e fornece subsídios importantes às ações de controle e prevenção. A vigilância epidemiológica identifica patógenos de surtos de diarreia, vias de transmissão e fatores de risco é essencial para as ações de vigilância sanitária, fornecendo subsídios para intervenções adequadas em práticas de preparação de alimentos, programas de educação de manipuladores, conscientização dos consumidores e revisão de regulamentos sanitários. Somado a isso, contribui para a melhoria do atendimento médico ao paciente, para mudança de condutas no tratamento da doença, para a redução de riscos de morbidade e mortalidade, prevenção e controle de surtos, entre outras (Boletim Epidemiológico Paulista - Secretaria de Estado da Saúde, 2004).

2.1.6 Resposta imune na salmonelose

O sistema imunológico, fundamental na defesa e equilíbrio do organismo, é constituído por uma grande variedade de células, moléculas, múltiplos fatores solúveis (como proteínas, citocinas e mediadores inflamatórios), tecidos linfóides, além de apresentar especificidades e organização própria. Todos estes componentes favorecem uma resposta imunológica efetiva e bem organizada, que visa “defender” o organismo da agressão externa e preservar o seu equilíbrio funcional, tendo por finalidade manter a homeostase do organismo, combatendo as agressões em geral (REGO, 2010).

Para lidar com a constante estimulação de toxinas e antígenos, o intestino evoluiu para um mecanismo altamente organizado e eficiente para o processamento antigênico, imunidade celular e imunidade humoral. O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) está localizado em três áreas: nas placas de Peyer, nas células linfóides da lâmina própria e nos linfócitos intra-epiteliais (ACHESON & LUCCIOLI, 2004; REGO, 2010). As placas de Peyer são nódulos linfáticos não-encapsulados que constituem um ramo aferente do tecido linfóide associado ao intestino, que reconhece

antígenos através de um mecanismo especializado, as células das microdobras (células M) contidas no tecido linfóide associado. As células M capturam moléculas e partículas do lúmen do intestino por endocitose ou fagocitose para o lado basolateral do epitélio, que está em contato direto com os tecidos linfóides podendo iniciar uma resposta imunológica (NEUTRA *et al.*, 2003). Devido à falta de glicocálice de superfície e a sua elevada atividade de endocitose, as células M transferem o material da endocitose para as células dendríticas (DCs) que pode induzir respostas de células T (MITTRUCKER & KAUFMANN, 2000; JANEWAY *et al.*, 2002; MACPHERSON & HARRIS, 2004; MACPHERSON & UHR, 2004). Existem duas vias principais para as bactérias para atravessar o epitélio intestinal, a primeira envolve células M, enquanto que na segunda as bactérias desenvolvem a capacidade de atacar o epitélio. Na primeira via ao invadir as células M, a *Salmonella* induz modificações na membrana da célula hospedeira, promovendo seu próprio “englobamento” (THIENNIMITR *et. al.*, 2011). A segunda via é a interação da *Salmonella* com o epitélio, o que resulta não somente na invasão das células epiteliais, mas também na produção de uma variedade de moléculas sinalizadoras nas células epiteliais, havendo a indução de uma reação inflamatória aguda e a transmigração de leucócitos através do epitélio (OWEN, 1999; SANSONETTI & PHALIPON, 1999; CASADESÚS, 2011) (Figura 4).

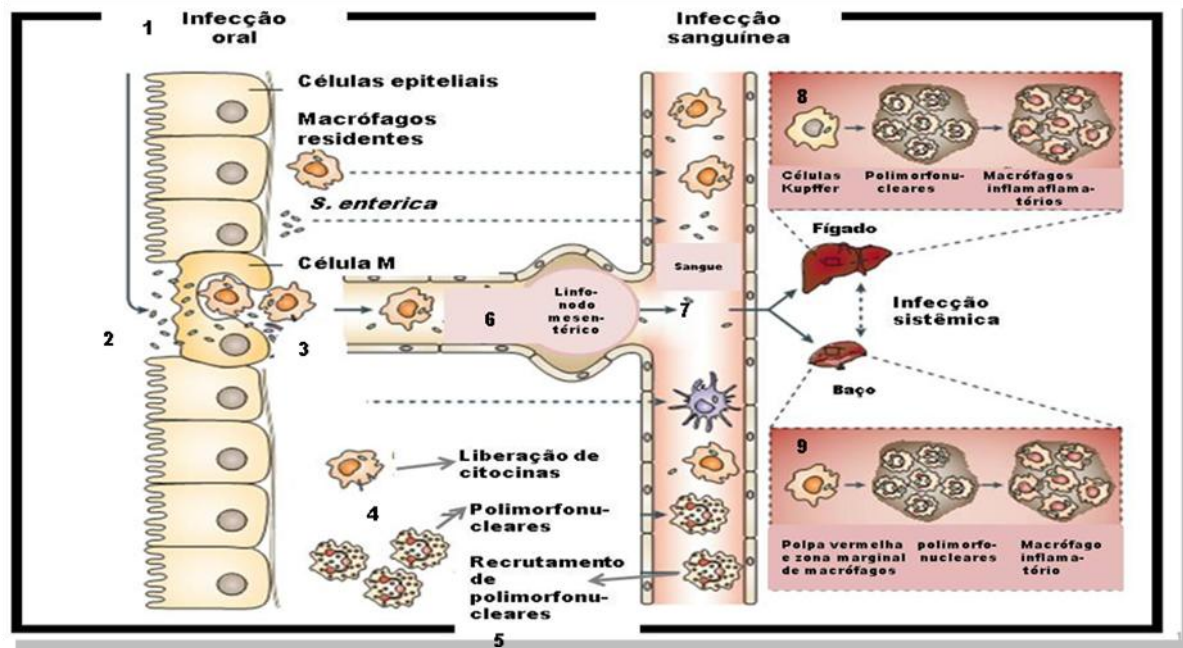


Figura 4 - Estratégias que permitem a *Salmonella* atravessar a barreira intestinal, sobreviver nos tecidos intestinais e espalhar sistemicamente.

Fonte: MONACK et al. 2004

Embora, a translocação através das células M parece ser um processo fácil para estes micro-organismos, a sobrevivência das bactérias nas placas de Peyers é um desafio. As bactérias que entram enfrentam um denso grupo de células fagocíticas, tanto residentes quanto aquelas que são rapidamente recrutadas, como os neutrófilos (KELSALL & STROBER, 1996). Isto evidencia que os micro-organismos invasores não só precisam atravessar a camada epitelial, mas também necessita resistir às defesas imunológicas inatas para poderem sobreviver à fagocitose e à morte e, assim, estabelecer estratégias para manter a infecção. No entanto a *Salmonella* estabelece outro padrão de interação, envolvendo uma combinação de estratégias extra e intracelulares que dependem de expressões de um Sistema de Secreção do Tipo III (TTSS) (SANSONETTI, 2004). A interação inicial entre a bactéria e as células epiteliais do hospedeiro não são muito conhecidas, mas sabe-se que estão envolvidos o TTSS e Ilhas de Patogenicidade (IP) (BARROW *et al.*, 2010). O TTSS é um complexo de sistemas de proteínas presentes em todas as bactérias Gram-negativas (MIRMONEI *et al.*, 2008). Nas bactérias patogênicas este complexo serve como um canal para secreção de proteínas efetoras para o interior da célula eucariótica. Estas proteínas possuem propriedades que auxiliam a bactéria infectar as células do hospedeiro (HUECK, 1998).

A maioria dos fatores de virulência das bactérias do gênero *Salmonella* está codificada em genes agrupados IPs (VIEIRA, 2009), que nestas bactérias são chamados de Ilha de Patogenicidade da *Salmonella* (SPI) (BARROW *et al.*, 2010). Diferentes genes associados à virulência da *Salmonella* estão presentes nas SPIs. A SPI-1 possui genes que codificam proteínas para o TTSS (VIEIRA, 2009), e a invasão e sobrevivência da *Salmonella* nas células hospedeiras estão relacionadas com uma série de proteínas bacterianas, que chegam até o citoplasma da célula hospedeira através de sistema de secreção (MIRMOMENI *et al.*, 2008). A principal função da SPI-1 é conferir uma maior capacidade de invasão da célula hospedeira pela bactéria (HANSEN-WESTER; HENSEL, 2001). A SPI-2 é composta por duas diferentes porções, uma delas presente apenas nos sorovares da *S. enterica* e outra comum às espécies *S. bongori* e *S. enterica*. A porção maior está relacionada com outro tipo de TTSS, que é ativado pela bactéria quando já está dentro da célula do hospedeiro, ao contrário do TTSS da SPI-1 (HENSEL, 2004). O TISS da SPI-2 transporta proteínas que protegem a bactéria dos mecanismos de defesa permitindo que ela sobreviva dentro das células fagocíticas, especialmente os macrófagos (RYCHLIK *et al.*, 2009; VIERIA, 2009). As proteínas efetoras secretadas pelo TTSS da SPI-1 mediam os primeiros estágios da infecção, (GALLAN & COLLMER, 1999; WALLIS & GALLOW, 2000), enquanto que, aquelas secretas pelo TTSS da SPI-2 atuam na infecção sistêmica (HENSEL, 2000) (Figura 5).

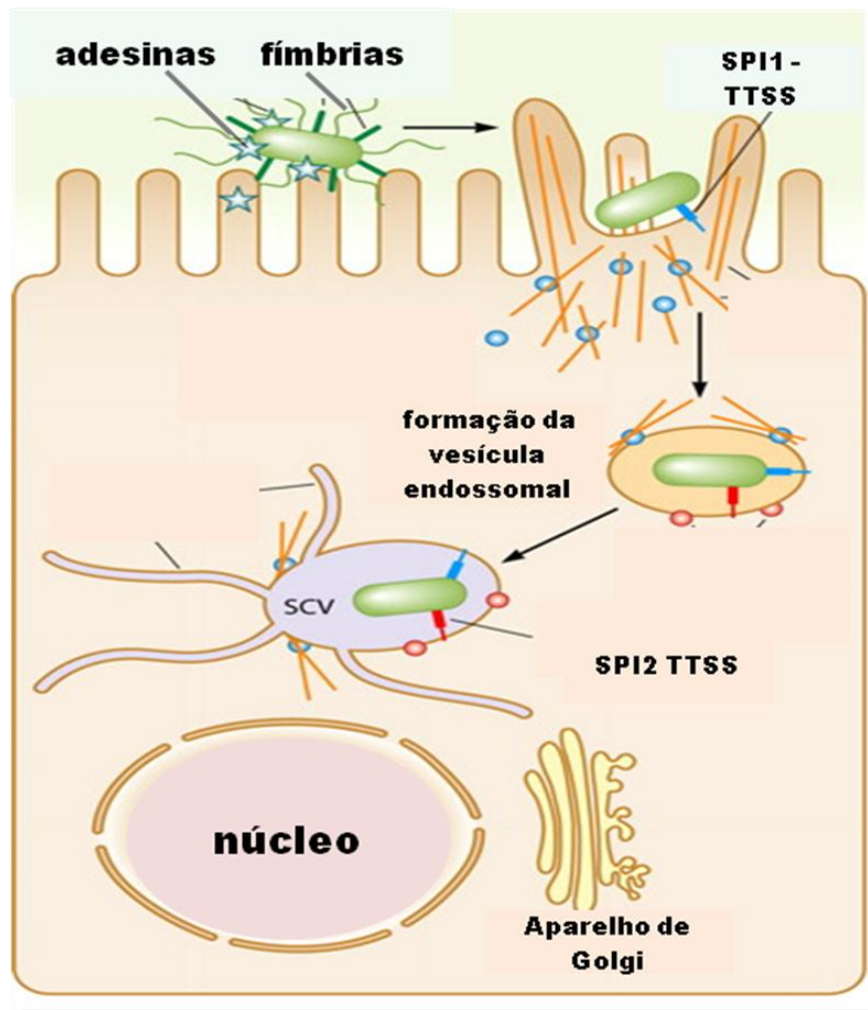


Figura 5 – *Salmonella* x células intestinais. Aderência da *Salmonella* na célula epitelial, os genes da SPI-1 codificam proteínas para o TTSS resultando desarranjando as proteínas da bactéria e invasão pela bactéria. Os genes SPI-2 codificam proteínas para o TTSS que resultam na maturação da vesícula inicial para SCV. Os SCV são modificados, e migrando o SCV para perto do aparelho de golgi para servir como um nicho intracelular replicativo. Fonte: GILBREATH, 2011

O circuito de sinalização que medeia à resposta epitelial de micro-organismos é baseado na detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (MEDZHITOV & JANEWAY, 2002), que são específicos e conservados para os componentes de procariontes, tais como LPS, a lipoproteína, peptidoglicano (PGN), ácido lipoteicóico, e flagelina. Deve notar-se que, os PAMPs são expressos tanto por micro-organismos comensais e quanto por patogênicos. Os PAMPs são reconhecidos pelos Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs). Os PRRs mais conhecidos são os receptores de tipo *Toll* (TLR), que são expressos pelas células das linhagens mielóide e linfóide, assim como por células epiteliais e endoteliais (ADEREM & ULEVITCH,

2000). Os TLRs foram mostrados por estar envolvidos no reconhecimento de bactérias comensais, participando assim na homeostase intestinal, controlando a invasão de patógenos (RAHOFF-NAHOUM *et al.*, 2004).

Para que aconteça a fagocitose, um dos vários componentes bacterianos como o LPS presente nos fluidos corporais, se liga à proteína plasmática ligadora de LPS (LPB). O complexo LPS:LPB se liga ao Cluster de diferenciação 14 (CD14) na superfície da célula apresentadora de antígeno (APC), no caso o macrófago (JANEWAY *et al.*, 2002), e promove a endocitose, internalizando a bactéria para a célula do hospedeiro. Quando o TLR4 da APC se liga ao CD14 complexado com o ligante LPS:LPB na superfície do macrófago, este envia um sinal ao núcleo, ativando o fator de transcrição nuclear (NFκB), o qual por sua vez, ativa os genes envolvidos na defesa contra infecção (JANEWAY *et al.*, 2002), modulando os principais mediadores inflamatórios envolvidos nesse processo.

Após a ligação aos seus respectivos agonistas, os TLRs dimerizam e sofrem mudanças conformacionais, necessárias para o recrutamento de um conjunto de moléculas adaptadoras que apresenta o domínio, *Myeloid Differentiation Primary-Response Gene 88* (MyD88) (TAKEDA *et al.*, 2003). MyD88 é uma das responsáveis pela ativação de distintas vias de sinalização que levam a produção de citocinas pró-inflamatórias e IFNγ- respectivamente (CAMPOPIANO, 2010).

A ativação do NFκB leva a produção de vários mediadores importantes na imunidade inata, tais como produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, além da expressão de moléculas co-estimulatórias e moléculas do MHC II (KOOP & MEDZHITOV, 1999) (Figura 6).

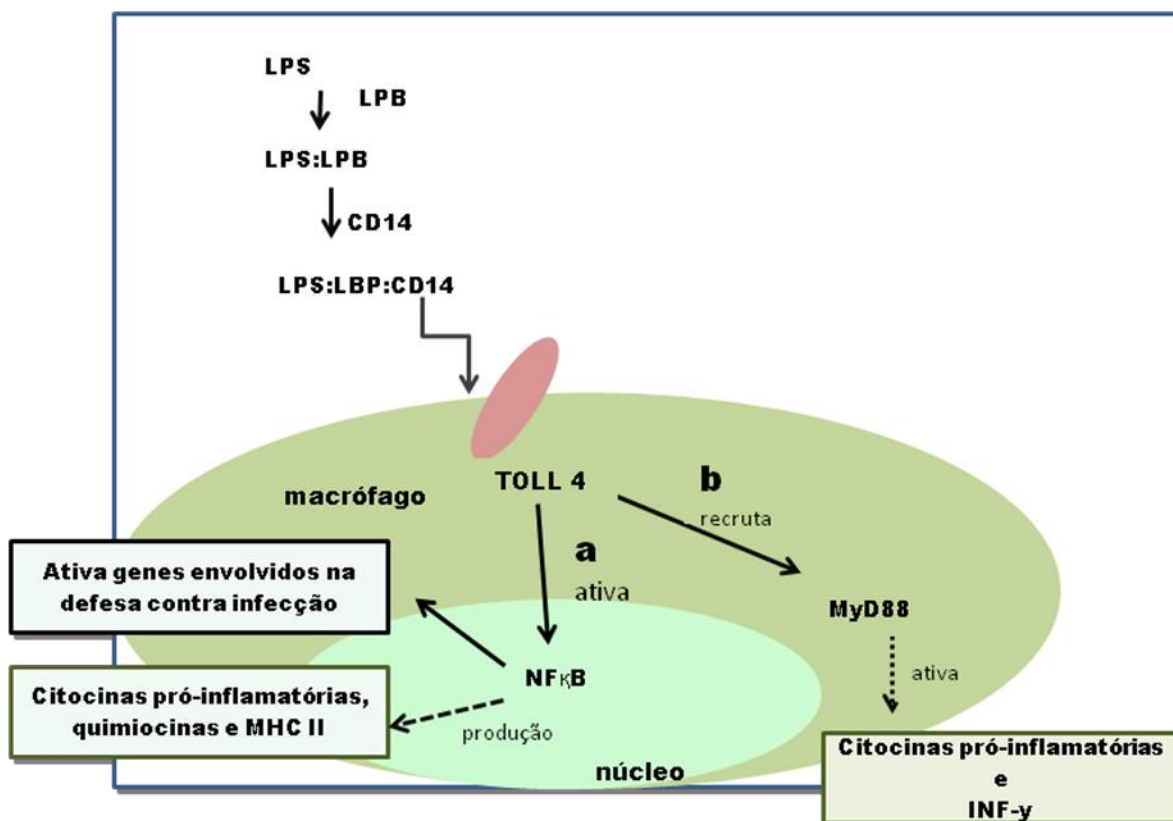


Figura 6 - Sinalização do *Toll-like receptor 4* no macrófago
 Fonte RIEDEMANN & WARD, 2002 MODIFICADO

É provável que PRRs proporcionem uma série de sinais cruciais que modulam a diferenciação de APCs (especialmente Células dendríticas-DCs), influenciando fortemente a natureza da resposta imune e, em particular, a sua orientação para controle da expressão de IL-12, que é produzido pelas APCs, em resposta a patogenicidade dos micro-organismos (DUCHMANN *et al.*, 1996; SANSONETTI, 2004). Além disso, as células T que circulam na lâmina própria e são específicas para antígenos comensais precisam ser ativamente suprimidas para evitar a inflamação descontrolada destes antígenos comensais. A presença de células T regulatórias é uma característica da lâmina própria. Estas células, que são conhecidas como células T regulatórias, inibem a ativação, diferenciação e proliferação de outras células T, produzem IL-10 e a neutralização de qualquer uma destas duas citocinas inibe as funções supressoras destas células (CHEN *et al.*, 1996; SANSONETTI, 2004).

Com a ativação do macrófago e a fagocitose da *Salmonella*, há formação de endossomas, os quais se tornam progressivamente acidificados à medida que avançam

para o interior da célula, eventualmente fundido com lisossomas. Os endossomas e lisossomas contêm proteases e pH baixo e eventualmente degradam os antígenos protéicos contidos nessas vesículas. (JANEWAY *et al.*, 2002) (Figura 7).

O MHC II liga-se aos peptídeos gerados nas vesículas intracelulares do macrófago e os apresentam às células T CD4. Entretanto, a via biossintética para as moléculas do MHC II é montada uma parte no retículo endoplasmático, depois o MHC II é liberado para o um compartimento endossômico de pH apropriadamente baixo e é onde o MHC II liga-se a fragmentos peptídicos dos micro-organismos, transportando-os para a superfície do macrófago para que os receptores de células T façam o reconhecimento e ative a imunidade específica (JANEWAY *et al.*, 2002).

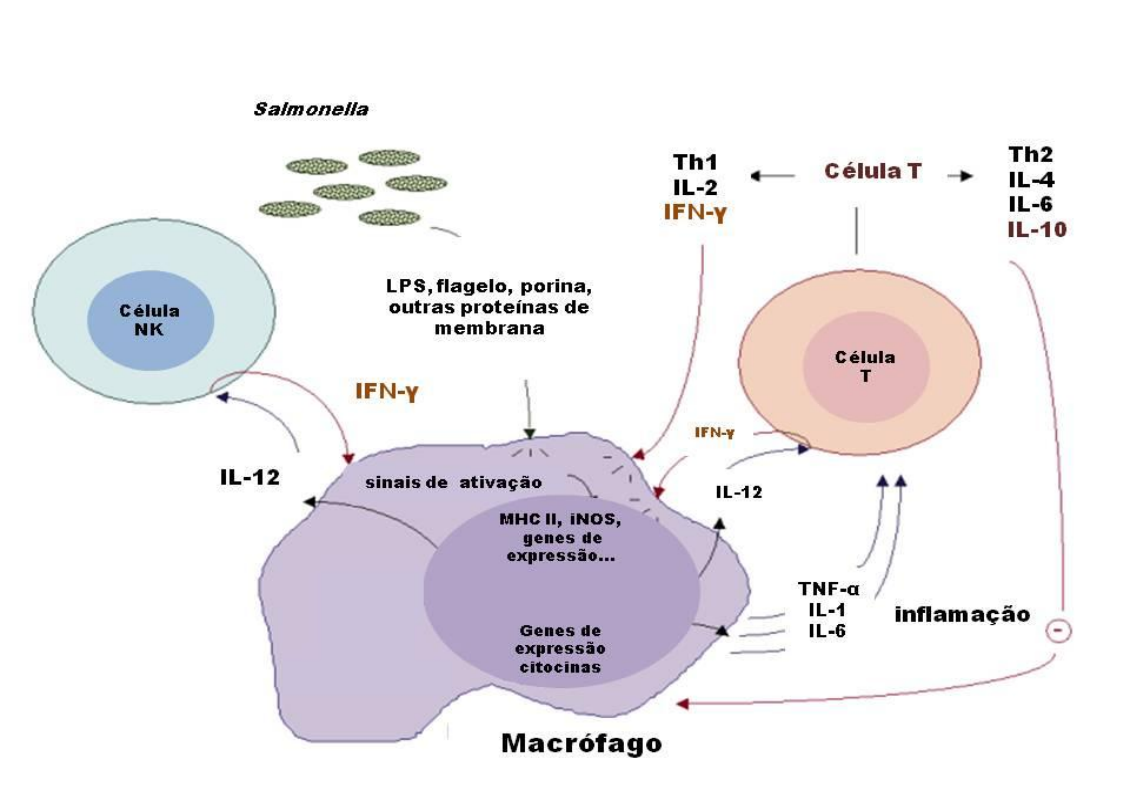


Figura 7. Citocinas, sinais e resistência durante a infecção por *Salmonella*.

