

GUSTAVO DE CAMPOS DIEAMANT

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNO-
HEMATOPOIÉTICOS DA GELÉIA REAL EM
MODELO EXPERIMENTAL DE LISTERIOSE
MURINA**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do Farmacêutico – Gustavo de Campos Dieamant.

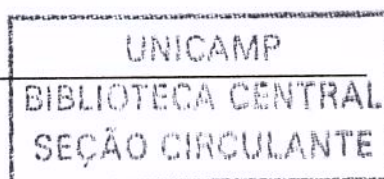
Campinas, 06 de novembro de 2003.

*Profª. Dra. Cláudia Bincoletto Trindade
- Orientadora -*



UNICAMP

2003



200401951

GUSTAVO DE CAMPOS DIEAMANT

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNO-
HEMATOPOIÉTICOS DA GELÉIA REAL EM
MODELO EXPERIMENTAL DE LISTERIOSE
MURINA**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-
Graduação em Farmacologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do
Título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Bincoletto Trindade



UNICAMP

2003

JNIDADE BC
Nº CHAMADA 1/UNICAMP
D562a
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 57388
PROC 16-117-04
C _____ D X
PREÇO 11,00
DATA _____
Nº CPD _____

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00196156-8

Bibia 314843

D562a Dieamant, Gustavo de Campos
Avaliação dos efeitos Imuno-hematopoiéticos da Geléia Real em
modelo experimental de listeriose murina. / Gustavo de Campos
Dieamant. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador : Claudia Bincoletto Trindade
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hematopoeese. 2. Unidades hematopoiéticas formadoras de
colônias. 3. Medula óssea. 4. Baço. I. Claudia Bincoletto
Trindade. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Claudia Bincoletto Trindade

Membros:

Profa. Dra. Claudia Bincoletto Trindade

Profa. Dra. Giselle Zenker Justo

Prof. Dra. Sônia Gil Costa

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 06/11/2003

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1.	Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea.....	39
Figura 2.	Estudo do crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos do baço.....	40
Figura 3.	Estudo da produção dos fatores estimuladores de colônias de células precursoras hematopoiéticas.....	42
Figura 4.	Avaliação da resistência do animal à uma dose letal de <i>Listeria monocytogenes</i>	44
Figura 5.	Estudo do peso do baço.....	46

TABELAS

Tabela 1.	Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea (24 horas após a infecção).....	69
Tabela 2.	Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea (48 horas após a infecção).....	70
Tabela 3.	Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea (72 horas após a infecção).....	71

Tabela 4.	Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos do baço (24 horas após a infecção).....	72
Tabela 5.	Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos do baço (48 horas após a infecção).....	73
Tabela 6.	Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos do baço (72 horas após a infecção).....	74
Tabela 7.	Estudo do peso do baço (24 horas após a infecção).....	75
Tabela 8.	Estudo do peso do baço (48 horas após a infecção).....	76
Tabela 9.	Estudo do peso do baço (72 horas após a infecção).....	77
Tabela 10.	Estudo da produção de fatores estimuladores de colônias de células precursoras hematopoiéticas (24 horas após a infecção).....	78
Tabela 11.	Estudo da produção de fatores estimuladores de colônias de células precursoras hematopoiéticas (48 horas após a infecção).....	79
Tabela 12.	Estudo da produção de fatores estimuladores de colônias de células precursoras hematopoiéticas (72 horas após a infecção).....	80

RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiv
INTRODUÇÃO.....	17
Geléia Real.....	18
Modelo experimental de infecção por <i>Listeria monocytogenes</i>	21
OBJETIVOS.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
Animais.....	28
<i>Listeria monocytogenes</i>	28
Tratamento com Geléia Real.....	30
Cultura clonal de precursores hematopoiéticos.....	30
Medula óssea.....	31
Baço.....	31
Preparação das placas de cultura de células da medula óssea e baço em meio semi-sólido.....	32
Preparação do meio condicionado de células esplênicas (SCM).....	32

Obtenção do soro dos animais para detecção da atividade dos fatores estimuladores de colônias.....	33
Realização da curva de sobrevivência.....	34
Peso do baço dos animais.....	35
Análise estatística.....	35
RESULTADOS.....	36
Efeitos da Geléia Real sobre o número de precursores hematopoiéticos.....	37
Medula óssea.....	37
Baço.....	38
Efeitos da Geléia Real sobre a produção dos fatores estimuladores de colônias.....	41
Efeitos da Geléia Real na sobrevivência de animais infectados com uma dose letal de <i>Listeria monocytogenes</i>	43
Efeitos da Geléia Real sobre o peso do baço dos animais.....	45
DISCUSSÃO.....	47
CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
APÊNDICE.....	65

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser aprendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto”.

(Albert Einstein)

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve...”

E a vida é muito para ser insignificante”.

(Charlie Chaplin)

*Dedico este trabalho
A Deus, pela fé e capacidade de
concluir meus planos,
Aos meus pais, Rui e Maria Edna;
Aos meus irmãos, Débora e Felipe,
À Carina, minha namorada,
e à minha avó Odete (in
memorian), pelo carinho, estímulo,
e apoio, pela motivação de sempre
buscar mais e pela coragem de
nunca desistir dos sonhos.*

À minha mãe, Maria Edna, pelo amor incondicional e pela oportunidade de me tornar um cidadão do mundo capaz de conhecer, argumentar e enfrentar todas as situações da vida.

Ao meu pai, que mesmo de maneira serena, soube apoiar e aconselhar nos momentos de maior necessidade.

Aos meus queridos irmãos, Débora e Felipe, que souberam me compreender nos momentos onde o cansaço e os estudos me fizeram distante.

À Carina, minha namorada, pelo incansável estímulo e amor.

À Professora Dra. Cláudia Bincoletto Trindade, orientadora deste trabalho, pelo apoio e dedicação e pela oportunidade que jamais será esquecida.

À professora Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, responsável pelo laboratório de Imunotoxicologia (Hemocentro/UNICAMP), por abrir as portas para o meu conhecimento científico e por acreditar no meu potencial.

A todos os companheiros do Laboratório CFU/Imunotoxicologia, em especial à Ana Paula, Solange, Débora, Sílvia Torres e Adriana, que em todos os momentos estiveram dispostos a colaborar com a realização deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório, Rafael e Sueli, pois a realização deste trabalho seria praticamente impossível sem suas presenças.

Ao Departamento de Farmacologia da UNICAMP, que possibilitou a realização desta tese de Mestrado.



RESUMO

Avaliamos, neste trabalho, os efeitos da Geléia Real (GR) sobre o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea e baço em animais infectados com *Listeria monocytogenes*. Além disso, a atividade estimuladora de colônias do soro, as alterações no peso do baço e a resistência dos animais frente a infecção também foram avaliados.

Para tanto, camundongos BALB/c foram tratados profilaticamente, por um período de 7 dias consecutivos, com GR nas doses de 125, 250, 500 e 750 mg/Kg, por gavagem. Posteriormente, os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose subletal ($1,5 \times 10^3$ bactérias/animal) de *Listeria monocytogenes*. Para avaliarmos a resistência dos animais frente à infecção, realizamos uma curva de sobrevida utilizando uma dose letal desta bactéria ($1,5 \times 10^5$ bactérias/animal).

Nossos resultados demonstraram um decréscimo significativo no número de precursores hematopoiéticos da medula óssea nos animais infectados com *Listeria monocytogenes*, além de uma significativa hematopoiése extramedular. No entanto, quando os animais foram tratados profilaticamente com GR, independentemente da dose administrada, houve uma reversão da mielossupressão induzida pela infecção, resultando em níveis normais de CFU-GM.