No encontro entre macrófago e *Salmonella* é ativado o processo infeccioso que inicia com a fagocitose, mediada através de várias citocinas (IL-1, IL-6, TNF- α ou IL-12), MHC II e/ou iNOS, resultando no aumento atividade de microbicida do macrófago através IFN- γ produzido pelas células NK e/ou células T, sendo que a ativação do macrófago pode ser regulada negativamente pela IL-10.

Fonte: L'ALMANACH & FRÉDÉRIC LANTIER (1999).

A ligação ao complexo peptídeo-MHC e as moléculas co-estimuladoras na superfície do macrófago também ativam a célula T naiva a proliferar e se diferenciar,

resultando na produção de células efetoras antígeno-específicas. Quando há uma infecção localizada, ocorre indução das células efetoras a deixarem o sistema linfático e vasos sanguíneos a migrarem para os locais de infecção, e assim ocorre a liberação localizada de citocinas. As mudanças induzidas na parede dos vasos sanguíneos, além de recrutarem neutrófilos e macrófagos, também permitem que linfócitos T efetores recém-ativados entrem nos tecidos infectados (JANEWAY *et al.*, 2002).

É durante a resposta inicial das células T CD4 ao antígeno, nos tecidos linfóides periféricos, que ocorre a diferenciação das classes de células T CD4. Esta etapa na qual uma célula T CD4 se torna linfócito T *helper* 1 ou 2 (célula Th1 ou Th2) e tem impacto crítico sobre a evolução da resposta imune, determinando se ela será dominada pela ativação de macrófagos ou pela produção de anticorpos (JANEWAY *et al.*, 2002).

Inicialmente, sabe-se que as células T CD4 estimuladas em presença de IL-12 e INF- γ tendem a desenvolver em células Th1. Em parte, o INF- γ inibe a proliferação de células Th2. À medida que IL-12 for produzida por macrófagos e o INF- γ produzido pelas células Natural Killer (NK) predomina as respostas iniciais, com resposta célula Th1 (JANEWAY *et al.*, 2002).

As IL-12 e IL-18 secretadas por macrófagos ativados atuam tanto de forma independente ou/e sinérgica em células NK e células T auxiliares para induzir a produção de mais de IFN- γ , que ativa os macrófagos através de um ciclo de *feedback* positivo (MASTROENI *et al.*, 1998; MASTROENI *et al.*, 1999). Alguns trabalhos têm mostrado o importante papel da IL-12 na resistência à infecção por *Salmonella*. Após a inoculação oral da *Salmonella*, há indução da produção de IL-12 nos sítios da mucosa e em linfonodos mesentéricos (BOST & CLEMENTS, 1995; KINCY-CAIN *et al.*, 1996). Os macrófagos parecem ser as células responsáveis por essa secreção (IL-12) (CHONG *et al.*, 1996).

Um estudo relata o papel essencial das células NK e indiretamente dos macrófagos (NAUCIEL & ESPINASSE, 1992). A IL-12, uma citocina produzida pelos macrófagos, pode também induzir a secreção de IFN- γ pelas células NK (CHAN *et al.*, 1991; WOLF *et al.*, 1991), sendo vital na resistência contra infecções envolvendo patógenos intracelulares incluindo *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*), em parte por causa da estimulação da atividade antibacteriana dos macrófagos (MAI *et al.*, 2003; MUOTIALA & MAKELA, 1990).

O IFN- γ tem a capacidade de melhorar a atividade antibacteriana do macrófago. Ele é induzido durante a etapa inicial da infecção, pois níveis elevados de ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) de IFN- γ foram encontrados no início da infecção em tecidos linfóides do intestino e no baço dos animais nesse modelo (RAMARATHINAM *et al.*, 1991). Estudos têm relatado que a produção celular de IFN- γ durante a primeira semana de infecção por *Salmonella* é improvável de ser de linfócitos T, pois há uma depleção destas células, nesta fase não há uma redução de secreção de IFN- γ , sugerindo possivelmente que os macrófagos ativados possam contribuir para esta produção (RAMARATHINAM *et al.*, 1993).

Foi demonstrado que o IFN- γ tem um papel importante em manter e controlar o nível de replicação da bactéria em animais constantemente infectados, talvez estimule os macrófagos infectados a suprimir a replicação destas bactérias (MONACK *et al.*, 2004). Além do IFN- γ e IL-12, TNF- α também pode ter um papel na manutenção e controle do nível de replicação bacteriana. Além disso, demonstrou-se que, ativa a infecção da *S. typhimurium* conduz a imunossupressão em camundongos e causa a produção de grandes quantidades de IL-10, que tem atividades imunossupressoras, e o óxido nítrico (NO) que tem tanto atividade direta imunossupressiva antibacteriana (PIE *et al.*, 1996; EISENSTEIN *et al.*, 1994; MACFARLANE *et al.*, 1999).

Já a produção de TNF- α durante a salmonelose permanece controversa. A liberação de TNF- α sistêmica em resposta à infecção por *Salmonella* não foi detectada em camundongos (KUMAZAWA *et al.*, 1998) ou mesmo no caso de septicemia grave por salmonelose em vitelos (PEEL *et al.*, 1990). Nestas espécies, o nível de TNF- α parece aumentar apenas em resposta à endotoxina ou à injeção de LPS. No entanto, um aumento no nível sérico de TNF- α tem sido medido após o desafio intraperitoneal com *S. typhimurium* em camundongos (JOTWANI *et al.*, 1995) ou em pacientes com febre tifóide (KEUTER *et al.*, 1994).

Células T CD4 ativadas na presença de IL-4, especialmente quando IL-6 está presente, se diferenciam em células Th2, enquanto IL-4 e IL-10, isoladas ou em combinação, podem também inibir a produção de células Th1 (L'ALMANACH & LANTIER, 1999). IL-4 é um mediador capaz de direcionar o precursor de células T helper a se diferenciarem em células Th2 *in vitro* (MOSMANN T & COFFMAN, 1989). Várias evidências sugerem que IL-4 tem um efeito deletério sobre a capacidade

de proteger o hospedeiro contra a *Salmonella*, talvez porque possa contribuir na inibição dos mecanismos efetores presentes na resposta Th1 (L'ALMANACH & LANTIER, 1999). As células Th2 têm a função de ativação de células B para a produção de anticorpos e, as células Th1 são cruciais na ativação de macrófagos. Os dois subgrupos podem regular um ao outro. Em razão disso, as citocinas de um grupo tende a modular o efeito do outro.

A IL-10, uma citocina regulatória pode inibir o desenvolvimento de células Th1, agindo sobre o macrófago, enquanto o IFN- γ produto de células Th1 pode inibir o desenvolvimento de células Th2. O efeito geral é que certas respostas são denominadas de imunidade humoral (Th2) e celular (Th1). *In vivo*, estes dois tipos celulares atuam simultaneamente e contribuem efetivamente no controle da infecção (JANEWAY *et al.*, 2002). Uma vez que a IL-10 antagoniza o IFN- γ sobre os efeitos nos macrófagos e inibe a resposta do hospedeiro mediada por macrófagos, alguns experimentos foram concebidos para questionar se esta citocina pode estar envolvida na susceptibilidade à infecção *Salmonella*. Em modelos de endotoxemia em camundongos, a IL-10 apresenta um efeito protetor que estaria relacionado à inibição da produção de TNF- α (GÉRARD *et al.*, 1993; HOWARD *et al.*, 1993; ROGY *et al.*, 1995). Em paralelo, a IL-10 também apresenta um papel regulatório sobre outras citocinas, como o INF- γ (FLORQUIN *et al.*, 1994).

3. *Harpagophytum procumbens* DC- Hp

Estatísticas demonstram que, aproximadamente 25% do número total de plantas superiores do mundo são encontradas na África. De acordo com o Projeto de Banco de Dados Africano (KLOPPER *et al.*, 2006), a África Tropical e a África do Sul apresentam um total de 50.136 plantas superiores, onde mais de 16.300 possuem uso medicinal (NEUWINGER, 2000). Para Van Wyk & Gericke (2000), existem cerca de 3.000 plantas medicinais sendo usadas regularmente na África do Sul. Destas 3.000 espécies de plantas medicinais, existem por volta de 38 sendo utilizados e comercializados pelos nativos em diversas formas, tais como chás, tinturas, comprimidos, cápsulas ou pomadas, podendo também ser comercializadas em mercados informais (CUNNINGHAM, 1988; MANDER, 1998; WILLIAMS *et al.*, 2000).

A *Harpagophytum procumbens* DC, pertence à família *Pedaliaceae*. É uma planta originária do Continente Africano, geralmente encontrado no Deserto Kalahari, na África do Sul, na Angola, em Botswana, na Namíbia e no Zimbábwe. (VAN WYK *et al.*, 1997; VAN WYK & GERICKE, 2000). Caracteriza-se por ser pouco robusta tuberosa e perene, apresentando frutos visivelmente notáveis. Os frutos têm longas e numerosas saliências, com ganchos afiados que se assemelham a garras, o que justifica seu nome popular: garra-do-diabo ou unha-do-diabo (VAN WYK *et al.*, 2002; WYNBERG, 2004) (Figura 8A).



Figura 8A: Frutos da *Harpagophytum procumbens*

Fonte: Reviver Saúde Holística. Disponível em: < www.reviversaudeholistica.blogspot.com >

As flores e folhas da *Harpagophytum procumbens* emergem de brotos no solo após as primeiras chuvas, mas morrem nos meses de inverno ou durante períodos de seca (WYNBERG, 2004; STEWART & COLE, 2005). As flores se caracterizam por serem tubulares e de cor malva-rosa com amarelo, enquanto suas folhas são verde azuladas e geralmente divididas em vários lobos (VAN WYK *et al.*, 1997; STEWART & COLE, 2005) (Figura 8B).



FIGURA 8B: Flores e Folhas da *Harpagophytum procumbens*

Fonte: Reviver Saúde Holística. Disponível em:

<<http://reviversaudeholistica.blogspot.com.br/2011/10/herbal-antinflamatorias-devils-claw.html>>

Os caules são rastejantes, o broto se forma, anualmente, a partir dos tubérculos persistentes primários, que se estendem com até 2 metros de profundidade no solo. As hastes dão origem a vários tubérculos secundários de armazenamento que podem apresentar até 25 cm de altura com 6 cm de diâmetro. Estes tubérculos secundários que são coletados, por apresentarem as propriedades medicinais da *H. procumbens* (RAIMONDO *et al.*, 2005; STEWART & COLE, 2005) (Figura 8C).



Figura 8C – Tubérculos da *Harpagophytum procumbens*

Fonte: Reviver Saúde Holística.

Disponível em

<<http://reviversaudeholistica.blogspot.com.br/2011/10/herbal-antinflamatorias-devils-claw.html>>

De acordo com os estudos descritos por Ihlenfeldt e Hartmann (1970), essa planta se divide em duas espécies e cinco subespécies: *H. procumbens* (*H. procumbens* subsp. *procumbens* e *H. procumbens* subsp. *transvaalensis*) e *H. zeyheri* (*H. zeyheri* Decne subsp. *zeyheri*, *H. zeyheri* subsp. *schijffii* e *H. zeyheri* subsp. *sublobatum*). Nos anos de 1820, a *H. procumbens* foi coletada e descrita por cientistas europeus. Contudo, a utilização terapêutica da planta ganhou maior notoriedade através dos estudos de Mehnert. Esse agricultor alemão, que viveu na Namíbia na década de 1920, aprofundou seus conhecimentos sobre as propriedades da *H. procumbens* a partir da população indígena. Segundo Wegener (2000), Mehnert enviou amostras à sua terra natal, para análise química (WEGENER, 2000), mas somente em 1958 as propriedades farmacológicas da *H. procumbens* foram confirmadas e desde então o seu emprego medicinal tomou expansão com o uso popular entre os nativos africanos e depois se espalhou pela Europa e Ásia (MNCWANGI, 2012).

Curiosamente, a *H. procumbens* era uma espécie considerada um estorvo para a pecuária pelos fazendeiros, pois os frutos machucavam os pés dos animais (STEWART & COLE, 2005). Os ventos fortes carregavam a longas distâncias as sementes das plantas e os animais ajudavam em sua dispersão, ficando estas depositadas na areia do solo (MOATTI *et al.*, 1983). Outro fato interessante é que as sementes podem permanecer no solo por mais de 20 anos em estado de dormência (STEWART & COLE, 2005).

No caso dos tubérculos da *H. procumbens*, os componentes farmacologicamente ativos são os glicósidos iridóides, que compreendem cerca de 3% do total do material da planta (BAGHDIKIAN *et al.*, 1997). A fração glicosídeo iridóide consiste em harpagoside, procumbide, harpagide e 8-p-coumaroil-harpagide (HAAG-BERRUER *et al.*, 1978). Os constituintes adicionais incluem hidratos de carbono (estaquiose, rafinose, monossacarídeos), flavonóides (kaempferol, luteolina), ácidos aromáticos (ácido caféico, ácido clorogênico, ácido cinâmico), fitosteróis (β -sitosterol, estigmasterol), triterpenos (ursólico e oleanic ácido), 2-fenil-etil derivados (acteoside, isoacteoside) e harpagoquinone (BURGER *et al.*, 1987).

As raízes secas secundárias perenes são utilizadas, principalmente, contra a artrite, dor nas articulações, dispepsia e perda de apetite (NEWALL *et al.*, 1996; BLUMENTHAL *et al.*, 1998; WICHTL & BISSET, 2000; ESCOP, 2003). Estudos

clínicos, avaliados por Wegener (2000), Chrubasik *et al.* (2003) e Gagnier *et al.* (2004) confirmaram propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, geralmente atribuídas aos glicosídeos iridóides (principalmente harpagoside, com quantidades menores de harpagide e procumbide). O produto comercial contém entre 0,5% e 3% harpagoside. (FIEBICH *et al.*, 2001; KASZKIN *et al.*, 2004).

Estudos mostraram que harpagoside pode estar completamente ausente de algumas populações de *H. zeyheri*, apesar do fato de que esta espécie é considerada uma alternativa aceitável na falta da *H. procumbens* (CZYGAN & KRÜGER, 1977).

O harpagoside foi o primeiro glicosídeo iridóides isolado da *H. procumbens* em 1962, e é considerado o seu principal componente ativo (MEDPLANT UPDATE, 1997). O segundo componente ativo a ser isolado foi o harpagide, quase ao mesmo tempo em que foi o harpagoside. O terceiro glicosídeo iridóides isolado foi o procumbine em 1964 (WEISS, 1988). Em 1983, mais três glicosídeos iridóides foram descobertos, mas com diferentes funções.

3.1. Atividades biológicas atribuídas a *H. procumbens*:

3.1.1. Atividade anti-inflamatória e analgésica

A ação dos principais componentes, harpagoside, com quantidades menores de harpagide e procumbide, desempenha potente atividade anti-inflamatória, anti-reumática (EICHLER & KOCH, 1970; LANHERS *et al.*, 1992), e inibidor de Ciclooxigenase 2 (COX-2). *In vitro*, extratos preparados com tubérculos incluem a supressão de Interleucina 1 β (IL-1 β)-induzida pela produção de metaloproteinases em condrócitos humanos (SCHULZE-TANZIL *et al.*, 2004), estimulam inibição do fator de necrose tumoral (TNF α), IL6 e IL1 β e Prostaglandina E2 (PGE2) a partir de monócitos humanos estimulados com LPS, *in vitro* (FIEBICH *et al.*, 2001). A eficácia da *H. procumbens* em reduzir a dor e inflamação associada como artrite reumatóide e osteoartrite pode ser explicada pela sua habilidade em bloquear a produção de mediadores inflamatórios tal como PGE2 (ABERHAM *et al.*, 2007).

3.1.2. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante desta planta pode melhorar doenças como artrite. Segundo Betancor & Fernández *et al.* (2003), o extrato apresenta rica quantidade de antioxidante. Georgiev *et al.* (2010) em cultura de células utilizando os principais constituintes ativos verificou que β -OH-A verbascoside e leucosceptosídeo apresentavam atividade antioxidante.

3.1.3. Atividade anti-diabética

Há relatos que tubérculos da *H. procumbens* são usados em algumas comunidades da África do Sul, no tratamento de diabetes tipo I e diabetes tipo II (MAHOMED & OJEWOLE, 2005). Mahomed e Ojewole (2005) encontraram resultados na redução da glicemia em camundongos diabéticos após a administração do extrato aquoso dos tubérculos secundários da *H. procumbens*.

3.1.4. Atividade antimicrobiana

Devido ao aumento da resistência a antibióticos, extratos de plantas e produtos naturais são de especial interesse como potenciais e agentes microbicidas. Weckesser *et al.* (2007) relatou que o extrato da *H. procumbens* inibiu *Candida krusei*, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: Staphylococcus aureus* MRSA (RV5/98), *Pseudomonas maltophilia* (D 141/92) entre outros. Contudo o harpagoside isolado não foi efetivo no “screening”, sugerindo o sinergismo de outros componentes a atividade microbicida entre os constituintes (WECKESSER *et al.* 2007).

Entretanto, não foram encontrados relatos demonstrando a ação da *H. procumbens* em modelos experimentais que utilizam bactérias *in vivo* como indutor de processo inflamatório intestinal. Sabendo que, a infecção intestinal causada pela *S. Enteritidis* direciona uma gama de mediadores inflamatórios e conhecendo as propriedades anti-inflamatórias atribuídas a *H. procumbens*, avaliamos neste estudo a modulação do processo inflamatório induzido por *S. Enteritidis* ATCC13076 e após tratamento com *H. procumbens* no modelo experimental murino.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos anti-inflamatórios do tratamento com o extrato etanólico da *H. procumbens* na salmonelose intestinal murina.

4.1-Objetivos Específicos

Avaliar o perfil de células inflamatórias no sangue e lavado da cavidade peritoneal de animais infectados por *S. Enteritidis* ATCC 13076, tratados ou não com *H. procumbens*;

Avaliar o efeito da *H. procumbens* na produção das citocinas TNF- α , IL-4, IL-12, IL-10 durante a salmonelose intestinal murina;

Analisar o perfil histopatológico do fígado e intestino delgado de animais infectados por *S. Enteritidis* ATCC 13076, tratados ou não com o *H. procumbens*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1-Preparo do extrato etanólico da *H. procumbens*

O extrato etanólico bruto da *H. procumbens*, foi preparado pelo aluno Ricardo Oliveira Correa (LAP-DMP-UFSCar) no laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ-UFSCar), sob orientação do Prof. Dr. Paulo César Vieira. Para a preparação do extrato, as raízes secundárias da *H. procumbens*, foram secas em estufa a 37°C durante três dias, sendo posteriormente maceradas até a obtenção do pó. A cada 100 gramas foram acrescentados 1000 mL de etanol absoluto. O béquer contendo esta solução foi mantido em temperatura ambiente durante 72 horas com agitações a cada 24 horas, sendo posteriormente filtrado em papel de filtro. Após o tempo descrito, o filtrado foi concentrado utilizando rota-vapor (BUCHI) com temperatura entre 40° a 45°C. Este processo de extração foi repetido duas vezes, se obtendo o extrato bruto das raízes da *H. procumbens*. A secagem total do extrato foi realizada na capela, logo após o extrato seco foi armazenado a -20° C.

5.2 Padronização do inoculo

A preparação e padronização do inoculo foi realizado de acordo com o *Clinical and Laboratory Standars Institute* (CLSI, 2005), com algumas modificações. As bactérias foram cultivadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubado por 18 horas em estufa bacteriológica a 37°C. Após o crescimento os inoculos bacterianos foram ajustados com auxilio da escala 0,5 de MacFarland, que corresponde a aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL.

5.3 Animais

Foram utilizados 30 camundongos fêmeas com 4 semanas de idade, isogênicos (Balb/c), pesando aproximadamente 18 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (PCRP-

USP), livres de patógenos *Specific Pathogen Free* (SPF) e com livre acesso a água e ração ambos esterilizados. Colocados 2 camundongos por caixa, trocando-se a maravalha esterilizada diariamente. Os camundongos foram infectados e tratados conforme descrito no item 5.4 mantido no biotério de experimentação do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos. Parecer da Comissão de Ética no uso de animais nº 012/2012, da Universidade Federal de São Carlos, Pró-Reitoria de Pesquisa.