Outro aspecto importante é com relação à produção de fatores estimuladores de colônias de células hematopoiéticas. Neste sentido, observamos que os animais infectados apresentaram uma maior atividade estimuladora de colônias no soro. A administração prévia de GR, nas quatro doses avaliadas, nos animais infectados, aumentou significativamente a atividade estimuladora do soro,

resultando em um aumento no número de CFU-GM em relação aos grupos apenas infectados.

Além disso, observamos também, um aumento do peso do baço dos animais infectados, enquanto que valores normais foram obtidos quando os animais receberam GR antes da infecção, em todas as doses administradas.

O tratamento com GR aumentou a resistência dos animais frente à listeriose, sendo que a probabilidade de sobrevida para as doses de 125, 250, 500 e 750 mg/Kg foi de 37,5, 37,5, 25 e 12,5%, respectivamente, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre si.

Nossos resultados sugerem que a GR possui uma potente atividade imunomoduladora, corroborando com resultados existentes na literatura e anteriormente obtidos em nosso laboratório. A ampla faixa terapêutica do composto frente à listeriose foi comprovada, visto que não houve uma alteração significativa entre as respostas imuno-hematopoiéticas nas doses avaliadas, sugerindo que mesmo em baixas concentrações, a GR é capaz de restaurar o sistema imunológico frente à infecção.



ABSTRACT

We evaluated in this work the effects of Royal Jelly (RJ) on growth and differentiation of bone marrow and spleen hematopoietic progenitors in *Listeria monocytogenes* (LM) infected mice. We also evaluated serum colony-stimulating activity, alterations in spleen weight and animal resistance front to the infection. In such way, BALB/c mice were profilactically treated with RJ by gavage for 7 consecutive days with doses at 125, 250, 500 and 750 mg/Kg. Three hours after the last treating day the animals were infected intraperitoneally with a sublethal dose of the bacteria (1×10^3 LM/animal). To evaluate animal resistance front to the infection we carried out a survival analysis with a lethal dose of the bacteria (1×10^5 LM/animal). Our results demonstrated significant decrease on the hematopoietic progenitor numbers in LM bearing mice and significant extramedullar hematopoiesis as consequence. In the other hand, myelosuppression induced by listeriosis was reverted when bearing mice were treated profilactically with all doses of RJ, resulting in normal levels of CFU-GM. Another important aspect regards colony-stimulating factor production by hematopoietic cells. In this direction, we observed that the infected animals presented higher serum colony-stimulating activity. Previous administration of RJ at all doses in infected mice significantly increased serum stimulatory activity as well as CFU-GM number when compared to non-treated bearing groups. We also observed spleen weight increase in the non-treated infected group at all doses, which contrasted with normal values obtained in previously treated bearing mice. In addition, the administration of RJ at 125, 250, 500 and 750 mg/Kg increased animal resistance front to listeriosis to 37,5%, 37,5%, 25% and 12,5%, respectively. Our results have demonstrated that RJ has a stimulating effect on the modulation of the immuno-hematopoietic

response in mice infected with LM. Moreover, the treatment with RJ increased survival rate in infected mice with lethal dose of the bacteria. We demonstrated that RJ presents extensive therapeutic dose range since the administration of all evaluated doses (125, 250, 500 and 750 mg/Kg) presented similar results.



INTRODUÇÃO

Geléia Real

A Geléia Real (GR) é uma substância secretada pelas glândulas mandibulares hipofaríngeas das abelhas operárias jovens quando têm à disposição água, pólen, mel e temperatura favorável (SVER et al., 1995). Possui aspecto viscoso, coloração branco-amarelada ou branco-acinzentada, levemente opalescente, de sabor ácido, picante ou doce e odor característico. Também conhecida como leite da abelha rainha, a GR é extremamente importante para a manutenção da colméia, pois serve de alimento para as larvas em desenvolvimento e para a abelha rainha por toda a sua vida, permitindo assim, que a mesma viva 60 vezes mais do que as abelhas operárias (HAYDAK & PALMER, 1942; HAYDAK, 1943; PRATT & HOUSE, 1949; WEAVER & KUIKEN, 1951).

Em decorrência da sua ação múltipla sobre o organismo humano, incluindo o aumento do apetite e do peso corporal, o aumento da resistência orgânica às infecções, a estimulação do metabolismo e do sistema imunológico, favorecendo a recuperação dos pacientes, a GR tem sido amplamente utilizada para a prevenção da senilidade. Além disso, outros efeitos são relatados, como a melhora do desempenho físico e intelectual, a diminuição do estresse e o embelezamento da pele, cabelo e unhas (CHO, 1977; KAMAKURA et al., 2001; KAMAKURA et al., 2002).

Por estes motivos, a GR é tida como sendo, provavelmente, a única substância do mundo capaz de desacelerar o curso natural do relógio biológico que determina o tempo de vida no reino animal (GARCIA-AMOEDO, 1999).

As funções da GR estão estritamente relacionadas com seus componentes ativos, tais como aminoácidos livres (arginina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, tireonina, triptofano e valina), proteínas (12-15%), açúcares (10-16%), ácidos graxos (3-6%) (principalmente o 10-hidroxidecanóico; 10-HDA), minerais (principalmente cálcio e ferro) e vitaminas (principalmente tiamina, niacina, riboflavina e ácido ascórbico) (WEAVER & KUIKEN, 1951; PATEL & HAYDAK GOCHNAVER, 1960; KARAALI, MEYDANOGLU & EKE, 1998; ALBERT et al., 1999; TANIGUCHI et al., 2003).

Inúmeras pesquisas têm demonstrado as propriedades imunomoduladoras da GR. Neste sentido, vale ressaltar que alguns experimentos foram realizados utilizando frações da substância, ou seja, ativos isolados; por outro lado, alguns estudos avaliaram os efeitos da administração da GR bruta.

OKA et al. (2001) constataram que a GR é capaz de suprimir reações alérgicas como consequência da restauração da função dos macrófagos e do equilíbrio da resposta celular por Th1/Th2, aumentando significativamente os níveis de GSH (glutathiona reduzida) nos macrófagos. Em adição, a administração da GR aumentou a expressão de IL-12 e a produção de NO (óxido nítrico), e diminuiu a síntese de PGE₂ (prostaglandina E₂) pelos macrófagos.

A atividade estimuladora da proliferação de monócitos humanos *in vitro* foi verificada por KIMURA et al. (1996), que isolaram algumas glicoproteínas da GR.

KOHASHI et al. (1980) demonstraram a presença, na GR, das neopterinas, que possuem a capacidade de induzir um aumento do número de monócitos e

macrófagos como consequência da estimulação da produção de IFN- γ (AIZAWA et al., 1998; HAMERLINCK, 1999).

Além disso, estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a GR possui propriedades imunomoduladoras, contribuindo assim para a proteção contra a mielossupressão induzida pelo Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) em camundongos na sua fase inespecífica (LUENGO et al., 2003 – submetido para publicação).

Outro aspecto importante da GR é a presença do 10-HDA, constituinte da fração lipídica e um de seus mais importantes compostos (BLOOD WORTH et al., 1995; BARKER et al., 1959). A sua atividade antibiótica foi motivo de estudo para BLUM, NOVAK & TABER (1959), que verificaram a sua ação antibacteriana e antifúngica.

Além disso, o 10-HDA apresenta 1/4 da atividade antimicrobiana da penicilina contra *Micrococcus piogenes*, e 1/5 da atividade da clortetraciclina contra *Escherichia coli* (NASSIS et al., 1995).

XU et al. (2002), em um trabalho recente, verificaram a ação anti-hiperlipidêmica do 10-HDA, que mostrou reduzir significativamente os níveis de triglicérides e de β -lipoproteínas em ratos hiperlipidêmicos, além de promover aumento nos níveis séricos de HDL-colesterol (SHEN et al., 1995)

Um derivado do 10-HDA, o diHDA-glicerol (1-(2-metoxietoximetil)2,3-(10-hidroxidecanol)(E) glicerol), foi sintetizado por POLLET et al. (2002), que demonstraram sua proteção contra *Salmonella typhimurium* em camundongos infectados.

Outra importante proteína presente na GR, denominada “Royalisin”, demonstrou possuir potente atividade antibacteriana contra certas bactérias Gram positivas, tais como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Leuconostoc* (FUJIWARA et al., 1990).

Com base na composição da GR e nos resultados obtidos com o produto nestes diversos trabalhos, buscamos demonstrar o poder imunomodulador da GR em camundongos frente à infecção pela bactéria *Listeria monocytogenes*.

Listeria monocytogenes

A infecção por *Listeria monocytogenes* em camundongos tem sido amplamente utilizada como modelo de interação entre parasita e hospedeiro para a avaliação da resposta imunológica, visto que possibilita o estudo da resistência do hospedeiro a bactérias intracelulares e facilita a compreensão dos efeitos produzidos pelo agente em estudo (HAHN & KAUFMANN, 1981).

Listeria monocytogenes é um pequeno bacilo Gram-positivo que não forma esporos e possui ação intracitoplasmática (KAUFMANN, 1993). É capaz de invadir e multiplicar-se em células não fagocíticas, podendo inicialmente infectar células epiteliais intestinais. A *Listeria* também consegue sobreviver no interior dos macrófagos, onde também se multiplica (KIM et al. 2001). Após ser fagocitada, a *Listeria monocytogenes* produz a Listeriolisina O (LLO), uma toxina que lisa o fagolisossomo permitindo sua saída para o citoplasma, onde ocorre sua proliferação e conseqüente migração para a célula adjacente (NISHIBORI et al., 1996; DRAMSI et al., 1998).

A resistência a esta bactéria está associada inicialmente a imunidade inata do hospedeiro seguida por uma resposta imune específica, o que garante a total eliminação do agente.

As células fagocitárias envolvidas na resposta imunológica frente à infecção são originárias das células primitivas pluripotenciais da medula óssea, denominadas células formadoras de colônia (CFCs), as quais podem dar origem a qualquer célula sangüínea, dependendo do estímulo recebido (METCALF, 1984; QUEIROZ, 1988). O crescimento e a diferenciação dessas células são moduladas pelos fatores estimuladores de colônias (CSFs) (METCALF, 1984, 1989).

Primeiramente, a infecção por *Listeria monocytogenes* ativa as células imunes e induz a cascata dos hormônios e citocinas (MACCANN et al., 1994). Macrófagos, células “natural-killer” (NK) e neutrófilos desempenham importante papel no estágio inicial da imunidade inata, e as células T estão envolvidas em outro estágio da imunidade antígeno-específica (COLAN & NORTH, 1994). Citocinas, incluindo interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-12 (IL-12), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ), responsáveis por mediar a formação de macrófagos, células dendríticas e células NK, são envolvidos na fase inicial dos mecanismos de defesa (DARLYMPLE et al., 1995). As células NK são a maior prova da produção de IFN- γ neste período (HARTY & BEVAN, 1996). IFN- γ ou genes receptores para IFN- γ são responsáveis pela susceptibilidade a infecção primária por *Listeria monocytogenes* (FARRAR & SCHREIBER, 1993). Neste sentido, IL-12 e TNF- α , como são produtos ativadores de macrófagos são os maiores ativadores das células NK para a síntese e

secreção de IFN- γ e sua secreção (KISHIKAWA & LAWREMCE, 1997). Sendo assim, IL-12 e TNF- α têm efeito sinérgico na produção de IFN- γ (TRIPP & UNANUE, 1993). Por outro lado, a super-ativação do gene da IL-6 leva à exacerbação da infecção por *Listeria monocytogenes* e ao decaimento das funções de neutrófilos e macrófagos (DARLYMPLE et al., 1995). A iniciação da resposta inflamatória é de grande importância na resistência à infecção primária por *Listeria monocytogenes* bem como na indução dos fatores ativadores de macrófagos, como o IFN- γ . Todavia, a existência de uma via independente de IFN- γ para a defesa contra esta bactéria tem sido observada em ratos (HARTY & BEVAN, 1995). No entanto, o IFN- γ tem papel crítico nesta resistência e não deve ser deixado de lado, visto que em altas concentrações promove a ativação do macrófago conduzindo a uma maior expressão das moléculas da classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC classe II), o qual apresenta um sistema específico do organismo contra a bactéria, atuando na erradicação da infecção, através da ação de células T CD4⁺ CD8⁺ α/β e CD4⁻ CD8⁻ γ/δ (KIM et al., 2001).

Mediante todos os resultados já obtidos que relatam a atividade imunomoduladora da Geléia Real em conjunto à ausência de estudos mais aprofundados sobre a atividade protetora da Geléia Real em infecções bacterianas imunocomprometedoras, realizamos neste trabalho, utilizando o modelo experimental de infecção pela *Listeria monocytogenes*, a avaliação de suas propriedades imunomoduladoras. Os parâmetros avaliados foram o crescimento e

a diferenciação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea e do baço, a produção de fatores estimuladores de colônias de células hematopoiéticas e as alterações do peso do baço na vigência da infecção. A sobrevivência dos animais tratados com GR frente a uma dose letal de *Listeria monocytogenes* também foi avaliada.



OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos imuno-hematopoiéticos da administração da Geléia Real (GR) em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*. Os parâmetros avaliados foram:

- o número de precursores hematopoéticos da medula óssea e baço;
- a produção dos fatores estimuladores de colônias de células precursoras hematopoéticas;
- a resistência do animal à uma dose letal de *Listeria monocytogenes*;
- o peso do baço (presença de esplenomegalia).



MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS:

1. Animais:

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos BALB/c machos com idade entre 8 e 10 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP. Após obtenção, os animais foram divididos (6 animais por grupo) e submetidos ao tratamento de acordo com o protocolo experimental, a saber:

- a) animais controle, sem tratamento;
- b) animais tratados com Geléia Real (GR) (125, 250, 500 e 750 mg/Kg) durante 7 dias;
- c) animais infectados com *Listeria monocytogenes*;
- d) animais tratados com GR (125, 250, 500 e 750 mg/Kg) e infectados.

As doses de GR e *Listeria monocytogenes* que foram utilizadas neste trabalho foram estabelecidas baseadas em estudos preliminares realizados em nosso laboratório (QUEIROZ et al., 2003).

2. *Listeria monocytogenes*:

A bactéria *Listeria monocytogenes* utilizada para infectar os animais é um cocobacilo Gram-positivo, anaeróbio facultativo, móvel por flagelos peritríqueos a temperatura ambiente, facilmente cultivável em Ágar-Sangue.