5.4 Delineamento experimental

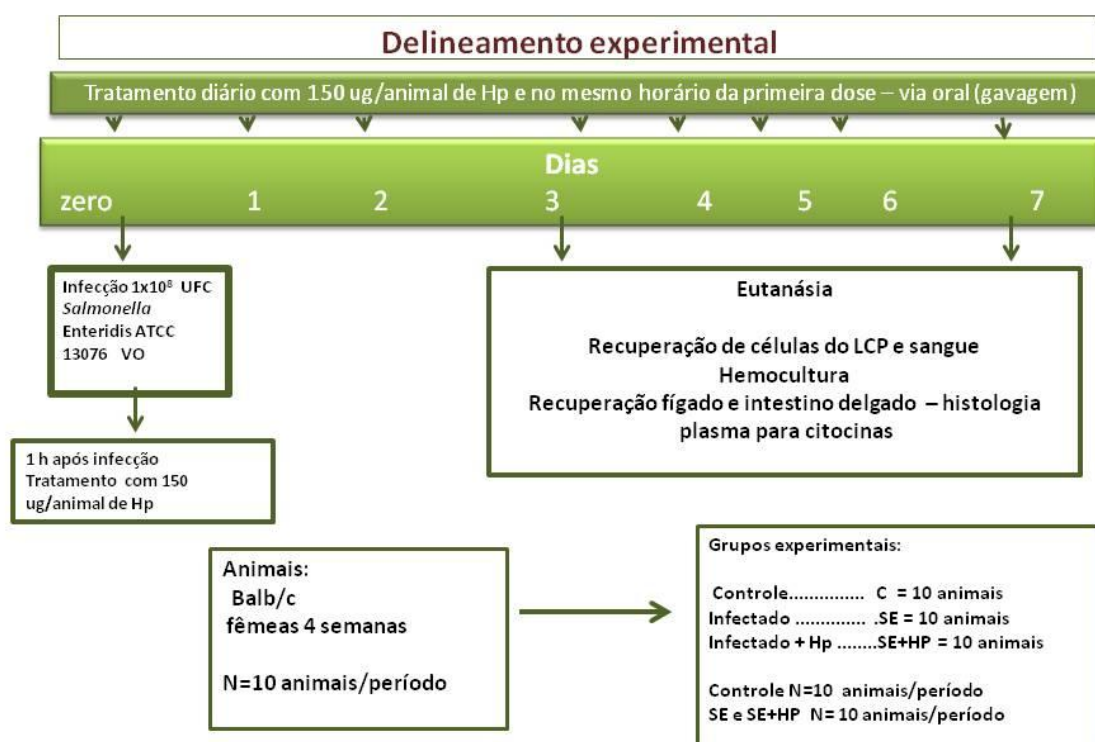


Figura 9. Fluxograma experimental. O experimento representa a análise dos parâmetros celulares, imunológicos, histológicos e bacterianos em 2 dias distintos da infecção: no 3º dia e 7º dia após a infecção via oral por *Salmonella* Enteridis ATCC13076 .

Foram utilizados 10 camundongos por grupo para cada experimento em 2 experimentos independentes. A infecção e tratamento foram realizados por gavagem (v.o.) utilizando cânula apropriada (tabela 3).

Os animais foram infectados no primeiro dia do experimento com *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 com 100 µL do inóculo bacteriano descrito no item 5.2. Após

uma hora da infecção um dos grupos animais foram tratados com a *H. procumbens* (Grupo SE+HP). O tratamento foi realizado diariamente por 7 dias, sempre no mesmo horário da primeira dose. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ nos tempos previamente estabelecidos, ou seja, no 3º e 7º dia após a infecção, e as células obtidas do lavado da cavidade peritoneal (LCP) e sangue total foram analisadas. Uma parte do sangue total foi usado para cultura e a outra parte do sangue total foi retirado plasma para a dosagem de citocinas. A recuperação do fígado e intestino delgado foi feita para realizar estudos histológicos.

Tabela 3 - Grupos experimentais

Grupo	Descrição do grupo	Infectado com <i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 13076	Tratado com <i>H.procumbens</i>
Grupo C	grupo controle	não	não
Grupo SE	grupo infectado e não tratado	sim	não
Grupo SE+HP	grupo infectado e tratado	sim	sim

O tratamento com extrato da *H. procumbens* foi administrado na dose de 150 µg/animal/0,3 mL de água filtrada e esterilizada. As alíquotas do extrato foram mantidas sob refrigeração a -20°C após pesadas. A solução do extrato da *H. procumbens* com água filtrada e esterilizada foi preparada diariamente minutos antes da administração nos animais. O modelo proposto foi feito em duplicata para a confirmação dos resultados obtidos.

5.5 Obtenções das células do lavado da cavidade peritoneal (LCP) e sangue

Para o LCP foi utilizado 3 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), contendo 0,5% de citrato de sódio (PBS/Citrato), empregando uma agulha intraperitonealmente.

O sangue foi obtido após sangria total dos animais por punção cardíaca, com auxílio de uma seringa heparinizada (heparina). Foram realizadas as contagens globais e diferenciais de células do sangue, do LPC e cultura do sangue.

5.6 Contagem total de glóbulos brancos e diferencial das células do LCP e sangue

O número total de células/mm³ no sangue total (glóbulos brancos) foram determinadas utilizando solução de Turk (Violeta de Genciana 0.002 g, Ácido Acético 3%) para a lise das hemácias (STIBBE *et al.*, 1985), na diluição 1:20 e posterior contagem em câmara de Neubauer. A contagem diferencial (específica) das células do sangue foi realizada através de esfregaços sanguíneos e corado com Panótico-Laborclin. Em cada lâmina foram contadas 100 células, utilizando microscopia de luz com aumento final de 1000x.

O número total de células/mm³ no LPC foram determinados empregando solução de Turk (Violeta de Genciana 0.002 g, Ácido Acético 3%) para a lise das hemáceas (STIBBE *et al.*, 1985), na diluição 1:20 e posterior contagem em câmara de Neubauer. A contagem diferencial (específica) das células no LPC os esfregaços foram preparados em citocentrífuga (Serocito Mod. 2400-Fanem) e corados com Panótico-Laborclin. Em cada lâmina foram contadas 100 células, utilizando microscopia de luz com aumento final de 1000x.

5.7 Hemocultura

No dia zero foi coletado sangue da veia caudal de 2 camundongos para determinar o SPF. Nos 3^o e 7^o foram coletados sangue de todos os animais sacrificados (5 animais por grupo, 15 animais por período, um total de 30 animais).

A hemocultura foi realizada inoculando 2 gotas de sangue em tubo com 2mL de caldo BHI assepticamente, para evitar contaminação. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica por um período de 18 a 24 horas a temperatura 37°C. Após isso, foi semeado Agar *Salmonella/Shigella* e incubado novamente por um período de 18 a 24 horas. Em seguida foi analisado se houve ou não o crescimento da bactéria

Salmonella Enteridis ATCC13076. Este procedimento foi realizado no 2º, 7º e 14º dias após a coleta e incubação dos tubos com sangue.

5.8 Ensaio imunoenzimático (ELISA) - Citocinas IL-4, IL-10 IL-12 e TNF- α

Para a determinação das citocinas foi utilizado o ensaio ELISA (Kit BD-R&D) usando placas de microtitulação com 96 poços. Inicialmente foi feita a sensibilização da placa com 100 μ L/poço de solução contendo o anticorpo de captura (0.5 μ g/mL) diluído em PBS. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C. Após esse período, o sobrenadante foi desprezado, sendo realizado ciclo de lavagem (0,05% de Tween em PBS) e o bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas foi com Soro bovino fetal a 1% em PBS. Novamente, as placas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente e em seguida outro ciclo de lavagem. A seguir foram adicionadas as diferentes diluições da citocina recombinante padrão e as amostras em estudo (100 μ L/poço). Após incubação por 2 horas, foi feito novo ciclo de lavagem e adicionado 100 μ L/poço do anticorpo de detecção (anticorpo secundário biotilado 0.125 μ g/mL). Após nova incubação de 1 hora a temperatura ambiente e novo ciclo de lavagem, foram adicionados (100 μ L/poço) da enzima estrepto-avidina (1:1000) diluída em PBS e soro bovino fetal 10%, sendo que depois de 30 minutos a placa foi novamente lavada e adicionou-se 100 μ L/poço do substrato. O substrato utilizado foi uma mistura 1:1 de H₂O₂ e tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente, a reação foi bloqueada adicionando-se 50 μ L/poço de H₂SO₄ 1M. A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda 450nm em leitor de ELISA (MicroQuant-Sellex,Inc.).

5.9 Estudos histopatológicos e microfotografias

O fígado e intestino delgado foram removidos após eutanásia nos períodos pré-estabelecidos, e imediatamente fixados em formol tamponado 10%, durante 24 horas. Posteriormente submetidos ao processo de desidratação com concentrações crescentes de álcool (álcool 70% até absoluto) e diafanizados em xilol e na sequência incluídos em

blocos de parafina, seccionados em cortes de 5 μm , e então dispostos em lâminas e incubados a 58-60°C para fixação. Posteriormente, foram lavados em xilol para retirar o excesso de parafina e reidratados com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto aos 80%). As lâminas foram coradas com Hematoxilina e eosina (HE) para a avaliação qualitativa do infiltrados celular.

As lâminas foram gentilmente confeccionadas no Instituto de Patologia Cirúrgica e Citopatológica Dr. Nicolino Lia Neto (IPCC) – Araraquara, sob a responsabilidade do Dr. Nicolino Lia Neto e analisadas pelos Dr. Raphael Carlos Comeli Lia e Dr. Nicolino Lia Neto. As lâminas foram analisadas e fotografadas no Laboratório IPCC com auxílio do microscópio (Nikon Eclipse E600).

5.11 Análise estatística

Os resultados foram expressos com média \pm EPM (Erro Padrão da Média). Os resultados obtidos nos diferentes experimentos foram analisados por meio da análise de variância ANOVA. Para análise estatística foi utilizado o programa PRISMA- (One-Way ANOVA- Newman-Keuls e t-test) (San Diego, Califórnia, USA). O nível de significância adotado foi de 5%, sendo $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Avaliação do perfil celular durante a infecção por *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 após o tratamento com *H. procumbens*

6.1.2 Contagem total de leucócitos no sangue de camundongos infectados ou não por *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com *H. procumbens*, no 3º e 7º dia de infecção e tratamento

A Figura 10A representa a contagem total de leucócitos no sangue de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 3º dia de infecção e tratamento. Não houve diferença significativa (onde $p > 0,05$) na contagem total de leucócitos nos diferentes grupos experimentais no sangue (tabela 4).

A Figura 10B representa a contagem total de leucócitos no sangue de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 7º dia de infecção e tratamento. Não houve diferença significativa (onde $p > 0,05$) na contagem total de leucócitos no sangue nos grupos CxSE+HP e SExSE+HP. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) no grupo CxSE (aumento no grupo SE em relação ao C) (tabela 4).

Tabela 4 – Contagem de Leucócitos totais no sangue no 3º e 7º dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella* Enteritidis ATCC13076

Grupos	3º dia	7º dia
	média dos valores/mm ³	média dos valores/ mm ³
Grupo controle	8.060 ± 963,63	5.620 ± 470,11
Grupo infectado e não tratado	9.400 ± 1.056,41 (ns)	9.3000 ± 941,50 (*)
Grupo infectado e tratado	8.760 ± 1191,47 (ns)	8.100 ± 709,62 (ns)

ns: valor não significativo estatisticamente ($p > 0,05$); comparação entre o Grupo Controle e Infectado

* $p < 0,05$.

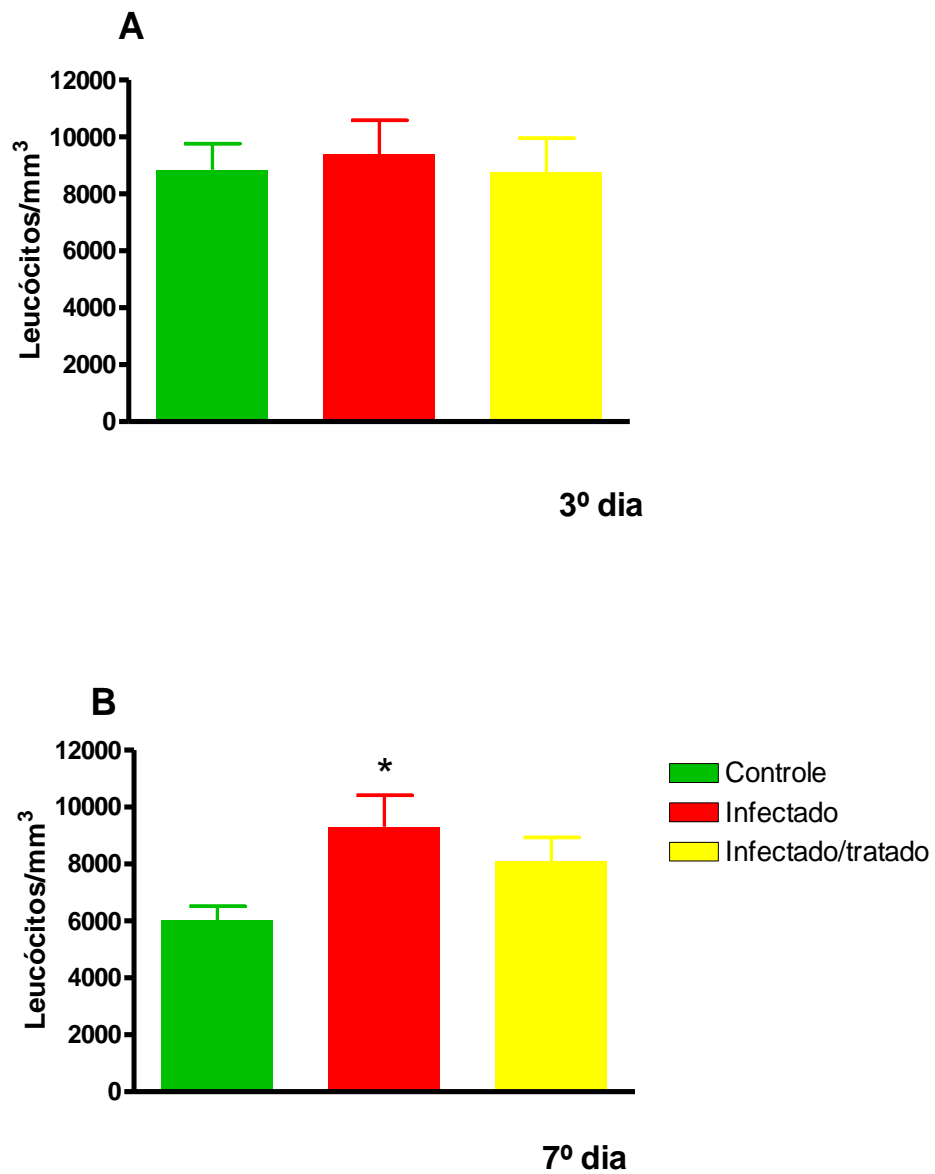


Figura 10. Contagem de Leucócitos totais no sangue no 3º (A) e 7º (B) dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella Enteritidis* ATCC13076. Os dados representam a média \pm EPM (n = 10 animais) de 2 experimentos independentes. Comparação entre o Grupo Controle e Infectado * p < 0,05 comparação entre grupo Infectado e Infectado e tratado com *H. procumbens* & p < 0,05 usando o teste não paramétrico o PRISMA- (One-Way ANOVA- Newman-Keuls).

6.1.3 Contagem total de leucócitos no LPC de camundongos infectados ou não por *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com *H. procumbens*, no 3º e 7º dia de infecção e tratamento

A figura 11A representa a contagem total de leucócitos no LPC de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 3º dia de infecção e tratamento. Não houve diferença significativa (onde $p > 0,05$) na contagem total de leucócitos nos diferentes grupos experimentais no LPC (tabela 5).

A figura 11B representa a contagem total de leucócitos no LPC de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 7º dia de infecção e tratamento. Não houve diferença significativa (onde $p > 0,05$) no grupo SExSE+HP e houve diferença significativa (onde $p < 0,05$) grupo CxSE (aumento do grupo SE em relação do C) e SExSE+HP (aumento do grupo SE em relação ao SE+HP) (tabela 5).

Tabela 5 – Contagem de Leucócitos totais no LPC no 3º e 7º dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella* Enteritidis ATCC13076

Grupos	3º dia	7º dia
	média dos valores/mm ³	média dos valores/ mm ³
Grupo controle	2.660 ± 233,66	3.080 ± 344,76
Grupo infectado e não tratado	2.360 ± 102,12 (ns)	4.500 ± 287,84 (*)
Grupo infectado e tratado	2.440 ± 233,66 (ns)	2.880 ± 189,73 (&)

ns: valor não significativo estatisticamente ($p > 0,05$); comparação entre o Grupo Controle e Infectado
 * $p < 0,05$; comparação entre grupo Infectado e Infectado e tratado com HP & $p < 0,05$.

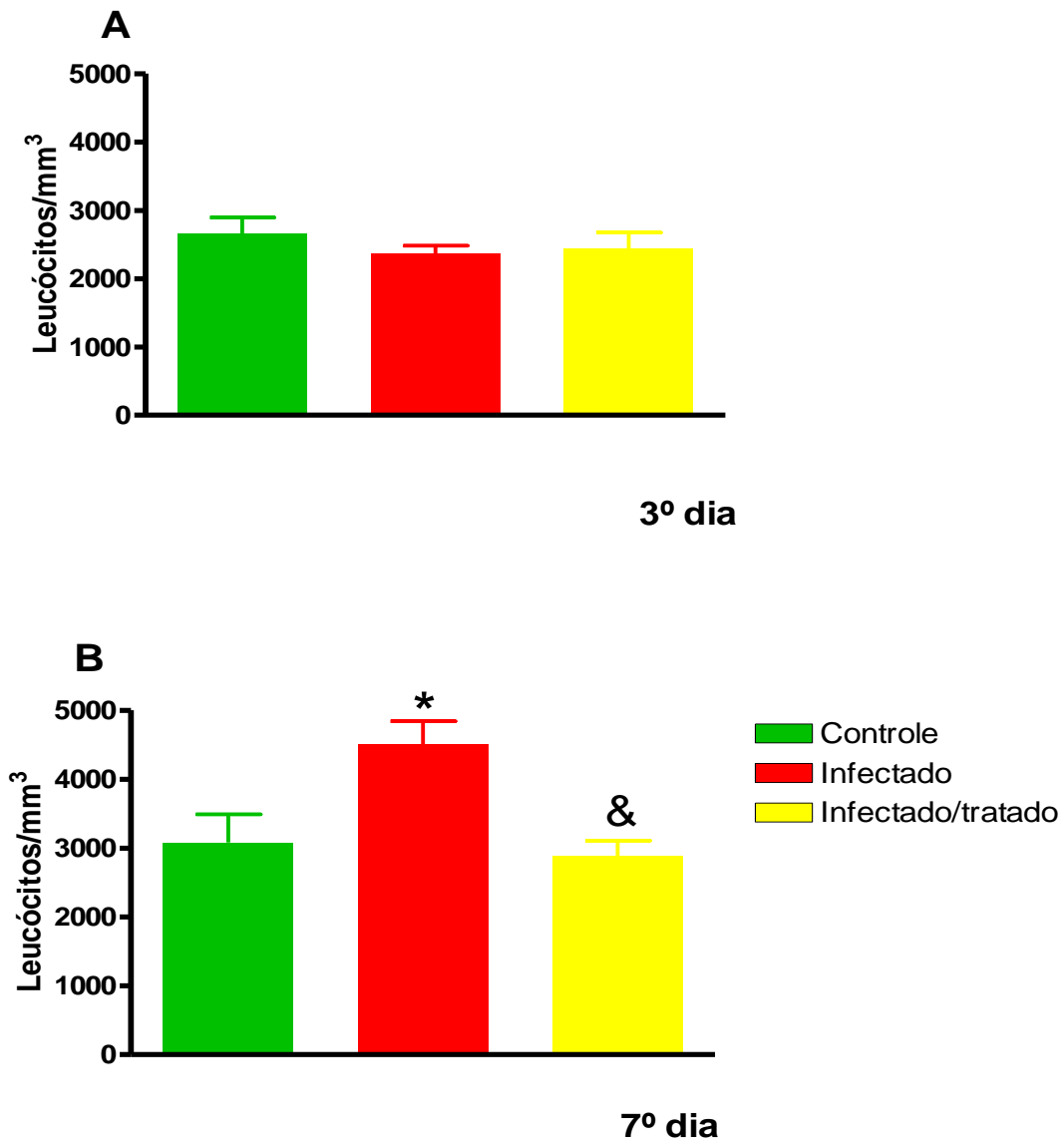


Figura 11. Contagem de Leucócitos totais no LPC no 3^o (A) e 7^o (B) dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076. Os dados representam a média \pm EPM (n = 10 animais) de 2 experimentos independentes. Comparação entre o Grupo Controle e Infectado * $p < 0,05$ e comparação entre grupo Infectado e Infectado e tratado com *H. procumbens* & $p < 0,05$ usando o teste não paramétrico, o PRISMA- (One-Way ANOVA- Newman-Keuls).

6.1.4 Contagem de Neutrófilos no sangue de camundongos infectados ou não por *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com *H. procumbens*, no 3º e 7º dia de infecção e tratamento

A figura 12A representa a contagem total de neutrófilos no sangue de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 3º dia de infecção e tratamento. Houve diferença significativa (onde $p < 0,05$) nos grupos CxSE (aumento do grupo SE em relação do C) Não houve diferença significativa (onde $p > 0,05$) entre os grupos SExSE+HP contagem total de neutrófilos no sangue (tabela 6).