Esta cepa foi gentilmente cedida pelo laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica (Hospital da Clínicas-UNICAMP). Após a aquisição a bactéria foi submetida a vários testes bioquímicos que confirmaram a sua identidade. Os testes realizados demonstraram o seguinte:

- Oxidase – positivo
- Catalase – positivo
- Carboidratos – ação fermentativa
- Xilose – negativo
- Manitol – negativo
- Bili esculina – positivo
- Beta hemólise – positivo
- CAMP-Test: - *Staphylococcus aureus* – positivo
- *Rhodococcus equi* – negativo

Para a manutenção da patogenicidade desta bactéria, a mesma foi periodicamente repassada em camundongos, através da inoculação intraperitoneal da *Listeria monocytogenes* em solução salina 0,9%. Quarenta e oito horas após a inoculação deste microorganismo os baços dos camundongos foram isolados em ambiente estéril, macerados e mantidos em BHI por 24-48 horas. Para a obtenção das colônias, a *Listeria monocytogenes* foi plaqueada em Ágar-Sangue e incubada por 24 horas em estufa a 37° C. Após o isolamento das colônias de bactérias, estas foram diluídas até atingir a concentração apropriada para o uso.

No momento da infecção dos animais, foi necessário determinar o número ideal de microorganismos a ser injetado. A dose ideal não deve provocar a morte do animal muito rapidamente, para que seja possível a avaliação dos parâmetros propostos após a infecção. Desta forma, a bactéria foi incubada em meio de cultura BHI por 24-48 horas a 37° C. As colônias obtidas das culturas frescas de

Ágar-Sangue foram diluídas em solução salina a 0,9% e as concentrações determinadas por espectrofotometria através da Escala de Mc-Farland (Vitek colorimeter).

Para o estudo dos parâmetros imunológicos e hematológicos foi utilizada a dose subletal de $1,5 \times 10^3$ bactérias/animal. Para a avaliação da sobrevivência dos animais foi necessário utilizar uma concentração letal de $1,5 \times 10^5$ bactérias/animal, a qual foi inoculada intraperitonealmente. A inoculação foi feita no sétimo dia de tratamento, 3 horas após a última dose de GR.

A resposta hematopoiética foi avaliada 24, 48 e 72 horas após infecção.

3. Tratamento:

3.1 Geléia Real:

A amostra de GR foi adquirida do Apiário Lambertucci de comercialização de produtos apícolas. As amostras foram mantidas sob refrigeração a -18°C e ao abrigo da luz, desde o momento do recebimento até o momento do experimento.

Para o tratamento dos animais, a GR foi diluída em água estéril e administrada nas doses de 125, 250, 500 e 750 mg/Kg por via oral, durante 7 dias consecutivos.

4. Cultura clonal de precursores hematopoiéticos da medula óssea e baço de camundongos (CFU-C):

Para enumerar estas células clonogênicas é importante que todas as células multipotenciais presentes na cultura sejam induzidas a proliferar e que as condições de cultura sejam ajustadas para se evitar a superposição de colônias na

placa de petri e permitir a identificação de cada colônia. Também é importante que o fator estimulador de colônias SCM seja utilizado em condições máximas. Além disso, a escolha do soro fetal bovino deve ser feita cuidadosamente devido a variação na atividade dos vários lotes e marcas.

4.1 Medula Óssea:

Após sacrificar os animais por deslocamento cervical realizamos uma antissepsia da pele com álcool 70%. Após exposição do fêmur, removemos a cartilagem sobre o orifício na extremidade distal e cortamos o osso na junção superior.

A medula óssea foi transferida com auxílio de agulha de seringa para um tubo contendo 5 mL de meio RPMI-1640 (Cultilab).

O número de células na suspensão foi contado em câmara hematocimétrica após diluição 1:10 das células em azul de tripan 1% e a concentração da suspensão celular ajustada para 1×10^5 células/mL.

4.2 Baço:

Após a retirada da medula óssea realizamos uma pequena incisão na região lateral esquerda da cavidade peritoneal e o baço foi removido com auxílio de uma pinça, sendo em seguida lavado em solução salina estéril e transferido para um tubo contendo 9 mL de meio RPMI-1640. A seguir o baço dos animais foi macerado para obtenção de uma suspensão celular.

O número de células na suspensão foi contado em câmara hematocimétrica após diluição 1:20 das células em azul de tripan 1% e a concentração ajustada para 2×10^5 células/mL.

4.3 Preparação das placas de cultura da medula óssea e baço em meio semi-sólido:

Preparou-se o meio mais ágar (Bacto-ágar-Difco) o qual consiste em:

- 30% de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Sigma) 2x concentrado;
- 20% de soro bovino fetal (SFB);
- 50% de ágar (concentração final 0,3%).

A seguir, adicionamos ao meio descrito, o volume apropriado de células (1×10^5 células/mL para a medula óssea e 2×10^5 células/mL para o baço) e distribuímos volumes de 2 mL em cada placa de petri (35mm), já contendo 100µL do estímulo apropriado (SCM). Deixamos geleificar e incubamos por 7 dias a 37° C em presença de 5% de CO₂. Após este período contamos o número de colônias formadas em microscópio de dissecação em aumento de 40 vezes.

Para estudo morfológico, as colônias foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (v/v) e coradas com Luxol Fast Blue/Leishman.

5. Preparação do meio condicionado de células esplênicas (SCM):

Baços de camundongos BALB/c foram removidos sob condições assépticas e passados delicadamente através de peneira de aço inoxidável estéril.

Preparamos uma suspensão com 2×10^6 células/mL em meio RPMI-1640 (Sigma) contendo 10% de soro fetal bovino.

Adicionamos ao meio 5×10^{-5} moles/L de 2-mercaptoetanol e 1,65µg/mL de "pokeweed mitogen".

Incubamos por 7 dias a 37° C em estufa úmida contendo 5% de CO₂ no ar.

Centrifugamos o sobrenadante e filtramos em membranas de 0,45µm (Millipore).

A atividade funcional do CSF foi determinada através dos estímulos produzidos sobre o crescimento clonal de células progenitoras hematopoiéticas em meio semi-sólido.

A titulação deste lote de SCM demonstrou que uma diluição de até 1:4 forneceu resultados que estão dentro dos níveis de resposta máxima. Os resultados em duplicata da titulação realizada em cultura de 7 dias estão apresentados na tabela abaixo.

Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) em presença de células de medula óssea de camundongos BALB/c:

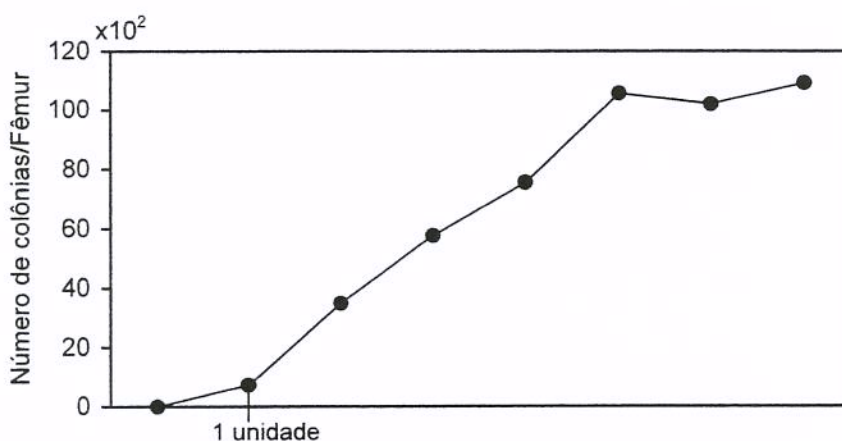
DILUIÇÃO SCM	CFU-C x 10² *
1:1	109,2 ± 4,2
1:2	102 ± 3,5
1:4	105,6 ± 5,1
1:8	75,6 ± 4,2
1:16	57,6 ± 4,0
1:32	34,8 ± 3,0
1:64	7,2 ± 1,2
1:168	0

* Número total de células por fêmur
Resultados obtidos em duplicata por diluição

6. Obtenção do soro dos animais para detecção da atividade dos fatores estimuladores de colônia:

O sangue dos animais foi obtido através de punção cardíaca sendo preparado em “pools”, centrifugado para obtenção do soro e armazenado a -20° C.

A presença de fatores estimuladores de colônias no soro dos animais em questão foi determinada pela sua capacidade promotora do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea de animais normais. A atividade estimuladora de colônia foi expressa em unidades/mL e determinada a partir da curva de titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) (QUEIROZ et al., 2003).



7. Realização da curva de sobrevida:

Para o estudo dos efeitos do tratamento com a GR na sobrevida dos animais infectados com *Listeria monocytogenes*, estes foram divididos em quatro grupos experimentais: infectados; tratados com GR 125 mg/Kg e infectados; tratados com GR 250 mg/Kg e infectados; tratados com GR 500 mg/Kg e infectados; tratados com GR 750 mg/Kg e infectados ($n=20/\text{grupo}$). Todos os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^5$ bactérias/animal) 3 horas após a última dose de GR. Em seguida, os animais foram observados por um período de 30 dias.

8. Peso do baço dos animais submetidos aos referidos tratamentos:

8.1 Peso do Baço:

Após a remoção do baço como descrito no item 4.2, seu peso foi mensurado em gramas para posterior análise.

9. Análise estatística:

A Análise de Variância foi utilizada para avaliar as variáveis CFU-C/fêmur; CFU-C/baço; fatores estimuladores de colônias e pesos do baço. O teste de Tukey foi utilizado quando a análise de variância detectava diferenças significativas entre os grupos.

A curva de sobrevivência dos animais foi representada pelo método descrito por Kaplan-Maier, 1958 (COLLET, 1994). A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Log-rank (procedimentos não paramétricos).

Em todos os grupos estudados, considerou-se estatisticamente significativos aqueles cujos valores de P foram $< 0,05$.



RESULTADOS

1. Efeitos da GR sobre o número de precursores hematopoiéticos da medula óssea e do baço de camundongos (CFU-C):

1.1. Medula Óssea:

Os resultados obtidos nesta avaliação estão representados na figura 1 e tabelas 1, 2 e 3 (apêndice).

O tratamento de animais normais com as quatro doses GR analisadas (125, 250, 500 e 750 mg/Kg) não produziu alterações na resposta mielopoiética, em relação ao grupo controle. No entanto, a infecção com *Listeria monocytogenes* nas 48 e 72 horas, causou uma redução significativa no número de CFU-C em relação ao controle (n=6, $P<0,001$ – ANOVA, Tukey) e também em relação à infecção nas primeiras 24 horas (n=6, $P<0,001$ – ANOVA, Tukey).

É interessante observarmos nesta figura, que o tratamento com GR normalizou os níveis de CFU-C em todos os grupos infectados, indicando que o tratamento profilático com este composto de origem animal conseguiu prevenir a supressão medular induzida pela infecção bacteriana (n=6, $P<0,001$ – ANOVA, Tukey).

Outro aspecto importante a ser observado neste resultado é a ausência de diferenças significativas entre as quatro doses de GR analisadas, indicando que esta substância possui uma ampla faixa terapêutica.

1.2. Baço:

Os resultados obtidos nesta avaliação estão representados na figura 2 e tabelas 4, 5 e 6 (apêndice).

Nesta avaliação, mais uma vez verificamos ausência de alterações no número de CFU-C na cultura clonal de células esplênicas após o tratamento profilático dos camundongos normais com as quatro doses GR analisadas (125, 250, 500 e 750 mg/kg). Além disso, estes resultados foram similares ao grupo controle sem tratamento. No entanto, quando os animais foram infectados com *Listeria monocytogenes*, a hematopoiese extramedular foi evidente em 48 e 72 horas após a infecção, pois o número de CFU-C apresentou-se significativamente aumentado em relação aos animais controle (n=6, $P < 0,001$ - ANOVA, Tukey). Porém, quando os animais infectados foram profilaticamente tratados com GR por 7 dias consecutivos, não observamos a presença de hematopoiése extramedular, visto que o número de CFU-C obtido foi semelhante ao do grupo controle.

Nesta avaliação, também não verificamos diferenças na resposta hematopoiética extramedular entre as quatro doses testadas.

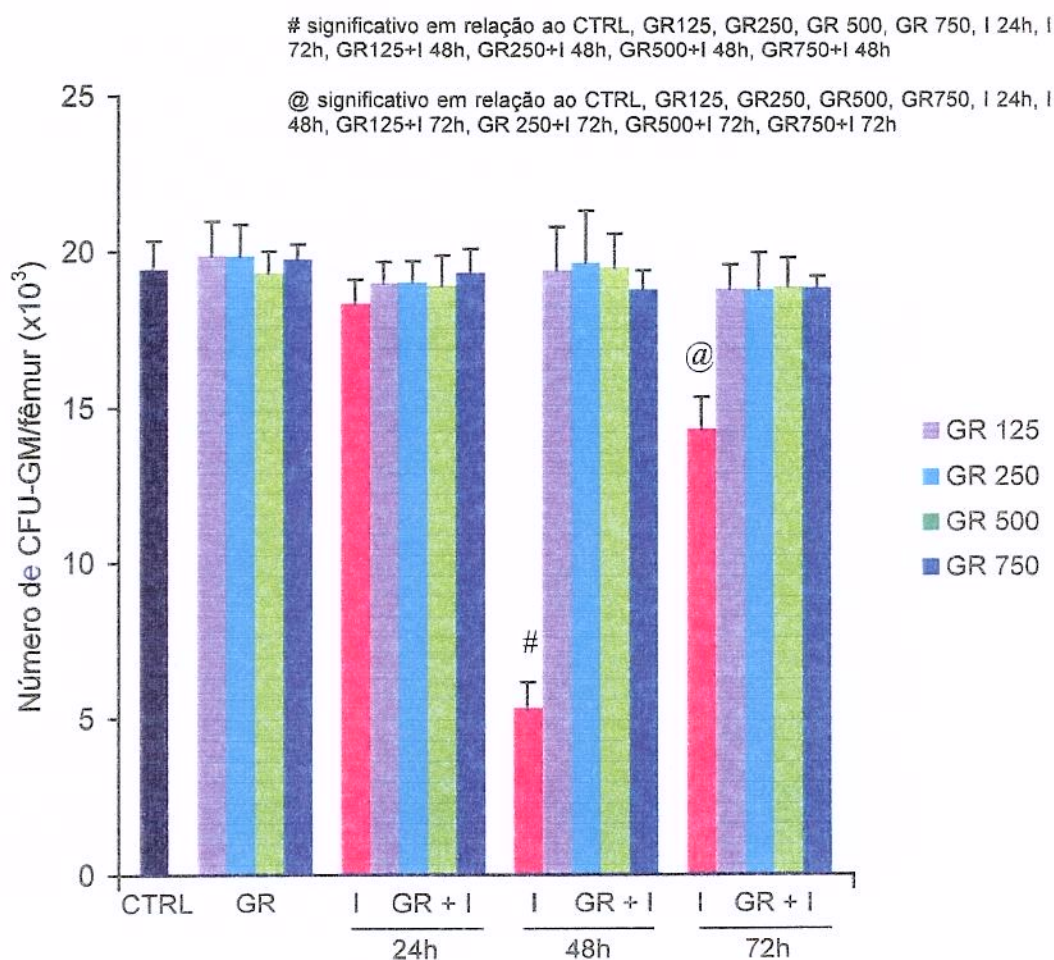


Figura 1. Avaliação dos efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^3$ bactérias/animal – via intraperitoneal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção (n=6, P<0,001 ANOVA-Tukey).