A figura 12B representa a contagem total de neutrófilos no sangue de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 7º dia de infecção e tratamento. Houve diferença significativa (onde $p < 0,01$) entre os grupos CxSE (aumento do grupo SE em relação do C). Houve diferença significativa (onde $p < 0,05$) entre os grupos SExHP+HP (aumento do grupo SE em relação do SE+HP) (tabela 6).

Tabela 6 – Contagem de Neutrófilos no sangue no 3º e 7º dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella* Enteritidis ATCC13076

Grupos	3º dia	7º dia
	média dos valores/mm ³	média dos valores/ mm ³
Grupo controle	325,4 ± 69,18	380,2 ± 46,32
Grupo infectado e não tratado	1.023,4 ± 230,93 (*)	1.950,6 ± 421,08 (*)
Grupo infectado e tratado	553,4 ± 124,80 (ns)	839,6/mm ³ ± 119,91 (&)

ns: valor não significativo estatisticamente ($p > 0,05$); comparação entre o Grupo Controle e Infectado
 * $p < 0,05$; comparação entre grupo Infectado e Infectado e tratado com HP & $p < 0,05$.

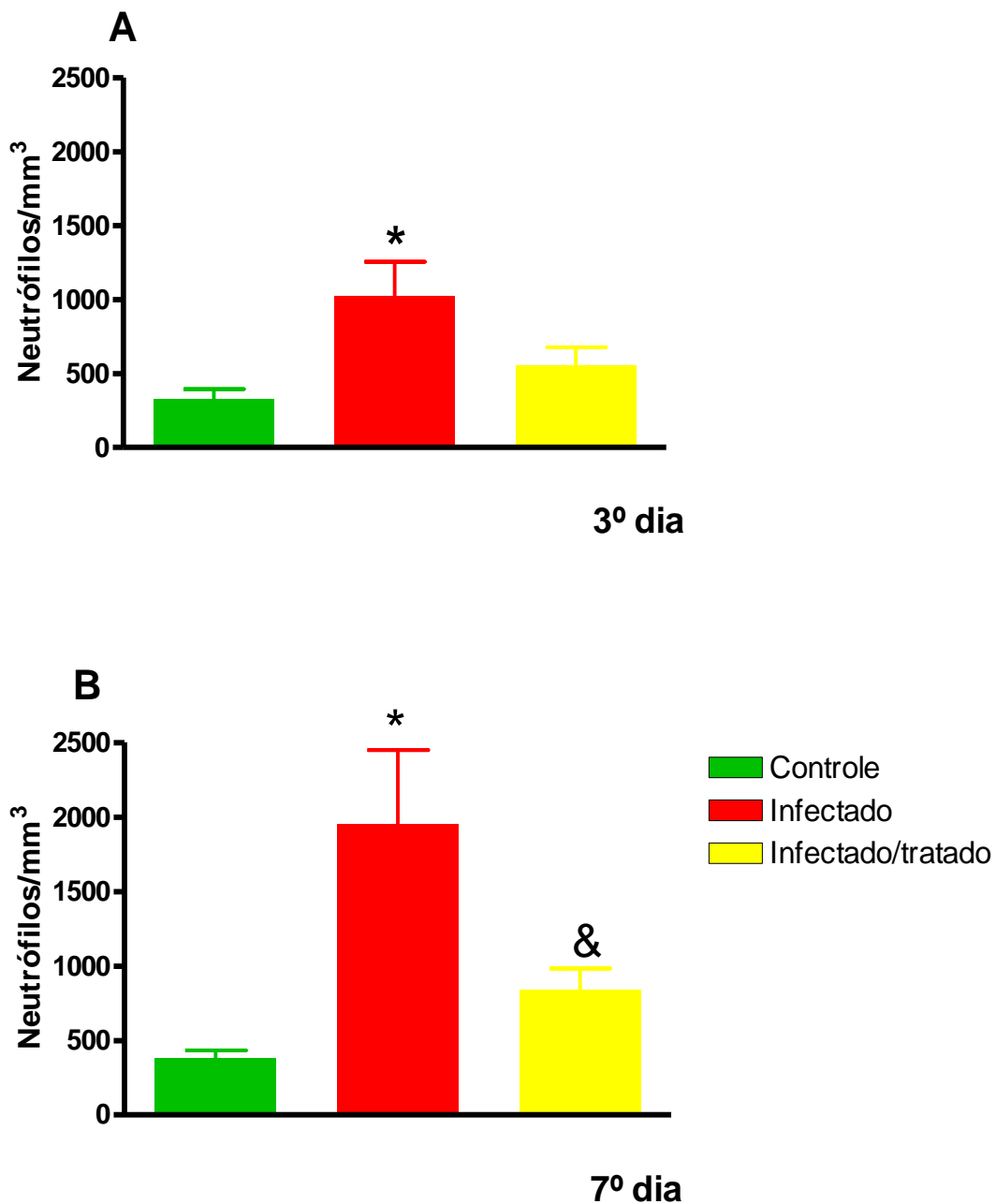


Figura 12. Contagem de Neutrófilos no sangue no 3º (A) e 7º (B) dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella Enteritidis* ATCC13076. Os dados representam a média \pm EPM (n = 10 animais) de 2 experimentos independentes. Comparação entre o Grupo Controle e Infectado * $p < 0,05$ e comparação entre grupo Infectado e Infectado e tratado com *H. procumbens* & $p < 0,05$, usando o teste não paramétrico, o PRISMA- (One-Way ANOVA- Newman-Keuls).

6.1.5 Contagem de Neutrófilos no LPC de camundongos infectados ou não por *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com *H. procumbens*, no 3º e 7º dia de infecção e tratamento

A Figura 13A representa a contagem de neutrófilos no LPC de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 3º dia de infecção e tratamento. Não houve diferença significativa (onde $p > 0,05$) entre os diferentes grupos experimentais (tabela 7).

A figura 13B representa a contagem de neutrófilos no LPC de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 7º dia de infecção e tratamento. Houve diferença significativa (onde $p < 0,05$) entre os grupos CxSE (aumento do grupo SE em relação do C) (tabela 7).

Tabela 7 – Contagem de Neutrófilos no LPC no 3º e 7º dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella* Enteritidis ATCC13076

Grupos	3º dia média dos valores/mm ³	7º dia média dos valores/ mm ³
Grupo controle	200 ± 16,08	230,6 ± 40,07
Grupo infectado e não tratado	446 ± 72,96 (ns)	446 ± 72,96 (ns)
Grupo infectado e tratado	353 ± 101,84 (ns)	354,80 ± 31,58 (ns)

ns: valor não significativo estatisticamente ($p > 0,05$).

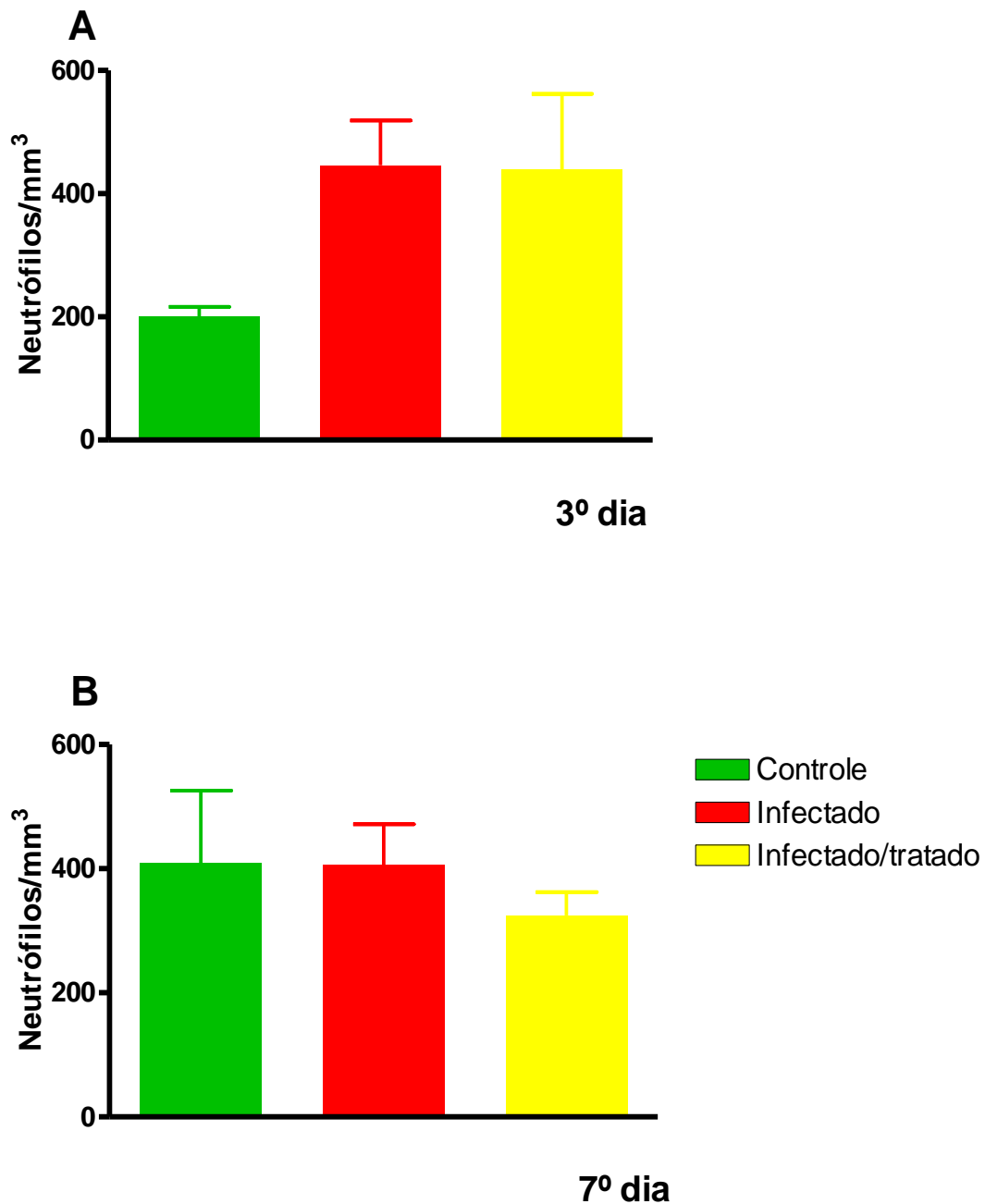


Figura 13. Contagem de Neutrófilos no LPC no 3^o (A) e 7^o (B) dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella* Enteritidis ATCC13076. Os dados representam a média \pm EPM (n = 10 animais) de 2 experimentos independentes. Comparação entre o Grupo Controle e Infectado * p < 0,05 comparação entre grupo Infectado e Infectado e tratado com *H. procumbens* usando o teste não paramétrico, o PRISMA- (One-Way ANOVA- Newman-Keuls).

6.1.6 Contagem de células mononucleares no sangue de camundongos infectados ou não por *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com *H. procumbens*, no 3º e 7º dia de infecção e tratamento

A figura 14A representa a contagem células mononucleares no sangue de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 3º dia de infecção e tratamento. Não foram observadas diferenças significativas na contagem de células mononucleares nos diferentes grupos experimentais no sangue no 3º e 7º dia. Não houve diferença significativa (onde $p > 0,05$) entre os diferentes grupos experimentais (tabela 8).

A figura 14B representa a contagem de células mononucleares no sangue de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 7º dia de infecção e tratamento. Houve diferença significativa (onde $p < 0,05$) entre os grupos CxSE (aumento do grupo SE em relação do C) (tabela 8).

Tabela 8 – Contagem de Células mononucleares no sangue no 3º e 7º dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella* Enteritidis ATCC13076

Grupos	3º dia	7º dia
	média dos valores/mm ³	média dos valores/ mm ³
Grupo controle	7.709 ± 999,60	5.640,4/mm ³ ± 410,98
Grupo infectado e não tratado	8.536,6 ± 714,85 (ns)	8.026,2 ± 618,71 (*)
Grupo infectado e tratado	8.126,6 ± 1057,76 (ns)	7.815,2 ± 532,02 (ns)

ns: valor não significativo estatisticamente ($p > 0,05$); comparação entre o Grupo Controle e Infectado
* $p < 0,05$.

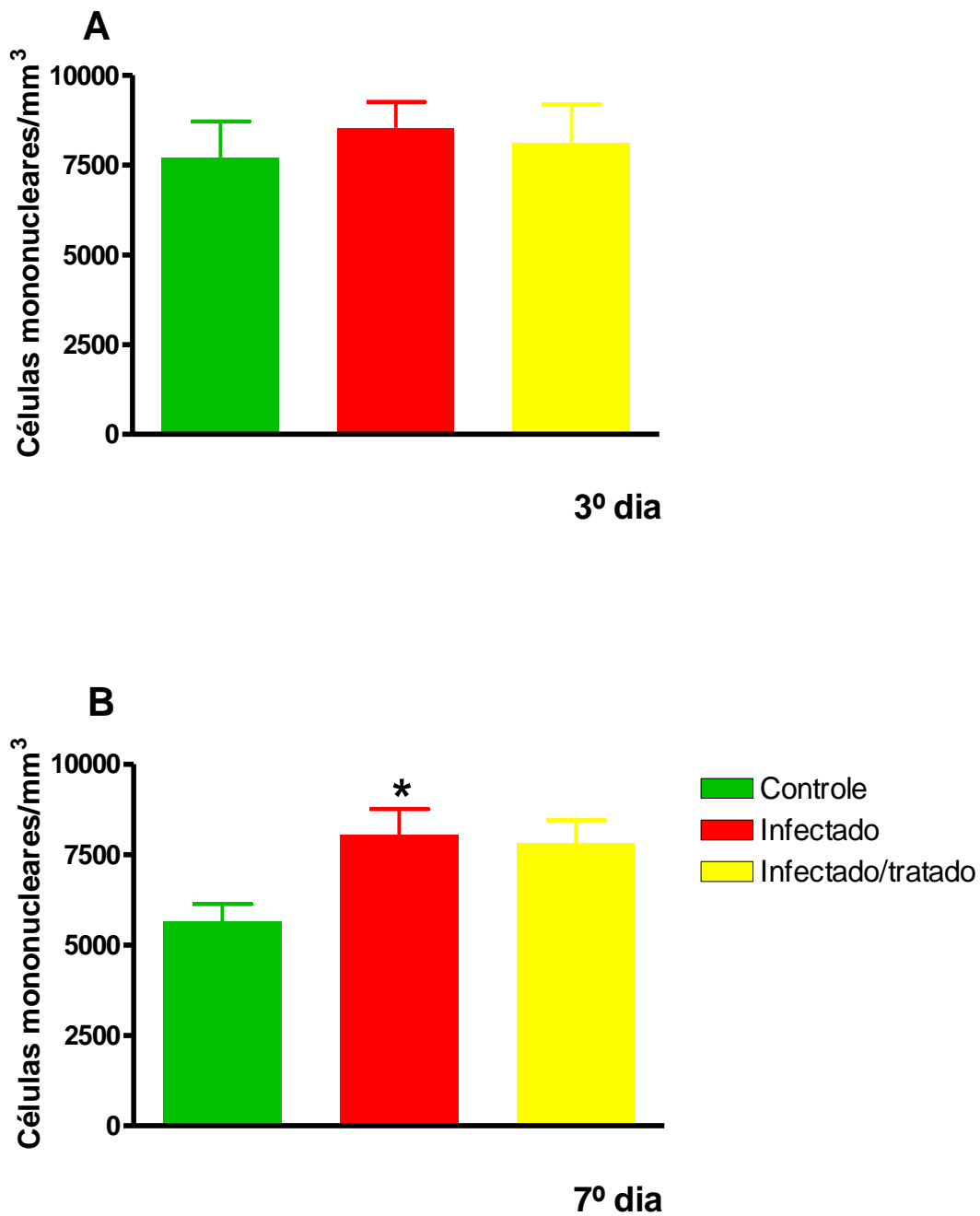


Figura 14. Contagem de Células mononucleares no sangue no 3º (A) e 7º (B) dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella Enteritidis* ATCC13076. Os dados representam a média \pm EPM (n = 10 animais) de 2 experimentos independentes. Comparação entre o Grupo Controle e Infectado * $p < 0,05$ e comparação entre grupo Infectado e Infectado e tratado com *H. procumbens* & $p < 0,05$ usando o teste não paramétrico, o PRISMA- (One-Way ANOVA- Newman-Keuls).

6.1.7 Contagem de células mononucleares no LPC de camundongos infectados ou não por *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com *H. procumbens*, no 3º e 7º dia de infecção e tratamento

A figura 15A representa a contagem de células mononucleares no LPC de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 3º dia de infecção e tratamento. Não foram observadas diferenças significativas (onde $p > 0,05$) na contagem de células mononucleares nos diferentes grupos experimentais (tabela 9).

A figura 15B representa a contagem de células mononucleares no LPC de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 7º dia de infecção e tratamento. Houve diferença significativa (onde $p < 0,05$) entre os grupos CxSE (aumento do grupo SE em relação do C). Houve diferença significativa (onde $p < 0,05$) entre os grupos SExHP+SE (aumento do grupo SE em relação do HP+SE) (tabela 9).

Tabela 9 – Contagem de células mononucleares no sangue no 3º e 7º dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella* Enteritidis ATCC13076

Grupos	3º dia	7º dia
	média dos valores/mm ³	média dos valores/ mm ³
Grupo controle	2.460 ± 224,94	2.666,8 ± 254,02
Grupo infectado e não tratado	1.924 ± 152,12 (ns)	4.093,8 ± 234,74 (*)
Grupo infectado e tratado	2001 ± 119,43 (ns)	2.555,2 ± 197,39 (ns)

ns: valor não significativo estatisticamente($p > 0,05$); comparação entre o Grupo Controle e Infectado * $p < 0,05$.

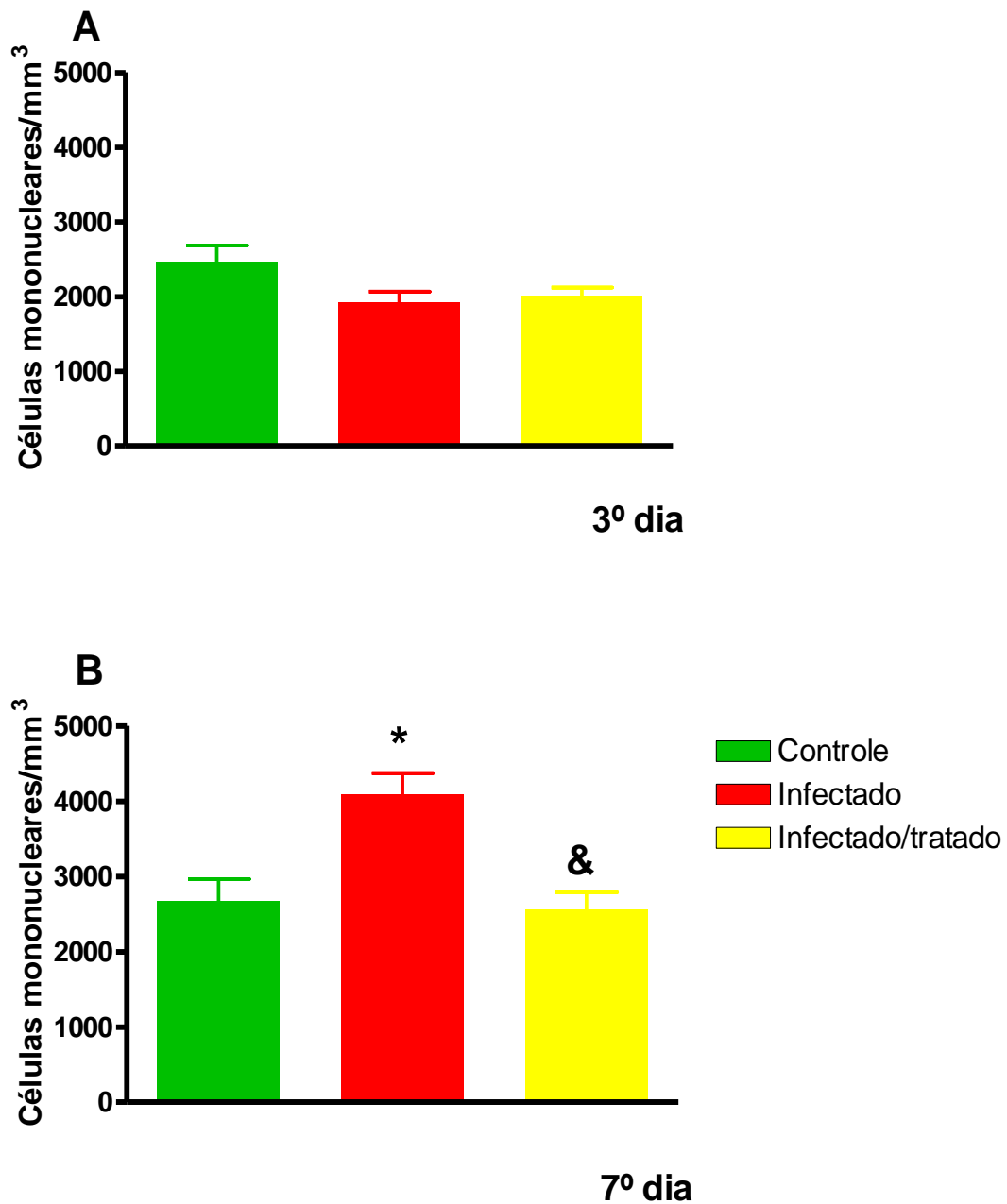


Figura 15. Contagem de Células mononucleares no LPC no 3º (A) e 7º (B) dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella Enteritidis* ATCC13076. Os dados representam a média \pm EPM (n = 10 animais) de 2 experimentos independentes. Comparação entre o Grupo Controle e Infectado * p < 0,05 e comparação entre grupo Infectado e Infectado e tratado com *H. procumbens* & p < 0,05, usando o teste não paramétrico, o PRISMA- (One-Way ANOVA- Newman-Keuls).