CTRL: controle

GR125: tratados com GR (125mg/Kg) durante 7 dias

GR250: tratados com GR (250mg/Kg) durante 7 dias

GR500: tratados com GR (500mg/Kg) durante 7 dias

GR750: tratados com GR (750mg/Kg) durante 7 dias

I: infectados

GR125+I: tratados com GR (125 mg/Kg e infectados com LM

GR250+I: tratados com GR (250 mg/Kg) e infectados com LM

GR500+I: tratados com GR (500 mg/Kg) e infectados com LM

GR750+I: tratados com GR (750 mg/Kg) e infectados com LM

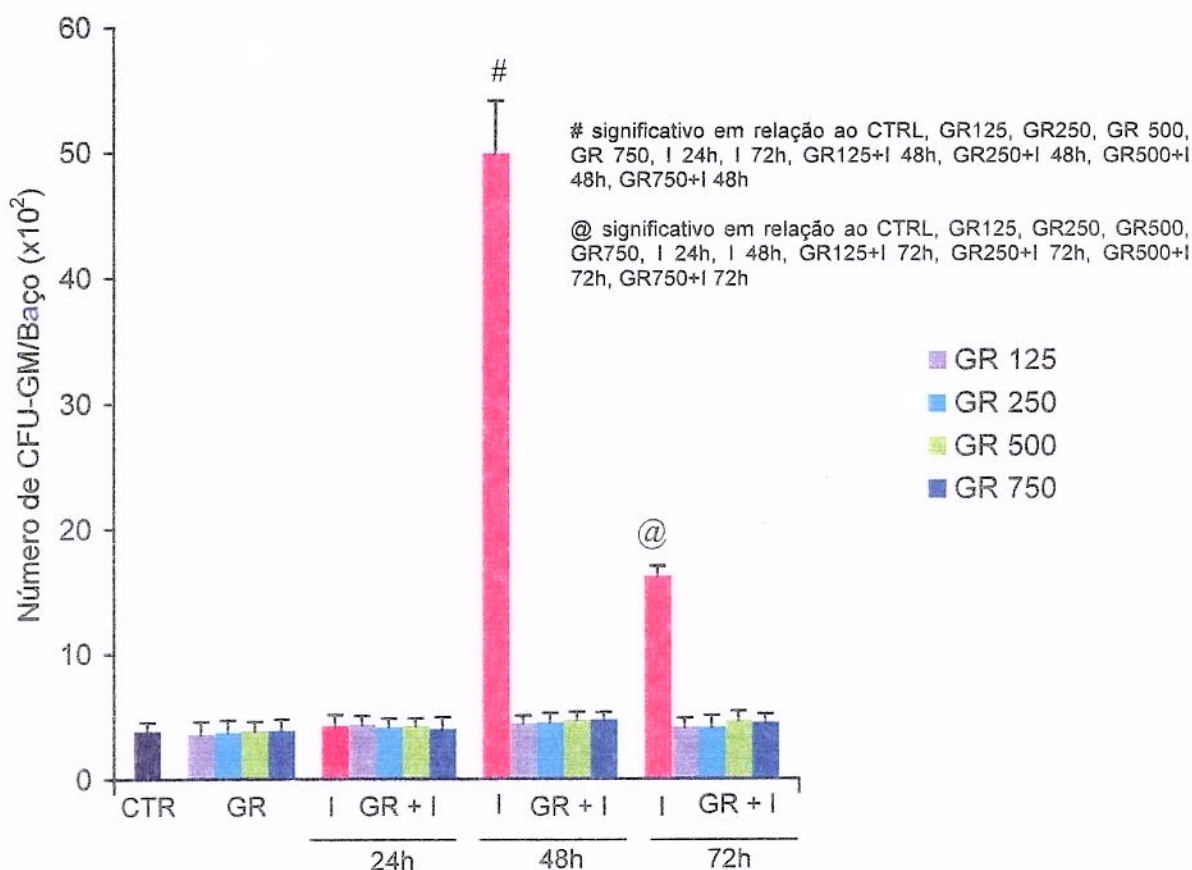


Figura 2. Avaliação dos efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos do baço de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^3$ bactérias/animal – via intraperitoneal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção (n=6, $P < 0,001$ ANOVA-Tukey).

CTRL: controle

GR125: tratados com GR (125mg/Kg) durante 7 dias

GR250: tratados com GR (250mg/Kg) durante 7 dias

GR500: tratados com GR (500mg/Kg) durante 7 dias

GR750: tratados com GR (750mg/Kg) durante 7 dias

I: infectados

GR125+I: tratados com GR (125 mg/Kg) e infectados com LM

GR250+I: tratados com GR (250 mg/Kg) e infectados com LM

GR500+I: tratados com GR (500 mg/Kg) e infectados com LM

GR750+I: tratados com GR (750 mg/Kg) e infectados com LM

2. Efeitos da GR sobre a produção de fatores estimuladores de colônias:

A produção de fatores estimuladores de colônias foi expressa em unidades/mL, conforme descrito no item 6 de material e métodos.

O soro de animais que não receberam tratamento (grupo controle) apresentaram apenas 1 unidade/mL de fator estimulador de colônias (figura 3, tabelas 7, 8 e 9 – apêndice). No entanto, quando os animais foram previamente tratados com doses de 125, 250, 500 e 750 mg/Kg de GR, estes valores subiram para 3,9, 3,8 e 3,7 unidades/mL, respectivamente. Esta diferença foi estatisticamente significativa em relação ao controle ($n=6$, $P<0,01$ – ANOVA, Tukey). Este aumento na concentração dos fatores estimuladores de colônias em relação aos animais controles ainda mais evidente foi obtido nos grupos de animais apenas infectados com *Listeria monocytogenes*, para os três períodos estudados (24, 48 e 72 h), sendo que o pico máximo da atividade estimuladora de colônias foi observado 48 h após a infecção ($n=6$, $P<0,01$ – ANOVA, Tukey). Nestes grupos infectados, o tratamento profilático com a GR por 7 dias consecutivos produziu um aumento adicional na produção dos fatores estimuladores de colônias em relação aos grupos apenas infectados ($n=6$, $P<0,01$ – ANOVA, Tukey).

Outro aspecto importante a ser analisado neste resultado, é que novamente não houve diferença significativa entre os grupos tratados com as quatro doses de GR (125, 250, 500 e 750 mg/Kg).