6.2 Hemocultura

Os resultados obtidos da hemocultura nos diferentes grupos de camundongos infectados ou não com de *S. Enteritidis* ATCC 13076, tratados ou não com extrato etanólico da *H. procumbens*, não apresentaram crescimento.

6.3 Quantificação de citocinas no plasma durante a infecção por *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 após o tratamento com *H. procumbens*

6.3.1 Quantificação de TNF- α no plasma de camundongos infectados ou não por *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com *H. procumbens*, no 3º e 7º dia de infecção e tratamento

A figura 16A representa a quantificação de TNF- α no plasma de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 3º dia de infecção e tratamento. A figura 16B representa a quantificação de TNF- α no plasma de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 7º dia de infecção e tratamento. Não houve diferenças significativas na quantificação de TNF- α nos diferentes grupos experimentais no 3º dia e 7º dia (tabela 10).

Tabela 10 – Quantificação da citocina TNF- α no plasma no 3º e 7º dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella* Enteritidis ATCC13076

Grupos	3º dia	7º dia
	média dos valores pg/mL	média dos valores pg/mL
Grupo controle	9,77 \pm 1,57	9,52 \pm 0,33
Grupo infectado e não tratado	9,94 \pm 0,60 (ns)	16,26 \pm 4,08 (ns)
Grupo infectado e tratado	15,34 \pm 2,71 (ns)	11,55 \pm 1,03 (ns)

ns: valor não significativo estatisticamente ($p > 0,05$).

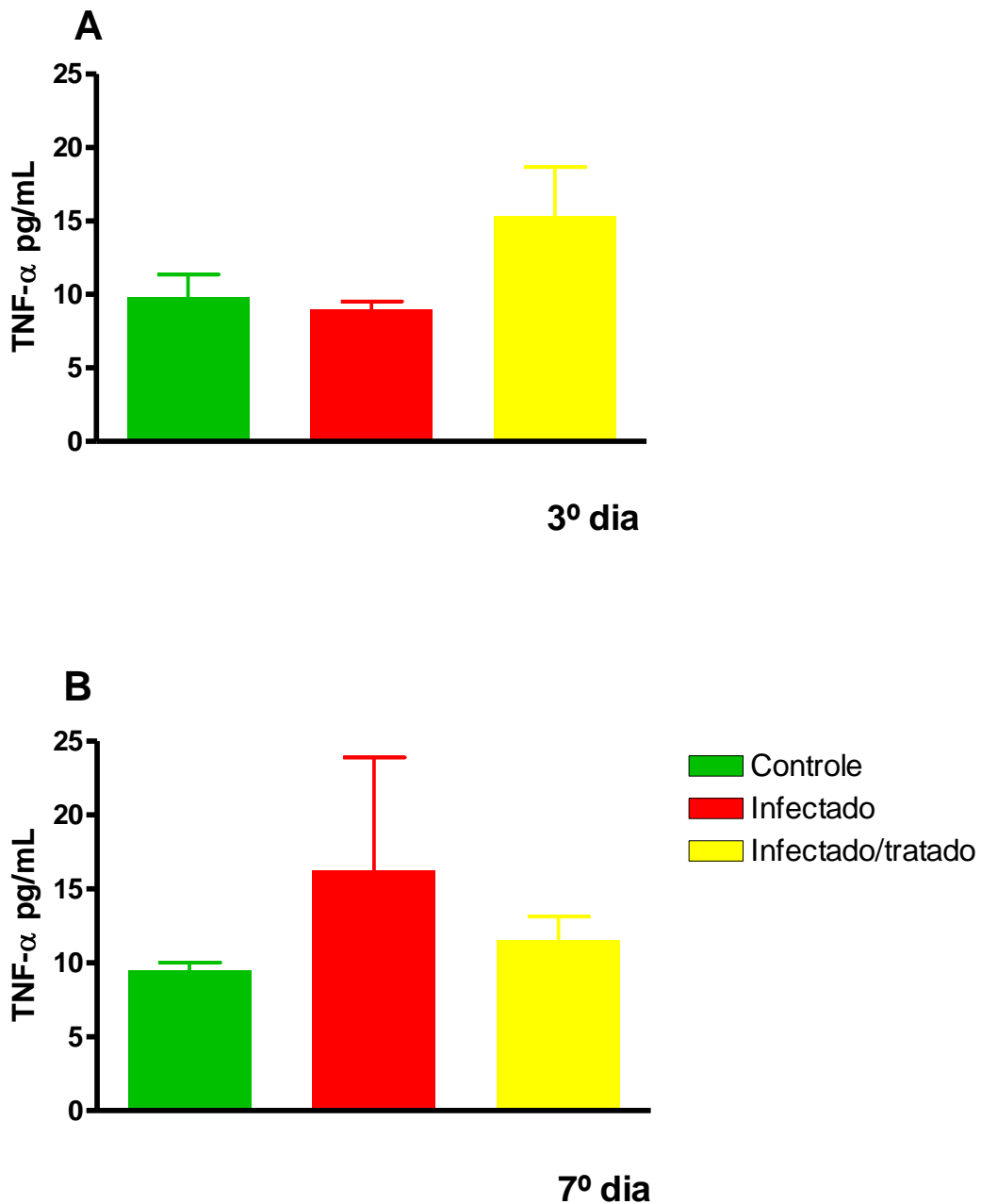


Figura 16. Quantificação da citocina TNF- α no plasma no 3^o (A) e 7^o (B) dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella* Enteritidis ATCC13076. Os dados representam a média \pm EPM (n = 10 animais) de 2 experimentos independentes. Comparação entre o Grupo Controle e Infectado * p < 0,05 e comparação entre grupo Infectado e Infectado e tratado com *H. procumbens* & p < 0,05 usando o teste não paramétrico, o PRISMA- (One-Way ANOVA- Newman-Keuls).

6.3.2 Quantificação de IL-12 no plasma de camundongos infectados ou não por *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com *H. procumbens*, no 3º e 7º dia de infecção e tratamento

A figura 17A representa a quantificação de IL-12 no plasma de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 3º dia de infecção e tratamento. Não houve diferenças significativas (onde $p > 0,05$) na quantificação de IL-12 nos diferentes grupos experimentais no 3º dia (tabela 11).

A figura 17B representa a quantificação de IL-12 no plasma de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 7º dia de infecção e tratamento. Houve diferença significativa (onde $p < 0,05$) entre os grupos CxSE (aumento do grupo SE em relação do C). Houve diferença significativa (onde $p < 0,05$) entre os grupos SExHP+SE (aumento do grupo SE em relação do HP+SE) (tabela 11).

Tabela 11 – Quantificação da IL-12 no plasma no 3º e 7º dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella* Enteritidis ATCC13076

Grupos	3º dia	7º dia
	média dos valores pg/mL	média dos valores pg/mL
Grupo controle	41,54 ± 1,46	47,86 ± 1,75
Grupo infectado e não tratado	47,87 ± 9.86 (ns)	80,27 ± 0,14 (*)
Grupo infectado e tratado	71,54 ± 9,50 (ns)	64,85 ± 3,32 (&)

ns: valor não significativo estatisticamente ($p > 0,05$); comparação entre o Grupo Controle e Infectado * $p < 0,05$; comparação entre grupo Infectado e Infectado e tratado com *H. procumbens* & $p < 0,05$.

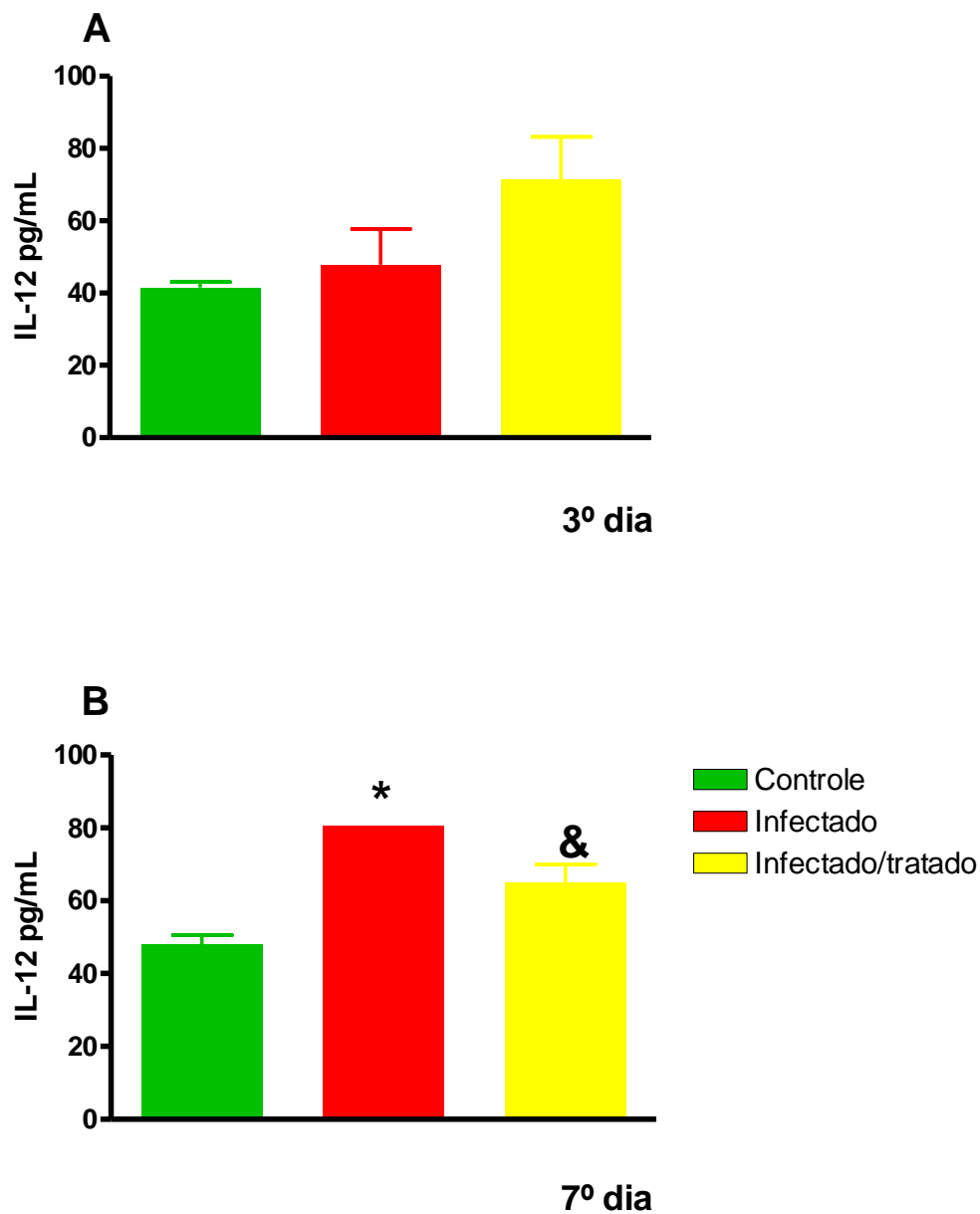


Figura 17. Quantificação da citocina IL-12 no plasma no 3º (A) e 7º (B) dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella Enteritidis* ATCC13076. Os dados representam a média \pm EPM (n = 10 animais) de 2 experimentos independentes. Comparação entre o Grupo Controle e Infetado * p < 0,05 e comparação entre grupo Infetado e Infetado e tratado com *H. procumbens* & p < 0,05, usando o teste não paramétrico, o PRISMA- (One-Way ANOVA- Newman-Keuls).

6.3.3 Quantificação de IL-4 no plasma de camundongos infectados ou não por *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com *H. procumbens*, no 3º e 7º dia de infecção e tratamento

A figura 18A representa a quantificação de IL-4 no plasma de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 3º dia de infecção e tratamento. Houve diferença significativa (onde $p < 0,05$) entre os grupos SE+HP+SE (aumento do grupo SE+HP em relação do SE) (tabela 12).

A figura 18B representa a quantificação de IL-4 no plasma de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 7º dia de infecção e tratamento. Não houve diferenças significativas (onde $p > 0,05$) na quantificação de IL-4 nos diferentes grupos experimentais no 7º dia (tabela 12).

Tabela 12 – Quantificação da IL-4 no plasma no 3º e 7º dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella* Enteritidis ATCC13076.

Grupos	3º dia	7º dia
	média dos valores pg/mL	média dos valores pg/mL
Grupo controle	3,60 ± 0,31	4,47 ± 0,34
Grupo infectado e não tratado	3,27 ± 0,01 (ns)	4,47 ± 0,34 (ns)
Grupo infectado e tratado	16,98/ ± 4,15 (&)	12,04 ± 5,90 (ns)

ns: valor não significativo estatisticamente ($p > 0,05$); comparação entre grupo Infectado e Infectado e tratado com HP & $p < 0,05$.

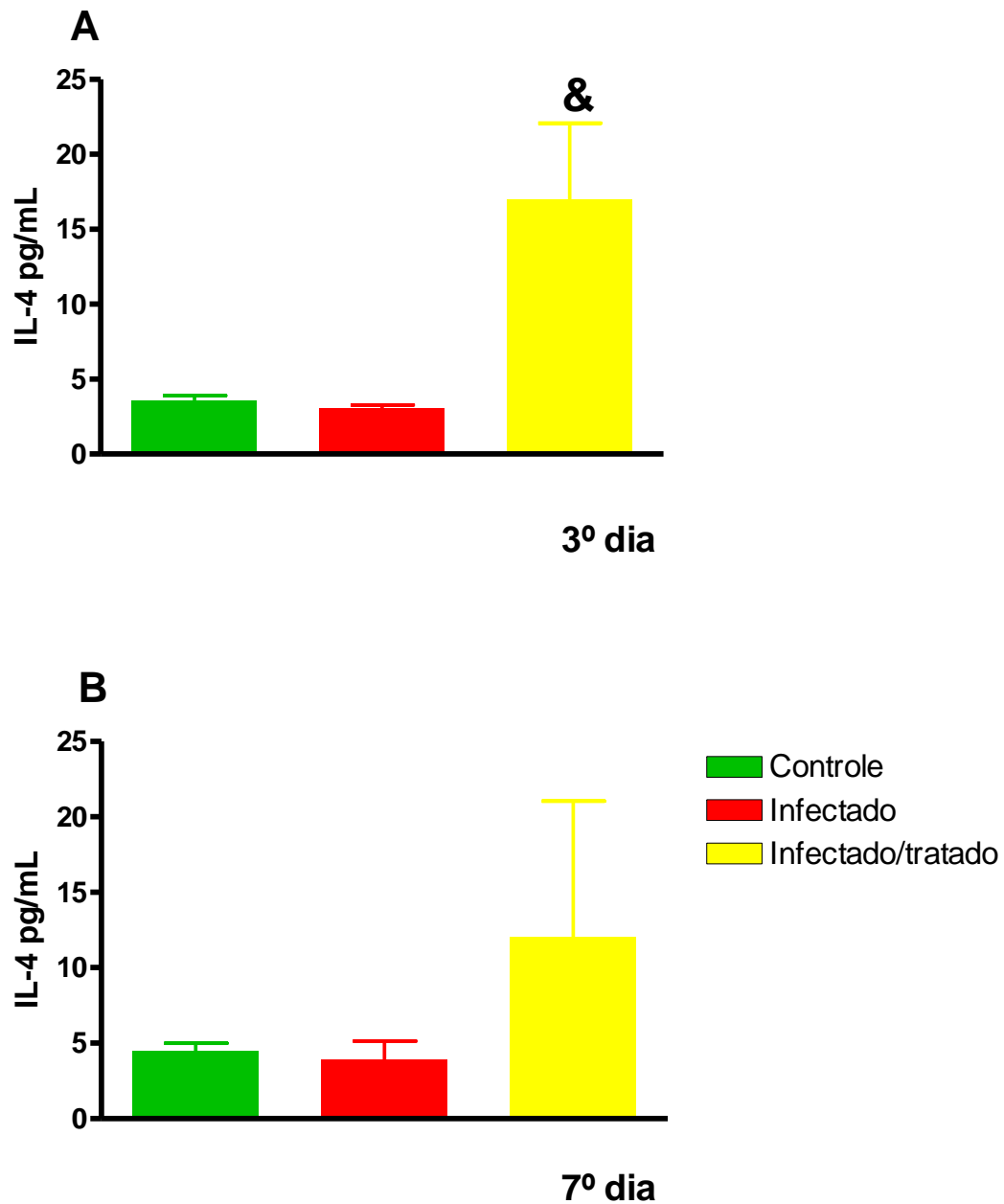


Figura 18. Quantificação da citocina IL-4 no plasma no 3º (A) e 7º (B) dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella* Enteritidis ATCC13076. Os dados representam a média \pm EPM (n = 10 animais) de 2 experimentos independentes. Comparação entre grupo Infectado e Infectado e tratado com *H. procumbens* [&] p < 0,05 usando o teste não paramétrico, o PRISMA- (One-Way ANOVA- Newman-Keuls).

6.3.4 Quantificação de IL-10 no plasma de camundongos infectados ou não por *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com *H. procumbens*, no 3º e 7º dia de infecção e tratamento

A figura 19A representa a quantificação de IL-10 no plasma de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 3º dia de infecção e tratamento. A figura 19B representa a quantificação de IL-10 no plasma de camundongos dos grupos C, SE, SE+HP no 7º dia de infecção e tratamento. Não houve diferença significativa (onde $p > 0,05$) na quantificação de IL-10 nos diferentes grupos experimentais no 3º e 7º dia (tabela 13).

Tabela 13 – Quantificação da IL-10 no plasma no 3º e 7º dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella* Enteritidis ATCC13076.

Grupos	3º dia	7º dia
	média dos valores pg/mL	média dos valores pg/mL
Grupo controle	59,00 ± 2,27	54,00 ± 4,30
Grupo infectado e não tratado	78,20 ± 8,80 (ns)	90,34 ± 21,00 (ns)
Grupo infectado e tratado	53,95 ± 4,30 (ns)	46,14 ± 2,63 (ns)

ns: valor não significativo estatisticamente ($p > 0,05$).

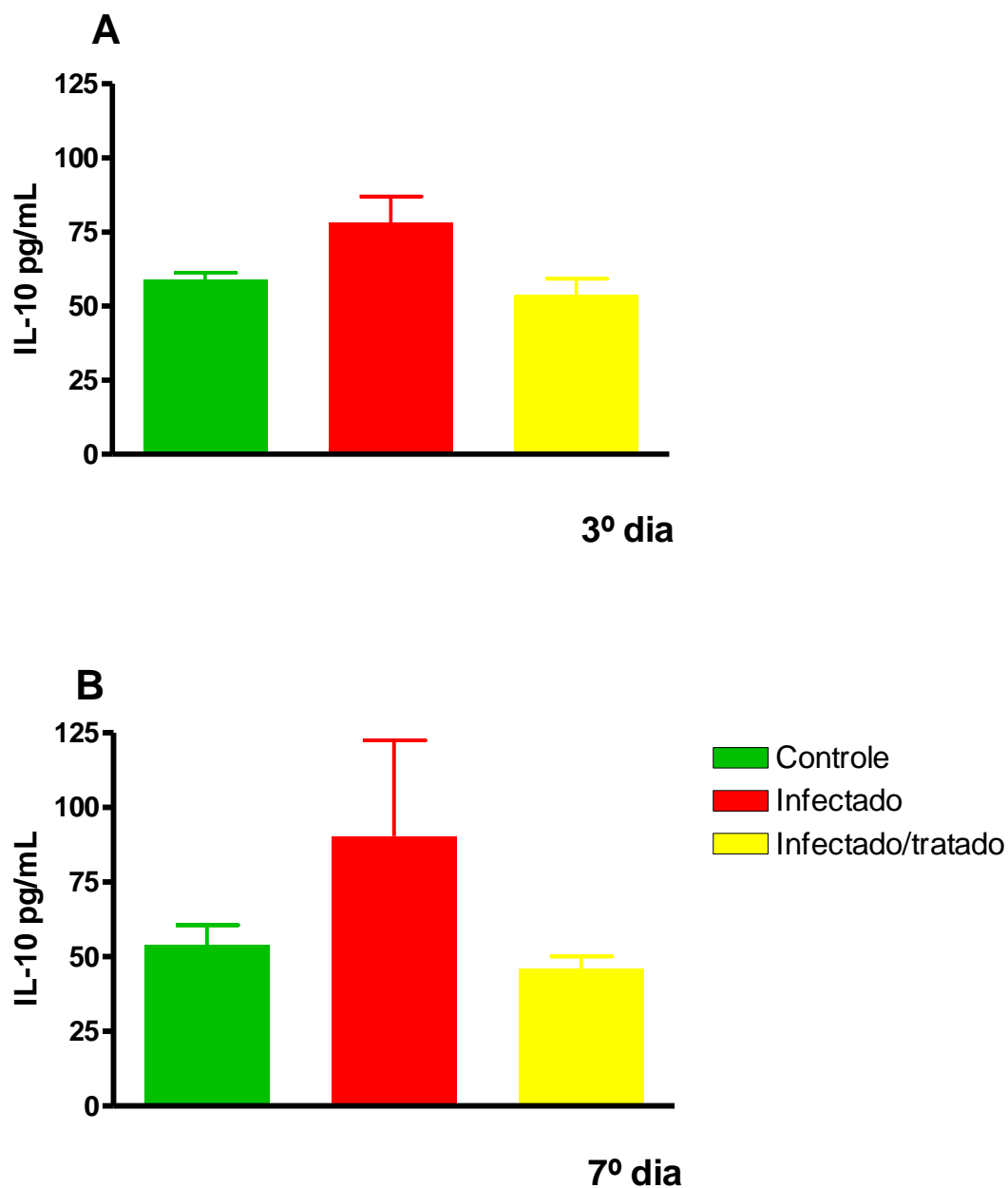


Figura 19. Quantificação da citocina IL-10 no plasma no 3º (A) e 7º (B) dia de tratamento com *H. procumbens* e após a infecção com *Salmonella* Enteritidis ATCC13076. Os dados representam a média \pm EPM (n = 10 animais) de 2 experimentos independentes. Comparação entre o Grupo Controle e Infetado * $p < 0,05$ e comparação entre grupo Infetado e Infetado e tratado com *H. procumbens* & $p < 0$, usando o teste não paramétrico, o PRISMA- (One-Way ANOVA- Newman-Keuls).

6.4 Anatomopatológico - Análise histopatológica do fígado e intestino desde camundongos infectados ou não por *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com *H. procumbens*

6.4.1 Análise histopatológica do fígado de camundongos infectados ou não por *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com *H. procumbens*

Os resultados da análise histopatológica do fígado de camundongos do grupo controle e infectados por *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com *H. procumbens* não apresentaram alterações e a estrutura hepática apresenta padrão arquitetural preservado, exibem os lóbulos bem definidos com vênula hepática terminal (veia central: seta branca) proeminente. A Figura 20 mostra os resultados da análise no 3º e 7º dias de infecção.

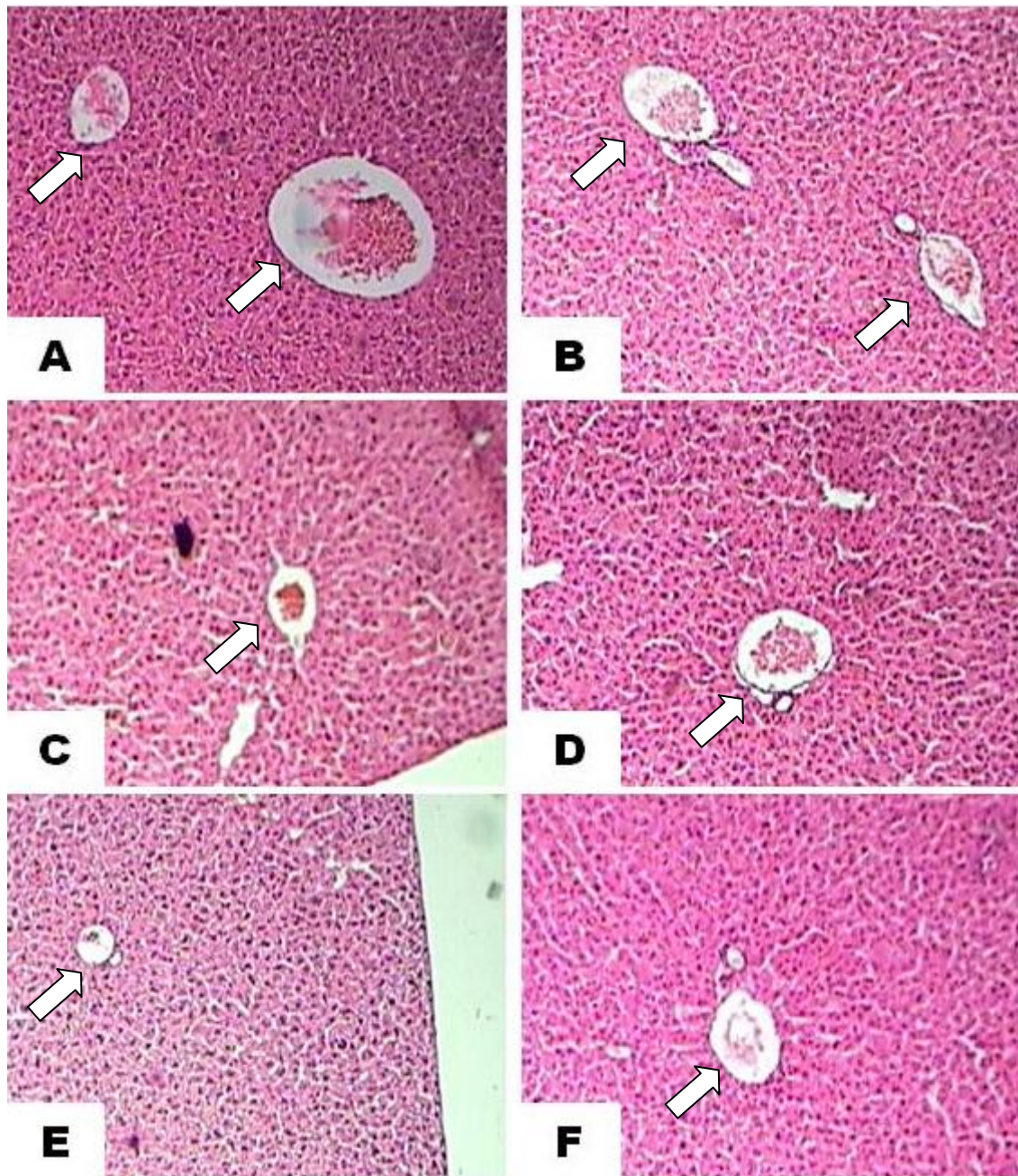


Figura 20. Fotomicrografia do parênquima do fígado de camundongo infectado ou não por *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076 tratado ou não com o extrato etanólico da *H. procumbens*. Fígado de camundongo controle - 3º dia de infecção (A); Fígado de camundongo controle 7º dia infecção (B); Fígado de camundongo infectado e sem tratamento - 3º dia de infecção (C); Fígado de camundongo infectado e tratado - 3º dia de infecção (D); Fígado de camundongo infectado e sem tratamento - 7º dia de infecção (E); Fígado de camundongos infectado e tratado - 7º dia de infecção (F). Coloração HE. Aumento: 40 X. Corte na região central do fígado. Seta branca: Vênula Hepática Terminal (Veia Central).

6.4.2 Análise histopatológica do intestino delgado de camundongos infectados ou não por *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 tratados ou não com *H. procumbens*

Os resultados da análise histopatológica do intestino delgado de camundongos do grupo controle não apresentaram alterações no epitélio cilíndrico simples, lâmina própria (tecido conjuntivo frouxo) e túnica muscular. Na figura 21E, percebemos no epitélio cilíndrico um simples enrugamento deste epitélio sugerindo a invasão da *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 (seta amarela), com hipertrofia da parede das vilosidades (seta azul) e discreto infiltrado inflamatório (seta rosa). Na figura 21F, observamos uma redução da hipertrofia das vilosidades com preservação da arquitetura intestinal (seta branca), embora ainda seja observado discreto infiltrado de células inflamatórias (seta verde).

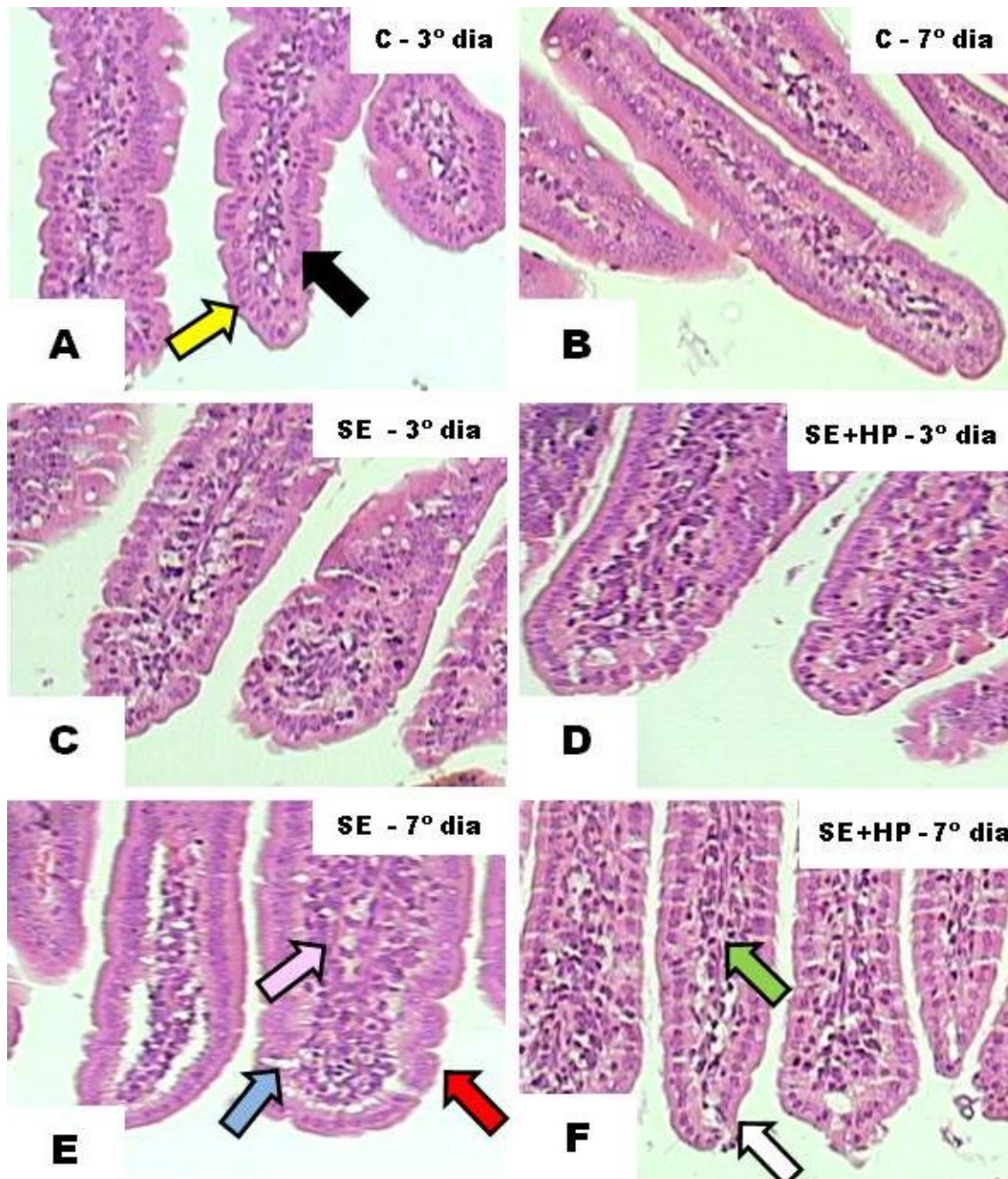


Figura 21. Fotomicrografia do epitélio do intestino delgado de camundongo infectado ou não por *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076 tratado ou não com o extrato etanólico da *H. procumbens*. Intestino delgado de camundongo controle - 3º dia de infecção (A); Intestino delgado de camundongo controle 7º dia infecção (B); Intestino delgado de camundongo infectado e sem tratamento - 3º dia de infecção (C); Intestino delgado de camundongo infectado e tratado - 3º dia de infecção (D); Intestino delgado de camundongo infectado e sem tratamento - 7º dia de infecção (E); Intestino delgado de camundongos infectado e tratado - 7º dia de infecção (F). Coloração HE. Aumento: 100 X. Corte transversal do intestino delgado. Seta preta: epitélio cilíndrico simples; seta amarela: lâmina própria. Seta vermelha: simples enrugamento deste epitélio sugerindo a invasão bacteriana. Seta azul: com hipertrofia da parede das vilosidades. Seta rosa: discreto infiltrado inflamatório. Seta branca: redução da hipertrofia das vilosidades com preservação da arquitetura intestinal. Seta verde: discreto infiltrado de células inflamatórias.

7. DISCUSSÃO

Estudos mostram a importância de buscar novos compostos que possam ser utilizados no tratamento de diversas doenças. E a grande diversidade da flora do planeta coloca disponível uma riqueza de plantas que possam contribuir com a descoberta de novos compostos que apresente atividade antimicrobiana e/ou anti-inflamatória (Ostrosky *et al.*, 2008). Segundo Weckesser *et al.* (2007), durante a triagem de extratos vegetais com atividade antimicrobiana e antileveduras, o extrato da *H. procumbens* inibiu o crescimento de bactérias (como por ex. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586), e *Candida krusei*. Para avaliar o perfil inflamatório frente à infecção causada por bactérias Gram-negativas, alguns pesquisadores utilizam o estímulo inicial com LPS, um potente indutor de mediadores inflamatórios.

Conforme Lehner *et al.* (2000), o LPS é um potente estimulador da hematopoiese. A administração de LPS e ou derivados está associada com a produção de vários fatores entre eles o aumento do total de número de leucócitos circulantes, neutrofilia e números aumentados de precursores monócitos/macrófagos na medula óssea. Estudos realizados por Nicholas & McColl (2010), provocaram uma bolsa de ar estéril no dorso de camundongos e examinou o exsudato celular no tempo 0, 2 e 4 h após a injeção com bactérias *S. Enteritidis*. Depois de 2 e 4 horas no compartimento induzido a *S. enteritidis* induziu aumento significativo de leucócitos. Em comparação exibiu um perfil com números crescentes de neutrófilos após análise de diferenciação celular e 4 h após, ocorreu uma mudança na composição da população do infiltrando com uma tendência geral para maior porcentagem de neutrófilos na cavidade bolsa (80%). Nossos resultados demonstraram aumento de leucócitos totais no sangue e no LPC no 7º dia de infecção no grupo infectado e não tratado (Fig. 10B e 11B respectivamente). Além deste aumento, também foi observado aumento de neutrófilos no sangue no 3º e 7º dia após infecção e sem tratamento (Fig. 12B e 12B respectivamente). Estes dados corroboram com Nicholas & McColl (2010), que independentem do período e modelo experimental, a presença de *S. Enteritidis* em

diferentes tecidos é um forte estímulo para aumentar o recrutamento de células inflamatórias, principalmente neutrófilos (Fig. 12A e 12B).

Para Cheminay *et al.* (2004), em geral os neutrófilos não são considerados efetivos no processo de controle de patógenos intracelular. No entanto, o papel dos neutrófilos na salmonelose em camundongos é ainda controverso. Estudos demonstram que neutrófilos contribuem para controle da infecção, mas não devem ser considerados como parâmetros para prevenção de infecção sistêmica. Loetscher *et al.* (2012) mostraram que o tempo de vida limitado dos neutrófilos no lúmen do intestino deve ser suficientemente para a captação (e possivelmente a eliminação) de bactérias localizadas na superfície da mucosa, tal como demonstrado pela fagocitose da *S. typhimurium*. Possivelmente pelo baixo *turn over* de granulócitos especialmente na drenagem linfática da mucosa intestinal, o que explica a ausência de diferença significativa dos neutrófilos no LPC no 3º e 7º dia do grupo infectado e não tratado (Fig. 13A e 13B).

Segundo Inaba *et al.* (2010) a administração oral do extrato etanólico de *H. procumbens* em camundongos mostrou-se um potente inibidor de atividade a IL-1 β , IL-6 e TNF- α produzidas por macrófagos. O harpagoside inibiu a produção de citocinas inflamatórias, sem citotoxicidade a uma concentração de 200 μ M.

Segundo Bowman *et al.* (2004) estudos tem sido sugerido que a relação de IL-12 com PGE2 é o fator limitante na iniciação da produção de IFN- γ e comprometimento com a linhagem celular do tipo Th1. Além disso, foi demonstrado que a PGE2 inibe a secreção de IL-12 em monócitos humanos e células dendríticas derivadas de medula óssea e que induz seletivamente a IL-12. A infecção das células epiteliais intestinais humanas por *Salmonella* é acompanhada por liberação de PGE2. O aumento na expressão de COX-2 e subsequente acumulação de PGE2 que são estimuladas pela *Salmonella*. A relação entre células mononucleares e IL-12 durante a infecção por *Salmonella* traz contribuições para compreensão dos estímulos inflamatórios envolvidos nesse modelo. Em nosso modelo de infecção intestinal por *S. Enteritides*, o número de células mononucleares no sangue e LPC aumentou no 7º dia pós infecção (Fig. 14B e 15B), e esses dados são concomitantes com o aumento da IL-12 no 7º dia (Fig. 17B), corroborando com os resultados obtidos por Bowman *et al.* (2004).

Segundo Huang *et al.* (2005) supressão da síntese de proteínas inflamatórias pelo harpagosideo (COX-2 e iNOS) e possivelmente outras proteínas da inflamação,

bloqueia a produção de mediadores tais como PGE2, e poderia explicar pelo menos em parte, a eficácia do extrato da *H. procumbens*, usada clinicamente no tratamento da dor e para as condições inflamatórias, tais como artrite reumatóide e osteoartrite.

Para Mizuno *et al.* (2003) a IL-12 e IL-18, com mútuo complexo de interações, parecem estar envolvidas na ativação de células T, resultando na produção de IFN- γ em infecção por *Salmonella* em humanos. Segundo Rydström (2007), Yrlid *et al.* (2000) e Eckman *et al.* (2001) IL-12 e IL-18 são produzidas pelas células dendríticas e macrófagos / monócitos após ativação, e a sua principal função é induzir e aumentar a produção de IFN- γ . Além disso, IL-12 desempenha um papel crucial na estimulação da resposta Th1 da imunidade mediada por células contra micro-organismos intracelulares. Em nossa pesquisa, observamos aumento de IL-12 do 3º dia (Fig. 17A) e no 7º dia (Fig. 17B) nos animais do grupo infectado. Ainda, no 7º dia de infecção houve um aumento de IL-12 no grupo infectado e não tratado (Fig. 17B). Além disso, nossos resultados demonstraram que, animais infectados com *S. Enteritidis* e tratados com *H. procumbens* tiveram diminuição significativa de neutrófilos (Fig.10B) e células mononucleares (Fig. 14B e 15B). E o tratamento parece ter modular negativamente a produção de IL-12 (Fig. 17B) nesses animais, sugerindo um efeito controverso no controle da atividade imunológica nesse modelo.

Mitrücker & Kaufmanna (2000) demonstram que a infecção de camundongos por *Salmonella* induz uma resposta Th1, caracteriza uma produção de grandes quantidades de IFN- γ . No entanto, há relatos que indiquem que sob certas condições de infecção com *Salmonella* atenuada podem induzir resposta Th2, caracterizada pela produção de IL-4 e aumento dos níveis séricos de IgE, de forma controversa. As citocinas IL-4 e IL-10 têm sido estudadas em infecção por *Salmonella*, a qual é produzida por uma variedade de células, incluindo células T, e é capaz de regular tanto a produção de citocinas e como ativação de macrófagos. De acordo com Mastroeni (2002), a IL4 é produzida por células NK na fase precoce da doença. E a ausência de IL4 confere maior resistência à infecção por *Salmonella*, conforme indicado pelo atraso na morte e a formação reduzida de abscessos, em camundongos IL4 -/- (*knockout*) em comparação com os IL4 +/- infectados com *Salmonella*. Além disso, as funções dos macrófagos e a produção de IL-12 são reforçadas na seqüência pela neutralização da IL-4 por anticorpo específico. Em nosso estudo, a produção de IL-4 apresentou aumento

nos animais tratados com *H. procumbens* (Fig. 18A) sugerindo que, animais infectados por *S. Enteritidis* e tratados com *H. procumbens* parece favorecer um microambiente que direcione o perfil da resposta imune de Th1 para Th2, visto que a IL-12 apresentou diminuição nesses mesmos animais (Fig. 17B).

Pie *et al.* (1996) relaciona que o IFN- γ está envolvido na ativação da atividade bactericida de macrófagos, e a IL-10 tem efeitos regulatórios importantes sobre as respostas imunitárias e inflamatórias, sendo predominantemente mediada por macrófagos. IL-10 inibe TNF- α e IL-12 por macrófagos e apresenta efeito estimulador sobre a produção de IFN- γ por células NK.

Segundo Bermudez *et al.* (1993), Reed *et al.* (1994) e Wagner (1994) a IL-10 endógena pode diminuir a resistência à infecção. E outros autores demonstraram em seres humanos que a IL-10 aumentou os níveis séricos durante a septicemia e a meningite diagnosticada nestes indivíduos (MAESTROENI *et al.*, 1992; LEHMANN *et al.*, 1995). Estes resultados são consistentes com relatos obtidos com outras infecções bacterianas em modelos experimentais como o de Bohn *et al.* (1994) com *Yersinia enterocolitica* e Ehlers *et al.* (1992) com *Listeria monocytogenes*. Segundo Pio *et al.* (1996) alguns estudos correlacionam essa variação na produção de citocinas com a gravidade da infecção e parece ser uma consequência, em vez de ser a causa da susceptibilidade à infecção por *S. typhimurium*. Assim, foi sugerido que a IL-10 não está envolvida na proteção, mas reflete a gravidade da doença. Níveis de IL-10 sérica foram maiores em pacientes com choque séptico do que naqueles sem choque séptico. Estes autores sugerem que a produção de IL-10 correlaciona com a gravidade da doença. Nossos resultados demonstraram que, embora não houvesse diferença significativa estatisticamente, foi observada diminuição nos níveis de IL-10 nos animais infectados e tratados (Fig. 19B). Esses dados corroboram com a literatura onde IL-10 parece estar relacionada com a gravidade da salmonelose. Dessa forma, em nossos resultados observamos diminuição de IL-10 nos animais infectados com *S. Enteritidis* e tratados com *H. procumbens* (Fig. 19), que embora não seja significativa esta diferença, apresenta um efeito biológico na contenção do processo inflamatório nas vilosidades intestinais demonstrado no histopatológico do intestino desses animais (Fig. 21F).