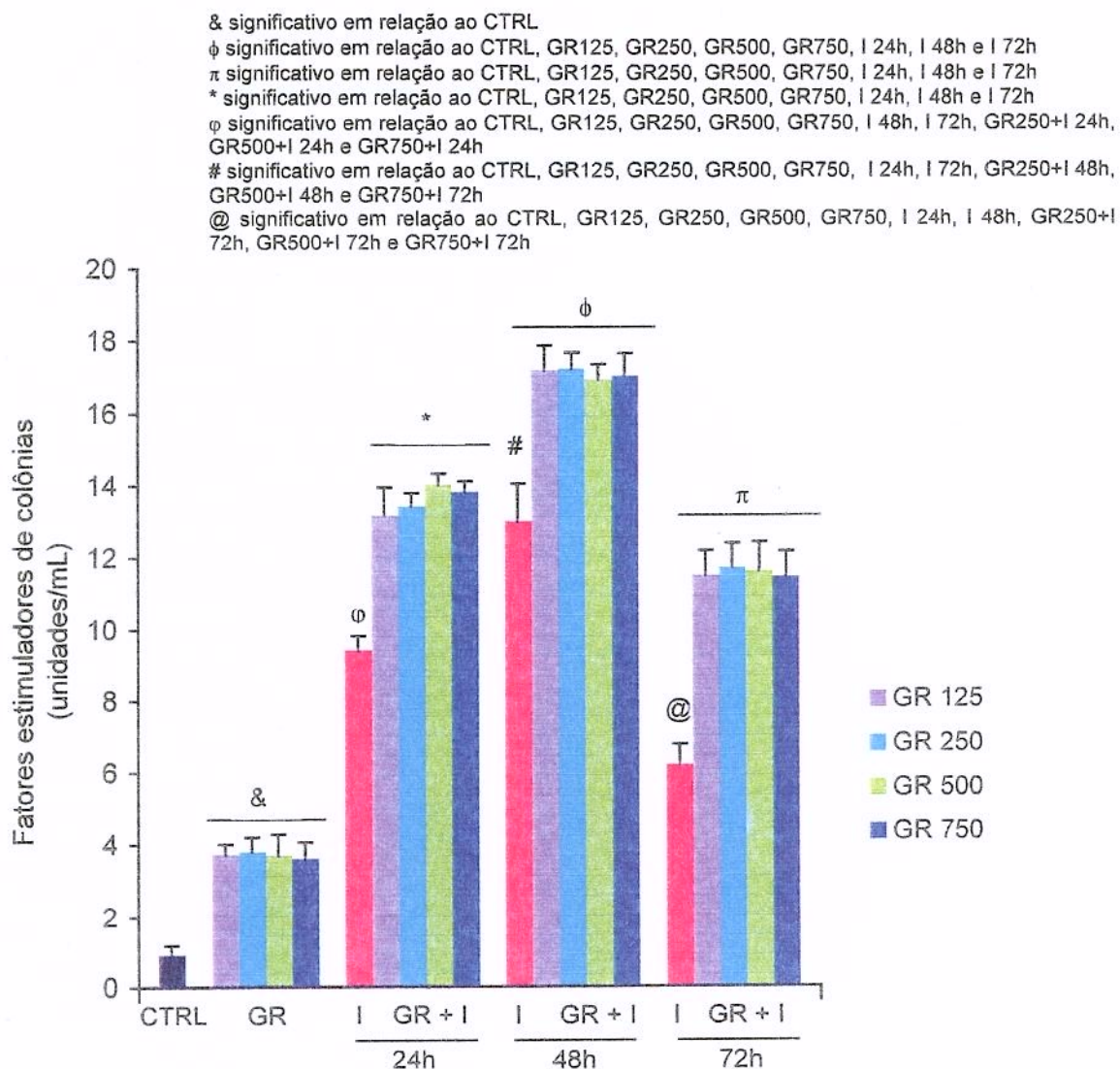


Figura 3. Avaliação dos efeitos da GR sobre a produção de fatores estimuladores de colônias de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^3$ bactérias/animal – via intraperitoneal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção ($n=6$, $P<0,01$ ANOVA-Tukey).

CTRL: controle

GR125: tratados com GR (125mg/Kg) durante 7 dias

GR250: tratados com GR (250mg/Kg) durante 7 dias

GR500: tratados com GR (500mg/Kg) durante 7 dias

GR750: tratados com GR

I: infectados

GR125+I: tratados com GR (125 mg/Kg e infectados com LM

GR250+I: tratados com GR (250 mg/Kg) e infectados com LM

GR500+I: tratados com GR (500 mg/Kg) e infectados com LM

GR750+I: tratados com GR (750 mg/Kg) e infectados com LM

3. Efeitos da GR na sobrevida de animais infectados com dose letal de *Listeria monocytogenes*:

A figura 4 mostra os resultados obtidos nesta avaliação. Assim sendo, podemos observar que os animais apenas infectados apresentaram um índice de mortalidade de 100% até o sexto dia após a infecção. O tratamento profilático com a GR por 7 dias consecutivos aumentou a resistência dos mesmos à *Listeria monocytogenes*, resultando em 37,5%, 37,5%, 25% e 12,5% de sobrevida com as doses de 125, 250, 500 e 750 mg/kg, respectivamente ($P < 0,05$ – Curva de Kaplan-Maier, teste de Log-Rank).

Outro aspecto considerável é o fato de que a dose de 125 mg/Kg apresentou resultados semelhantes a dose de 250 mg/kg, 500 mg/Kg e 750 mg/Kg, sugerindo que a diminuição da dose não implica na redução de seus efeitos terapêuticos.