Sabe-se para que *Salmonella* apresenta genes associados à virulência que são responsáveis pela infecção local (mucosa intestinal), ou seja, os primeiros estágios da

infecção SPI 1 e que atuam na infecção sistêmica SPI 2 (GALLAN & COLLMER, 1999; HENSEL, 2000; WALLIS & GALLOW, 2000; HANSEN-WESTER & HENSEL, 2001; HENSEL, 2004). Com o resultado de hemocultura negativa para todos os grupos acreditamos não houve invasão do fígado, e que provavelmente a *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 não apresenta o gene SPI 2 que atua na infecção sistêmica. Nossos dados demonstraram que no intestino delgado houve discreta invasão da *Salmonella* nos animais infectados e não tratados no 7^o, pois as extremidades das vilosidades apresentaram-se “contraídas”, o que possivelmente favoreceu o infiltrado de leucocitário nesse tecido. Estes dados estão de acordo com Monak *et al.* (2004) e Franco e Landgraf (1996) que demonstraram que a *Salmonella* após atravessar a barreira epitelial, infectam preferencialmente fagócitos no interior da lâmina própria, continuam a se multiplicar e são seqüestradas nos linfonodos regionais e após a invasão, as extremidades das vilosidades contraem e são invadidas por neutrófilos, como observado na figura 19E. No entanto, quando animais infectados com *S. Enteritidis* são tratados com *H. procumbens* apresentam recuperação da arquitetura das vilosidades intestinais, com aparente redução do infiltrado inflamatório, sugerindo que *H. procumbens* pode ser candidato ao controle do processo inflamatório intestinal induzido por *S. Enteritidis* (Fig. 21F).

8. CONCLUSÃO

O tratamento com o extrato etanólico da *H. procumbens*:

- Modulou negativamente o recrutamento de células mononucleares para a cavidade peritoneal caracterizando um efeito anti-inflamatório nesse compartimento;
- Apresentou efeito inibitório na produção de TNF- α , fato este que pode estar relacionado com a discreta diminuição do processo inflamatório;
- Diminuição dos níveis de IL-10 no grupo SE+HP parece estar relacionado com a diminuição da gravidade da salmonelose;
- Apresentou redução da hipertrofia das vilosidades com preservação da arquitetura intestinal, embora ainda tenha discreto infiltrado de células inflamatórias;
- A cepa *Salmonella* Enteritidis (ATCC13076) possivelmente não apresenta o gene SPI 2, responsável pela invasão e disseminação desta bactéria, o que possivelmente favoreceu a hemocultura negativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHESON, D. W. K.; LUCCIOLI, S. Mucosal immune response. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**. v.18, p.387-404, 2004.

ALMEIDA, I. C.; GONÇALVES, P. M. R.; CARVALHO, J. C. A. Isolamento e identificação de *Salmonella* em carcaças de frango congelados e frescos, através de método rápido. **Higiene Alimentar**, v.14, n. 70, p. 59-62, 2000.

ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ANDERSEN, M. L.; SANTOS, E. H. R.; SEABRA, M. L. V.; *et al.* Evaluation of acute and chronic treatments with *Harpagophytum procumbens* on Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 325-330, 2004.

ANTHONY, L. S. D.; BURKE, R. D.; NANO, F. E. Growth of *Francisella* spp. In: Rodent Macrophages. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 3291-3296, 1991.

AKIRA, S.; SATO, S. Toll-like receptors and their signaling mechanisms. **Scand J. Infect Dis.**, v. 35, n. 9, p. 555-562, 2003.

BADA-ALAMBEDJI, R.; FOFANA, A.; SEYDE, M.; *et al.* Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from poultry carcasses in Dakar (Senegal). **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, p. 510-515, 2006.

BARROW, P. A. *Salmonella* – present, past and future. **Avian Pathology**, v. 22, p. 651-669, 1993.

BAGHDIKIAN, B.; LANHERS, M. C.; FLEURENTIN, J.; *et al.* An analytical study, anti-inflammatory and analgesic effects of *Harpagophytum procumbens* and *Harpagophytum zeyheri*. **Planta Medica**, v. 63, p. 171-176, 1997.

BARBOSA-FILHO, J. M.; NASCIMENTO-JÚNIOR, F. A.; TOMAZ, A. C. A.; *et al.* Natural products with antileprotic activity. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, p. 141-148, 2007.

BARON, E. J.; FINEGOLD, S. M. **Bailey & Scott's – Diagnostic microbiology**. 8ª edição, The C.V. Mosby Co.: St. Louis, 1990.

BEHAR, P. **A Escolha do Antibiótico: Critérios e Avanços**. Ed. A. B. M. Brandão. Rio de Janeiro: Revinter, p. 225-233, 1998.

BERMUDEZ, L. E.; CHAMPSI, J. Infection with *Mycobacterium avium* induces production of interleukin-10 (IL-10) and administration of anti-IL-10 antibody is associated with enhanced resistance to infection in mice. **Infect. Immun.**, 61 (7), p. 3093-3097, 1993. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/61/7/3093.short> >. Acesso em: 28 Jan. 2013.

BIER, O. Bactérias intestinais. In: BIER, Otto. **Bacteriologia e imunologia**. Rio de Janeiro: Melhoramentos, 1976.

BLACKWELL, T. S.; CHRISTMAN, J. W. Sepsis and cytokines: current status. **Br J Anaesth**, v. 77, p.110-117, 1996.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. **Trends Cell Biol.**, v.11, p. 66-75, 2001.

BOHN, E., *et al.* Early gamma interferon mRNA expression is associated with resistance of mice against *Yersinia enterocolitica*. **Infect. Immun.**, 62 (7), p. 3027-3032, 1994. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/62/7/3027> >. Acesso em: 04 Abr. 2013.

BOHN, E. *et al.* Gene expression patterns of epithelial cells modulated by pathogenicity factors of *Yersinia enterocolitica*. **Cell. Microbiol.**, 6 (2), p. 129-141, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14706099> >. Acesso em: 15 Fev. 2013.

BOLETIM Epidemiológico Paulista. **Salmonella Enteritidis - Uma Importante Causa de Surtos Bacterianos Veiculados por Alimentos e a Necessidade de uma Nova Regulamentação Sanitária para os Alimentos Implicados, São Paulo, Brasil, 1999-2003**. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DDTHA), Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Ano 1, n. 8, 2004.

BONNEAU, M.; EPARDAUD, M.; PAYOT, F. *et al.* Migratory monocytes and granulocytes are major lymphatic carriers of *Salmonella* from tissue to draining lymph node. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 79, 2006.

BOPP, C.; BRENNER, F.W.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N. *Escherichia, Salmonella* and *Shigella*. In: BOPP, C.; BRENNER, F. W.; WELLS, J.G.; STROCKBINE, N. **Man. Clin. Microbiol.** Washington, D.C. ASM, v.7, p. 459- 474, 1999.

BOST, K. L., CLEMENTS, J. D. In vivo induction of interleukin-12 mRNA expression after oral immunization with *Salmonella dublin* or the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Infect. Immun.**,v. 63, p 1076–1083, 1995.

BOWMAN, C. C.; BOST, K. L. Cyclooxygenase-2 Inhibition Enhances Activation of T Helper Type Responses during *Salmonella* Infection. **Microbiology Journal**, v. 3, p. 23-28, 2009.

BOWMAN, C. C.; BOST, K. L. Cyclooxygenase-2-Mediated Prostaglandin E₂ Production in Mesenteric Lymph Nodes and in Cultured Macrophages and Dendritic Cells after Infection with *Salmonella*. **J. Immunol.**, 172 (4), p. 2469-2475, 2004. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/172/4/2469> >. Acesso em: 22 Mar. 2013.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). **Situação das doenças transmitidas por alimentos de origem bacteriana (*Salmonella* e *E.coli*)**. In: Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos.

Brasília: Editora MS, 2010. 158 p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_doencas_transmitidas_por_alimentos_pdf.pdf>. Acesso em Junho de 2012.

BUCHMEIER, N.A.; HEFFRON, F. Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 2232-2238, 1991.

BURGER, J. F. W.; BRANDT, E.V.; FERREIRA, D. Iridoid and phenolic glycosides from *Harpagophytum procumbens*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 1453-1457, 1987.

BUTLER, T. Typhoid fever. In: GOLDMAN, L.; BENNETT, J. C. **Cecil textbook of medicine**, 21 ed., Philadelphia, W.B. Saunders Company, p.1681-1683, 2000.

CAFFER, M. I.; TERRAGNO, R. **Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella***. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Subsecretaría de Investigación y Tecnología ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Ministerio de Salud. Buenos Aires, Argentina, 2001. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina-LevelII/Manual_procedimientos_Salmonella.pdf>. Acesso em: agosto de 2012

CAMPOS, L. C. Salmonella. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPertz, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. (Ed.) **Microbiologia**. 3ª edição, São Paulo, Atheneu, p.229-234, 2002.

CANNON, J. G.; TOMPKINS, R. G.; GELFAND, J. A.; *et al.*. Circulating interleukin 1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental fever. **J. Infect. Dis.**, v.161, p. 79–84, 1990.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA Jr., J. M. The Drug Development in Brazil: Challenges. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, n. 1, p. 98-106, 2008.

CARTER, P. B.; COLLINS, F. M. The route of enteric infection in normal mice. **J. Exp. Med.**, 139 (5), p. 1189-1203, 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4596512>>. Acesso em: 26 Mar. 2013.

CASADESÚS, J. *Salmonella*: from basic science to clinical issues. **Future Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 133-135, 2011.

CHAN, S. H.; PERUSSIA, B.; GUPTA, J. W. *et al.* Induction of interferon-gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responding cells and synergy with others inducers. **J. Exp. Med.**, v.173, p. 869–879, 1991.

CHEMINAY, C.; CHAKRAVORTTY, D.; HENSEL, M. Role of Neutrophils in Murine Salmonellosis. **Infect. Immun.**, 72(1), p. 468-477, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC343967/>>. Acesso em: 24 Abr. 2013.

CHONG, C., BOST, K. L., CLEMENTS, J. D. Differential production of interleukin-12 mRNA by murine macrophages in response to viable or killed *Salmonella* spp. **Infect. Immun.**, v.64, n.4, p.1154–1160, 1996.

CHRUBASIK, J. E.; SPORER, F.; DILLMANN-MARSCHNER, R.; *et al.* Physicochemical properties of harpagoside and its *in vitro* release from *Harpagophytum procumbens* extracts tablets. **Phytomedicine**, v. 6, p. 469-473, 2000.

CLARKE, R. C.; GYLES, C. L. *Salmonella* sp. In: GYLES, C. L.; CHARLOES, O.T. (Ed.) Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa State University. **Ames**, v. 2, p. 133-153, 1996.

CLARKSON, C.; STAERK, D; HANSEN S. H.; *et al.* Identification of major and minor constituents of *Harpagophytum procumbens* (devil's claw) using HPLC-SPE-NMR and HPLC-ESIMS/ APCIMS. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1280-1288, 2006.

CLSI. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Quality Manual*; Third Edition. Wayne, Pennsylvania USA, 2003.

COATES, J. N.; MCCOLL, S. R. Production of Chemokines *In Vivo* in Response to Microbial Stimulation. **The Journal of Immunology**, v.166, n. 8, p. 5176–5182, 2001.

COLLINS, F. M.; CARTER, P. B. Growth of *Salmonellae* in Orally Infected Germfree Mice. **Infect. Immun.**, 21 (1), p. 41-47, 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC421954/>>. Acesso em: 18 Abr. 2013.

CONNELLY, L., PALACIOS-CALLENDER, M.; AMEIXA, C.; *et al.* Biphasic regulation of NF κ B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. **J. Immunol.**, v. 166, n. 6, p. 3873-3881, 2001.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.M. Paratífos em geral. In: **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2ª edição, Rio de Janeiro/RJ: MESDI, p.167-174, 1992.

CUNHA, F.Q.; MOSS, D. W.; REES, D.; *et al.* Differential induction of nitric oxide synthase in various organs of the mouse during endotoxemia: role of TNF- α and IL-1 β . **Immunology**, v.81, p. 211-215, 1994.

D' Aoust, J.Y. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 12, p. 17-40, 1991.

_____. *Salmonella*, In: LABRÈ, R. G.; GARCIA, S. (Ed.). **Guide to Food-borne Pathogens**. New York, NY: John Wiley and Sons Inc, 2001.

DARWIN, K.H; MILLER, V.L. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. **Clin. Microbiol. Rev.**, n.12, p.405-428, 1999.

DIVISÃO DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR/CVE/SES-SP. **Por que não devemos comer ovos crus ou mal cozidos?** Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. São Paulo: 2008. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/salmonella_pergresp.htm>. Acesso em: 03 Abr. 2013.

DIVISÃO DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR/CVE/SES-SP. *Salmonella Enteritidis – Perguntas e Respostas*. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. São Paulo, 2008. Disponível em < http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/salmonella_pergresp.htm > Acesso em junho de 2012.

ECHTENACHER, B.; FALK, W.; MÄNNEL, D.N.; KRAMMER, P. H. Requirements of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. **J Immunol**, v.145, p. 3762-3766, 1990.

ECKMAN, L.; KAGNOFF, M. F. Cytokines in host defense against Salmonella. **Microb. Infect.**, 3, p. 1191-1200, 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11755407> >. Acesso em: 02 Abr. 2013.

ECKMANN, L.; FIERER, J.; KAGNOFF, M. F. Genetically resistant (Ityr) and susceptible (Itys) congenic mouse strains show similar cytokine responses following infection with Salmonella dublin. **J. Immunol.**, 156 (8), p. 2894-2900, 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8609409> >. Acesso em: 21 Fev. 2013.

EDWARDS, R.A.; OLSEN, G.J.; MALOY, S.R. Comparative genomics of closely related salmonellae. **Trends Microbiol. Rev.**, v. 10, p. 94-99, 2002.

EHLERS, S., *et al.* Kinetic analysis of cytokine gene expression in the livers of naive and immune mice infected with *Listeria monocytogenes*. The immediate early phase in innate resistance and acquired immunity. **J. Immunol.**, 149 (9), p. 3016-3022, 1992. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1401926> >. Acesso em: 14 Abr. 2013.

EVEREST, P., *et al.* Salmonella typhimurium infection in mice deficient in interleukin-4 production—role of IL-4 in infection-associated pathology. **J. Immunol.**, 159 (4), p. 1820-1827, 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9257845> >. Acesso em: 11 Mar. 2013.

FENNEL, C. W.; LINDSEY, K. L.; MCGAW, L. J.; *et al.* Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **J. Ethnopharmacology**, v. 94, p. 205-217, 2004.

FIEBICH, B.L.; HEINRICH, M.; HILLER, K.O.; KAMMERER, N. Inhibition of TNF-alpha synthesis in LPS-stimulated primary human monocytes by *Harpagophytum* extract SteiHap 69. **Phytomedicine**, v.8, p. 28–30, 2001.

FINLAND, M. Emergence of antibiotic resistance in hospitals. **Reviews at infectious Disease**, v. 1, n. 4, p. 1935-1975, 1979.

FISHER, C.J.; OPAL, S. M; DHAINAUT, J. F.; *et al.* Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. **Crit Care Med**, v.21, p. 318-327, 1993.

FLORQUIN, S.; AMRAOUI, Z.; ABRAMOWICZ & GOLDMAN, M. Systemic release and protective role of endogenously synthesized nitric oxide in Staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. **J Immunol**, v.153, p. 2618-2623, 1994.

FONTAINE, J.; ELCHAMI, A. A.; VANHAELEN, M.; Biological analysis of *Harpagophytum procumbens* D.C. II. Pharmacological analysis of the effects of harpagoside, harpagide and harpagogenine on the isolated guinea-pig ileum. **J. Pharm. Belg.**, v. 36, n. 5, p. 321-324, 1981.

FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S. **Enterobacteriaceae**. In: FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A. S; BARON, E. J. **Bailey & Scott's diagnostic microbiology**. 11^o edição, St. Louis: Mosby, p. 509-526, 2002.

FRANCO, B.G.M.F.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182 p., 1996.

FRANGOS e ovos exigem cuidados no preparo para evitar contaminação. Bem Estar Saúde, transmitido em 13/06/2011. Disponível em: < <http://g1.globo.com/bemestar/noticia/2011/06/frango-e-ovos-exigem-cuidados-no-preparo-para-evitar-contaminacao.html> > Acesso em julho, 2011.

GÉRARD, C.; BRUYNS, C.; MARCHANT, A.; *et al.* Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. **J Exp Med**, v. 177, p. 547-552, 1993.

GILLIGAN, P. H.; JANDA, J.M.; KARMALI, M. A.; MILLER, J. M. Lab. Diag. Bact. **Diarrhea**. CUMITECH, 12A, Washington, D.C., ASM. 28 p., 1992.

GODINEZ, I.; HANEDA, T.; RAFFATELLU, M. *et al.* T Cells Help To Amplify Inflammatory Responses Induced by *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium in the Intestinal Mucosa. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 2008–2017, 2008.

GOMES, M. J. P. Grupo das Enterobacteriáceas (*Salmonella* spp). Microbiologia Clínica Veterinária. VET 3225. Área de Bacteriologia, UFRGS, 2012. Disponível em: < <http://www6.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAAnero%20Salmonella%204-2012-1.pdf> > Acesso em maio de 2012.

GOMEZ, H. F.; CLEARLY, G. G. *Salmonella*. 4^a edição. Saunders Co.: Philadelphia. v. 1, 1998.

GRIMONT, H. F.; WEILL, F.X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. **Institut Pasteur**, v.9, 2007.

GUERRANT, R.L.; VAN GILDER, T.; STEINER, T.S.; Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 331-350, 2001.

HAAG-BERRURIER, M.; KUBALLA, B.; ANTON, R. Dosage des glucoiridoides totaux dans la racine d'*Harpagopytum procumbens* DC und *Harpagophytum zeheri* DECNE. **Planta Medica**, v. 12, p. 197-206, 1978.

HÄNSEL, R.; KELLER, K.; RIMPLER, H. *et al.* (editors). *Harpagophytum*. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. In: **Drogen**, v.5; p. 384–390; 1993

HANSEN-WESTER, I.; HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 549-559, 2001.

HARAGA, A.; OHLSON, M. B.; MILLER, S. I. Salmonellae interplay with host cells. **Nat. Rev. Microbiol.** v.6, p.53–66, 2008.

HARRISON, P. F.; LEDERBERG, J. **Antimicrobial Resistance: Issues and Options**. National Academie Press: Washington, 128 p., 1998.

HO, K. Y.; TSAI, C. C.; HUANG, H. S.; *et al.* Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 53, p. 187-191, 2001.

HOLT, J. G. E. A. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore, Williams & Wilkins, v. 9, 789 p., 1994.

HOWARD, M.; MUCHAMUEL, T.; ANDRADE, S.; ME NON, S. Interleukin-10 protects mice from lethal endotoxemia. **J Exp Med.**, v. 177, p. 1205-1209, 1993.

HULTGREN, S. J.; JONES, C. H.; NORMARK, S. Bacterial adhesins and their assembly. In: NEIDHARDT, F. C. (Ed.). **Escherichia coli and Salmonella**. Washington, D. C. ASM Press, p. 2730-2757, 1996.

HUMPHREY, T. J. Public health implications of the infection of egg-laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. **World's Poultry Science Journal**, v. 46, p. 5-13, 1990.

HUMPHREY, T. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 2, p.504-509, 2004.

INABA, K. *et al.* Inhibitory effects of devil's claw (secondary root of *Harpagophytum procumbens*) extract and harpagoside on cytokine production in mouse macrophages. **J. Nat. Med.**, 64 (2), p. 219-222, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20177800> >. Acesso em: 24 Abr. 2013.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (*ICMSF*), **Guia simplificado para a compreensão e uso de objetivos de inocuidade de alimentos e objetivos de desempenho**, 2000. Disponível em:< <http://www.icmsf.org/pdf/FSO%20Objectives/GuiaSimplificadoEnglish.pdf> >. Acesso em: julho de 2012

IRINO, K.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; *et al.* Progression of *Salmonella enteritidis* phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo**, v. 38, p.193-196, 1996.

ISBERG, R. R. Uptake of enteropathogenic *Yersinia* by mammalian cells. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v. 209, p.1–24, 1996.

JAKABI, M.; BUZZO, A. A.; RISTORI, C. A. *et al.* Observações Laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp ocorridos na Grande São Paulo no período de 1994 a 1997. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 58, p. 47-51, 1999.

JANEWAY, C. A.; WALPORT, P. T. M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e doença**. 5ª edição Porto Alegre: Editora Artmed, 767 p., 2002.

JANG, M.H.; LIM, S.; HAN, S. M.; *et al.* *Harpagophytum procumbens* suppresses lipopolysaccharide-stimulated expressions of cyclooxygenase- 2 and inducible nitric oxide synthase in fibroblast cell line L929. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.93, p. 367–371, 2003.

JARAMILLO, E. L. Resistência bacteriana a los antibióticos en la Unidad de Cuidados Intensivos. Hospital de Caldas (1992-1994). **Colombia Médica**, v. 27, n.2, 1996.

JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3ª edição Zaragoza: Editorial Acribia, cap. 22, p. 651-684, 1994b.

JONES, B.D. Salmonellosis: Host Immune Responses and Bacterial Virulence Determinants. **Annual Review of Immunology**, v. 14, p. 533-561, 1996.

JOTWANI, R.; TANAKA, Y.; WATANABE, K. *et al.* Cytokine stimulation during *Salmonella typhimurium* sepsis in Itys mice. **J. Med. Microbiol.**, v. 42, p. 348–352, 1995.

KAKU, M.; PERESI, J. T. M.; TAVECHIO, A. T. *et al.* Surto alimentar por *Salmonella enteritidis* no noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 29, p. 127-131, 1995.

KAMPELMACHER, E. H. Spread and significance of Salmonellae in surface waters in Netherlands. ASTM-STP635. Edited By HOADLEY, A. W. and DUTKA, B. J. **American Society for Testing and Materials:Philadelphia**, p. 148-158, 1977.

KASZKIN, M.; BECK, K. F.; KOCH, E. Downregulation of iNOS expression in rat mesangial cells by special extracts of *Harpagophytum procumbens* derives from harpagoside-dependent and independent effects. **Phytomedicine**, v. 11, p. 585–595. 2004.

KAYE, D. *Salmonella* infections other than typhoid fever. In: GOLDMAN, L.; BENNETT, J. C. **Cecil textbook of medicine**. 21ª edição. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p.1683-1685, 2000.

KEHL, M. Avaliação da presença de *Salmonella sp.* Em carcaças, cortes comerciais e vísceras de frango resfriados procedentes de abatedouro no RS. 2007. Dissertação (Trabalho de conclusão de curso de Biomedicina) – Instituto de Ciências da Saúde, Curso de Biomedicina, Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, 2007. Disponível em: <
<http://ged.feevale.br/bibvirtual/Artigo/ArtigoMargaridaKehl.pdf>>. Acesso em: 24 Mar. 2013.

KEUTER, M.; DHARMANA, E.; GASEM, M. H.; *et al.* Patterns of proinflammatory cytokines and inhibitors during typhoid fever. **J. Infect. Dis.**, v.169, p. 1306–1311, 1994.

KHAN, S. A.; STRIJBOS, P. J.; EVEREST, P., *et al.* Early responses to *Salmonella typhimurium* infection in mice occur at focal lesions in infected organs. **Microb Pathog**, v. 30, p. 29–38, 2001.

KINCY-CAIN, T.; CLEMENTS, J. D.; BOST, K. L. Endogenous and Exogenous interleukin-12 augment the protective immune response in mice orally challenged with *Salmonella Dublin*. **Infect. Immun.** v. 64, p. 1437–1440, 1996.

KUMAZAWA, Y.; FREUDENBERG, M.; HAUSMANN, C.; *et al.* Formation of interferon-gamma and tumor necrosis factor in mice during *Salmonella typhimurium* infection. **Pathobiology**, v. 59, p. 194–196, 1991.

L'ALMANACH, A. C.; LANTIER, F. Host cytokine response and resistance to *Salmonella* infection. **Microbes and Infection/Institut Pasteur**, v.1, n.9, p. 719-726, 1999.

LANGNEGGER, J.; FIGUEIREDO, M. P.; RESENDE, E. F. Eficácia terapêutica de Cefacetile frente aos microorganismos do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus* isolados de mastites subclínicas. **A Hora Veterinária**, v. 30, p. 24-27. 1986.

LANHERS M. C.; FLEURENTIN J.; MORTIER F.; *et al.* Anti-inflammatory and analgesics effects of an aqueous extract of *Harpagophytum procumbens*. **Planta Medica**, v. 58, p. 117-122, 1992.

LEHMANN, A. K., *et al.* High levels of interleukin 10 in serum are associated with fatality in meningococcal disease. **Infect. Immun.**, 63 (6), p. 2109-2112, 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7768588> >. Acesso em: 18 Abr. 2013.

LEHNER, M. D., *et al.* Improved Innate Immunity of Endotoxin-Tolerant Mice Increases Resistance to *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infection despite Attenuated Cytokine Response. **Infection and Immunity**, 69, p. 463-471, 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11119538?dopt=Abstract> >. Acesso em: 14 Mar. 2013.

LEITÃO, S. G.; CASTRO, O.; FONSECA, E. M.; *et al.* Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 6-11, 2006.

LE MINOR, L. Genus *Salmonella*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: the William and Wilkins Co., v. 2, 1984.

LE MINOR, L.; VÉRON, M.; POPOFF, M.Y. Proposition pour une nomenclature des *Salmonella*. **Annual Microbiology**, v. 133B, p. 245-254, 1982.

LIN, F. R.; WANG, X. M.; HSU, H. S.; *et al.* Electron microscopic studies on the location of bacterial proliferation in the liver in murine salmonellosis. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 68, p. 539-550, 1987.

LINDSAY, J.A. Chronic sequelae of foodborne disease. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 3, n. 4, p. 443-452, 1997.

LOETSCHER, Y.; WIESER, A.; LENGEFELD, J. *et al.* *Salmonella* Transiently Reside in Luminal Neutrophils in the Inflamed Gut. **PLoS ONE**. v. 7, n. 4, 2012.

LUO, Y.; DORF, M. E. Isolation of Mouse Neutrophils. **Current Protocols in Immunology**. p 3-26,1997.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 3ª edição, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 912 p.; 2000.

MACKIE, D. P. *et al.* Antibiotic sensitivity of bovine staphylococcal and coliform mastitis isolated over four years. **Vet. Rec.**, v. 123, p. 515-517, 1988.

MADINGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo, Brasil: Pearson Education do Brasil, v. 10, 609 p., 2004.

MAESTROENI, P.; VILLARREAL-RAMOS, B.; HORMAECHE, C. E. Role of T-cells, TNF- α and IFN- γ in recall of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in mice vaccinated with live attenuated aro2 salmonella vaccines. **Microb. Pathog.**, 13 (6), p. 477-491, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1363824>>. Acesso em: 24 Mar. 2013.

MAHON, C. R.; MANUSELIS, G. **Textbook of diagnostic microbiology**. 2ª edição, Philadelphia: W.B. Saunders Company, p.463-514, 2000.

MAI, N. L.; PHAN, V.B.; VO, A. H.; *et al.* Persistent efficacy of Vi conjugate vaccine against typhoid fever in young children. **N. Engl J Med.**, v. 349, p 1390–1391, 2003.

MÁLKOVÁ, D. K.; BLAZEK, V.; DANIELOVÁ, V.; *et al.* Some diagnostic, biologic and morphologic characteristics of *Francisella tularensis* strains isolated from the ticks *Ixodes ricinus* (L.) in the Prague agglomeration. **Folia Parasitol. (Praha)**, v. 33, p. 87-95, 1986.

MARTINS, L. M. **Estudo de *Salmonella Typhimurium* de origem aviária: perfil genotípico, colonização e invasão**. 2010. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-13092010-134855/>>. Acesso em: 2012-09-23.

MASTROENI, P. Immunity to Systemic *Salmonella* Infections. **Current Molecular Medicine**, 2 (4), p. 393-406, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12108950>>. Acesso em: 22 Abr. 2013.

MASTROENI, P.; CLARE, S.; KHAN, J. A.; *et al.* Interleukin 18 contributes to host resistance and gamma interferon production in mice infected with virulent *Salmonella typhimurium*. **Infect. Immun.** v. 67, p. 478-483, 1999.

MASTROENI, P.; HARRISON, J. A.; ROBINSON, J. H. *et al.* Interleukin-12 is required for control of the growth of attenuated aromatic-compound-dependent salmonellae in BALB / c mice: role of gamma interferon and macrophage activation. **Infect Immun**, v. 66, p. 4767-4776, 1998.

MASTROENI, P., VILLARREAL-RAMOS, B.; HORMAECHE, C. E. Role of T cells, TNF alpha and IFN gamma in recall of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in mice vaccinated with live attenuated aro- Salmonella vaccines. **Microb Pathog**, v. 13, p. 477-491, 1992.

MEDPLANT UPDATE. Devil's Claw for lower back pain. **Aust. J. Med. Herbalism**, 9 (3), 1997.

MENG, J. C.; ZHU, Q. X.; THAN, R. X. New antimicrobial mono and sesquiterpenes from *Soroseris hookeriana* subsp. *Erysimoides*. **Planta Medica**, v. 66, p. 541-544, 2000.

MERCHANT, L, A.; PACKER, R. A.; **Bacteriologia e Virologia Veterinária**. Zaragoza: Acribia, v.3, p.299-322, 1980.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, p. 316-320, 2005.

MILLER, S. I.; HOHMANN, E. L.; PEGUES, D. A. *Salmonella* (including *Salmonella typhi*). In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases**. 4ª edição, New York: Churchill Livingstone, v. 2, p. 2012-2033, 1995.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; *et al.* **Microbiologia médica**. 2ª edição, São Paulo: Manole, 1999, 584 p.

Ministério da Saúde. **Manual integrado de vigilância e controle da Febre Tifóide**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Série A. Normas e Manuais Técnicos, Brasília: MS editora, 2008.

MISADOR. Disponível em <http://www.misodor.com/salmonelose.php>, acesso em novembro de 2011.

MITSCHER, L. A.; LEV, L. P.; BATHOLA, M. S.; *et al.* Antimicrobial agents from higher plants. Introduction, rationale and methodology. **Lloydia**, v. 35, p. 157-166, 1972.

MITTRUCKER, H.W., KAUFMANN, S. H. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. **J Leukoc Biol**, v. 67, p. 457-463, 2000.

MIZUNO, Y. *et al.* Th1 and Th1-inducing cytokines in Salmonella infection. **Clin. Exp. Immunol.**, 131 (1), p. 111-117, 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1808588/> >. Acesso em: 14 Jan. 2013.

MNCWANGI, N. *et al.* A review of the ethnobotany, phytochemistry and biological activity of *Harpagophytum procumbens*. **Journal of Ethnopharmacology**, 143 (3), p. 755-771, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22940241> >. Acesso em: 25 Abr. 2013.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Mechanisms of disease. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl Med**, v. 329, p. 2002-2012, 1993.

- MORSE, E. V.; DUNCAN, M. A. *Salmonellosis* an environmental health problem. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.165, p. 1015-1019; 1974.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L.; Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretions lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.** v. 7, p. 145-173, 1989.
- MUOTIALA, A., MAKELA, P. H. The role of IFN-gamma in murine *Salmonella typhimurium* infection. **Microb Pathog**, v. 8, p.135-141, 1990.
- NASCIMENTO, F. R.; CALICH, V. L.; RODRIGUEZ, D. *et al.*. Dual role for nitric oxide in paracoccidiodomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J. Immunol.**, v. 168, p. 4593-4600, 2002
- NNALUE, N. A.; SHNYRA, A.; HULTENBY, K.; *et al.* *Salmonella choleraesuis* and *Salmonella typhimurium* associated with liver cells after intravenous inoculation of rats are localized mainly in Kupffer cells and multiply intracellularly. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2758-2768, 1992
- NAUCIEL, C.; ESPINASSE-MAES, F. Role of gamma interferon and tumour necrosis factor alpha in resistance to *Salmonella typhimurium* infection, **Infect. Immun**, v. 60, p. 450-454, 1992.
- NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F. M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. **TRENDS in Immunology**, v.26 -3, p. 158 – 165, 2005.
- OCHOA, I. M. F.; RODRIGUES, A. R. Mecanismos moleculares de patogenicidade de *Salmonella* sp. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 47, p. 25-42, 2005.
- OLIVEIRA, S. J. **Guia Bacteriológico Prático: Microbiologia Veterinária**. Canoas, RS, Ulbra, 142 pp., 1995.
- OSTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais . **Rev. Bras. Farmacogn.**, 18(2), p. 301-307, Abr./Jun. 2008. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000200026 >. Acesso em: 14 Abr. 2013.
- PEEL, J. E.; VOIROL, M. J.; KOLLY, C.; *et al.* Induction of circulating tumor necrosis factor cannot be demonstrated during septicemic salmonellosis in calves. **Infect. Immun.** v. 58, p. 439-442, 1990.
- PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; *et al.* 2001. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **J. Ethnopharmacology**, v. 77, p. 37-40, 2001.
- PILLAY, J.; den BRABER, I.; VRISEKOOOP, N. *et al.* In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. **Blood**, v.116, p. 625–627, 2010.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. 2003. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2ª edição, São Paulo: Atheneu Editora, 2003. 325 p.

POPOFF, M. Y. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 8ª edição. **Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Pasteur Institute, WHO: Paris, France**. 2001.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. Formules antiigéniques des serovars de *Salmonella*. **Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institute Pasteur WHO: Paris**, p. 1-15, 1997.

_____. Taxonomy of the genus *Salmonella*. Changes in serovars nomenclature. In: POPPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision. **Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institute Pasteur, WHO: Paris, France**, p. 5, 1997.

QUINN, N. E. **Clinical veterinary microbiology**. 4ª edição, London: Wolfe, 730 p., 1994.

RAMARATHINAM, L.; NIESEL, D. W.; KLIMPEL, G. R. Ity influences the production of IFN-gamma by murine splenocytes stimulated in vitro with *Salmonella typhimurium*. **J. Immunol.** v. 150, n. 9, p. 3965-3972, 1993.

RAMARATHINAM, L.; SHABAN, R. A.; NIESEL, D. W.; KLIMPEL, G. R. IFN-gamma production by gut-associated lymphoid tissue and spleen following oral *S. typhimurium* challenge. **Microb. Pathogen.** v. 11, n. 5, p. 347-356, 1991.

RAMSAY, A. J.; HUSBAND, A. J.; RAMSHAW, I. A.; *et al.* The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody response in vivo. **Science**, v. 264, p. 561-563, 1994.

REDL, H; SEHLOG, G; CESKA, M; DAVIES, J.; BUURMAN, W. A. Interleukin-8 release in baboon septicemia is partially dependent on tumor necrosis factor. **J. Infect Dis.**, v. 167, p. 1464-1466, 1993.

REED, S. G., *et al.* IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, 153 (7), p. 3135-3140, 1994. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/153/7/3135.short>>. Acesso em: 20 Fev. 2013.

REGO, C. M. **Artrite Reumatóide: Fisiopatologia e Terapêutica biológica**. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina. Covilhã, Portugal. Universidade da Beira Interior. Faculdade de Ciências da Saúde. Junho de 2010.

REIS, B. P.; ZHANG, S; TSOLIS, R.M. *et al.* The attenuated sopB mutant of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium has the same tissue distribution and host chemokine response as the wild type in bovine Peyer's patches. **Vet. Microbiol.**, v.97, p. 269-277, 2003.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A.; J. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. **J. Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127-149, 1988.

RODRIGUEZ, D.; KELLER, A. C.; FAQUIM-MAURO, E. L.; *et al.* Bacterial Lipopolysaccharide Signaling Through Toll-Like Receptor 4 Suppresses Asthma-Like Responses Via Nitric Oxide Synthase 2 Activity. **The Journal of Immunology**, v. 171, p. 1001-1008, 2003.

RYDSTRÖM, A. **Recruiting, differentiation, and functions of monocytes during Salmonella infection.** Göteborg: Department of Microbiology and Immunology, The Sahlgrenska Academy, 2008. Disponível em: <
<https://gupea.ub.gu.se/bitstream/2077/10184/1/Anna%20Rydstr%C3%B6m%20-%20thesis.pdf>>. Acesso em: 07 Abr. 2013.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Rev.Bras. Farmacogn.**, v. 17, p. 455-465, 2007.

SCHELD, W. M.; SANDE, M. A. Endocarditis and intravascular infections. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. **Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases.** 4^o edição, New York: Churchill Livingstone, v.1, p.740-782, 1995.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clin.Microbiol.Rev.**, v. 17, p.14-56, 2004.

SHELOBOLINA, E. S.; SULLIVAN, S.A.; O'NEILL, K.R.; *et al.* Isolation, characterization, and U (VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U (VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 2959-2965, 2004.

SHIBUYA, K.; ROBINSON, D.; ZONIN, F.; *et al.* IL-1 α and TNF- α are required for IL-12-induced development of TH1 cells producing high levels of IFN- γ in BALB/c but not C57BL/6 mice. **J. Immunol.** v. 160, p. 1708–1716, 1998.

SMUCNY, J.; FAHEY, T.; BECKER, L; *et al.* Antibiotics for acute bronchitis. **Cochrane Database Syst Rev.**, n. 4, 2000.

STECHER, B.; ROBBIANI, A.; W.; WALKER, A. M. *et al.* *Salmonella enterica serovar* Typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. **PLoS Biol.** v.5, n. 10, p.2177–2189, 2007.

STECHER, B.; HAPFELMEIER, S.; MULLER, C. *et al.* Flagella and Chemotaxis Are Required for Efficient Induction of *Salmonella enterica serovar* Typhimurium Colitis in Streptomycin-Pretreated Mice. **Infect Immun** v.72, p. 4138–4150, 2004.

STEPHENS, R.; CHAPLIN, D. D. IgE Cross-Linking or Lipopolysaccharide Treatment Induces Recruitment of Th2 Cells to the Lung in the Absence of Specific Antigen. **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 5468-5476, 2002.

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, n. 22, p. 7738-7742, 1985.

TAUNAY, A. E.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T. The role of Public Health Laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de S. Paulo**, v. 38, p. 119-129, 1996.

TAKEUCHI, A. Electron microscope studies of experimental salmonella infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*. **Am. J. Pathol.**, v. 50, p. 109-136, 1967.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos**. 3ª edição. São Paulo: Atheneu, 1984, 374 p.

THIENNIMITR, P., WINTER, S., BÄUMLER, A. *Salmonella*, the host and its microbiota. **Current Opinion in Microbiology**. v. 15, n. 1, p. 108-114, feb. 2012.

THRELFALL, E. J.; HALL, M. L. M.; ROWE, B. *Salmonella* bacteraemia in England and Wales, 1981- 1990. **J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 34-36, 1992.

TIZARD, I. R. **Introdução à imunologia veterinária**. São Paulo: ROCA, v. 2, 329 p., 1985.

TRABULSI, L. R. Bactéria Encontrada no Hambúrguer Pode ser Mortal. **Agência USP de Notícias** .São Paulo. No 389/99, 1999.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; *et al.* **Microbiologia**. 4ª edição, São Paulo: Atheneu, 2008.

TVINNEREIM, A. R.; HARTY, J. T. CD8⁺ T-cell priming against a nonsecreted *Listeria monocytogenes* antigen is independent of the antimicrobial activities of interferon. **Infect. Immun.** v. 68, p. 2196-2204, 2000.

VAN MIERT, A. S. J. P. A. M. Presente concepts on the inflammatory modulators with special reference to cytokines. **Veterinary Research Communications**, v. 26 -2, p. 111 – 126, 2002.

VAN ZEE K. J.; DEFORG E, L. E.; FISHER, E.; *et al.* IL-8 in septic shock, endotoxemia and after IL-1 administration. **J. Immunol.**, v. 146, p. 3478-3482, 1991.

VIDAL, J. E.; DA SILVA P. R.; SCHIAVON NOGUEIRA, R.; *et al.* Liver abscess due to *Salmonella* Enteritidis in a returned traveler with HIV infection: case report and review of the literature. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 45, p. 115-117, 2003.

VILMORE, J. O uso indiscriminado de antibióticos seleciona bactérias resistentes. 2010. Disponível em: < <http://180graus.com/farmacia/o-uso-indiscriminado-de-antibioticos-seleciona-bacterias-resistentes-371754.html> >. Acesso em: Julho de 2012.

WAGNER, R. D., *et al.* Treatment with anti-interleukin-10 monoclonal antibody enhances early resistance to but impairs complete clearance of *Listeria monocytogenes* infection in mice. **Infect. Immun.**, 62 (6), p. 2345-2353, 1994. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/62/6/2345.short> >. Acesso em: 14 Fev. 2013.

WECKESSER, S.; ENGEL, K.; SIMON-HAARHAUS, B.; *et al.* Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Phytomedicine**, v. 14, n. 7/8, p. 508-516, 2007.

WEGENER, T. Devil's Claw: from African traditional remedy to modern analgesic and antiinflammatory. **Herbal Gram**, v. 50, p. 47-54, 2000.

WIGLEY, P.; HULME, S.D.; POWERS, C.; *et al.* Infection of the reproductive tract and eggs with *Salmonella enterica serovar Pullorum* in the chicken is associated with suppression of cellular immunity at sexual maturity. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2986-2990, 2005.

YOUNG, D., HUSSELL, T., DOUGAN, G. Chronic bacterial infections: living with unwanted guests. **Nat. Immunol.**, v. 3, p.1026–1032, 2002.

YRLID, U., *et al.* Salmonella infection of bone marrow-derived macrophages and dendritic cells: influence on antigen presentation and initiating an immune response. **FEMS. Immunol. Med. Microbiol.**, 27, p. 313-320, 2000. Disponível em: < [http://www.unboundmedicine.com/harriettlane/ub/citation/10727887/Salmonella infection of bone marrow derived macrophages and dendritic cells: influence on antigen presentation and initiating an immune response](http://www.unboundmedicine.com/harriettlane/ub/citation/10727887/Salmonella_infection_of_bone_marrow_derived_macrophages_and_dendritic_cells:_influence_on_antigen_presentation_and_initiating_an Immune_response) > Acesso em: 24 Mar. 2013.