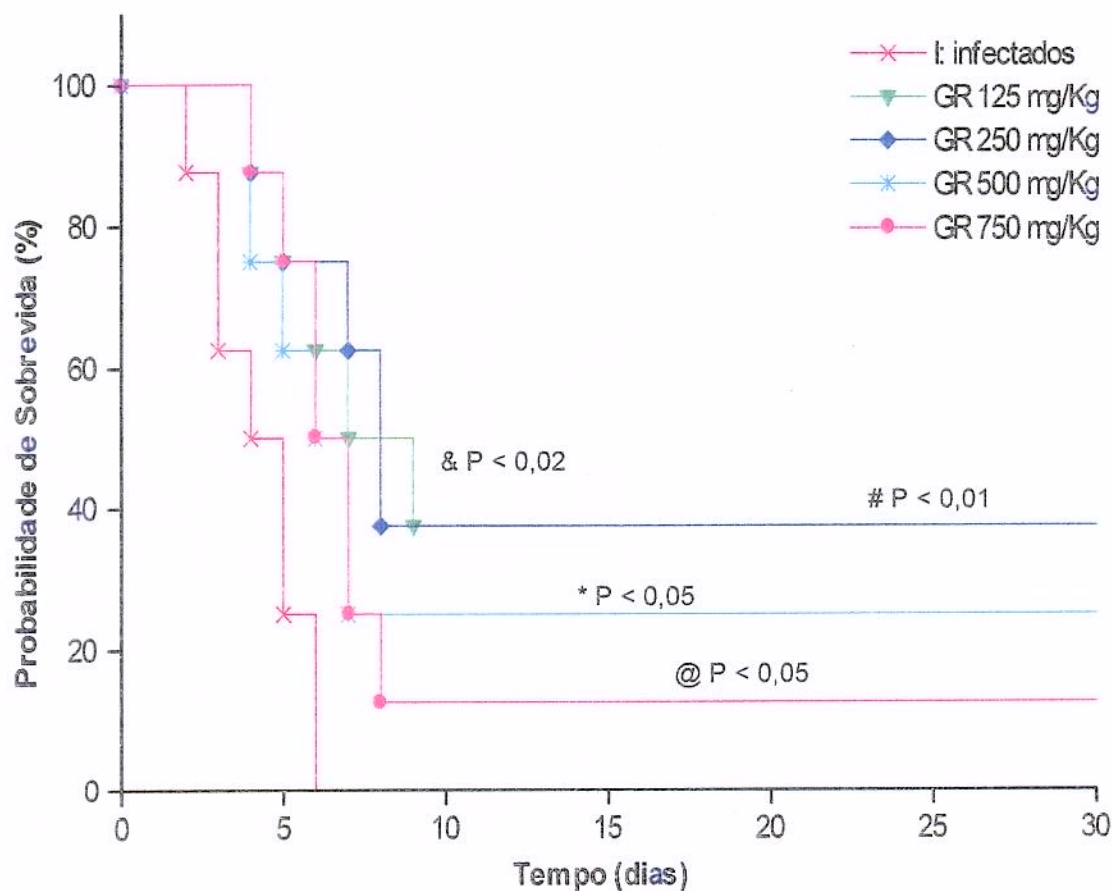


Figura 4. Avaliação dos efeitos da GR (125 mg/Kg, 250 mg/Kg, 500 mg/Kg, 750 mg/Kg) na sobrevida de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^5$ bactérias/animal), (n=20, Curva de Kaplan-Maier, Long Rank; &P<0,02, #P<0,01, *P<0,05 e @P<0,05) em relação ao grupo apenas infectado.

4. Efeitos da GR sobre o peso do baço dos animais:

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na figura 5 e tabelas 10, 11 e 12 (apêndice).

Os resultados obtidos nesta avaliação foram coerentes com aqueles verificados no estudo da hematopoiése extramedular. Desta forma, novamente não verificamos diferenças significativas entre o peso do baço dos animais tratados com as quatro doses de GR (125, 250, 500 e 750 mg/kg) em relação ao grupo controle não tratado. Por outro lado, nos grupos infectados com *Listeria monocytogenes*, nas primeiras 24 horas já observamos um aumento significativo no peso esplênico, em relação ao controle (n=6, $P<0,05$ – ANOVA, Tukey). Este aumento foi ainda mais evidente 48 e 72 horas após a infecção, visto que o peso deste órgão aumentou significativamente em relação ao grupo apenas infectado nas 24 horas (n=6, $P<0,01$ – ANOVA, Tukey). Entretanto, quando estes animais foram previamente tratados com GR nas quatro doses analisadas (125, 250, 500 e 750mg/Kg), o aumento deste órgão foi prevenido, atingindo pesos similares aos grupos controle.

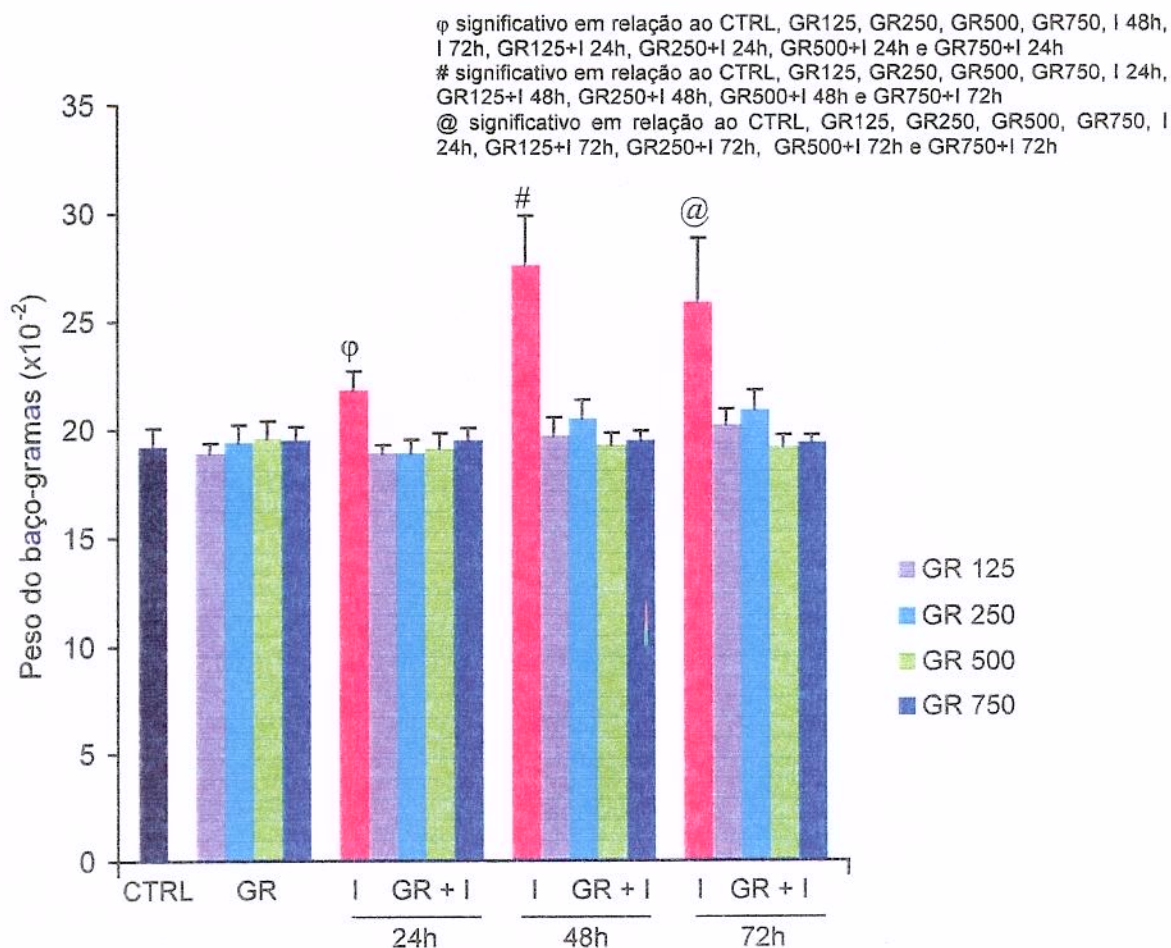


Figura 5. Avaliação dos efeitos da GR sobre o peso do baço de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^3$ bactérias/animal – via intraperitoneal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção (n=6, P<0,05 ANOVA-Tukey).

CTRL: controle

GR125: tratados com GR (125mg/Kg) durante 7 dias

GR250: tratados com GR (250mg/Kg) durante 7 dias

GR500: tratados com GR (500mg/Kg) durante 7 dias

GR750: tratados com GR (750mg/Kg) durante 7 dias

I: infectados

GR125+I: tratados com GR (125 mg/Kg e infectados com LM

GR250+I: tratados com GR (250 mg/Kg) e infectados com LM

GR500+I: tratados com GR (500 mg/Kg) e infectados com LM

GR750+I: tratados com GR (750 mg/Kg) e infectados com LM



DISCUSSÃO

A infecção por *Listeria monocytogenes*, um potente estimulador da resposta imunológica inata em camundongos, representa um modelo de interação parasita-hospedeiro que compromete significativamente o sistema hematopoiético (MACKANESS, 1962; HAHN & KAUFMANN, 1981). Animais infectados com este microorganismo apresentam um decréscimo no número de células progenitoras da medula óssea, principalmente de macrófagos e neutrófilos, e um aumento na atividade dos fatores estimuladores de colônia do soro (DANTAS & QUEIROZ, 1999). Estes, por sua vez, são responsáveis pela modulação do crescimento e diferenciação das células fagocitárias envolvidas na resposta imunológica inespecífica frente a esta infecção (METCALF, 1984, 1989).

O mecanismo inicial de defesa em decorrência da listeriose consiste na ativação das células imunocompetentes e na indução da cascata de hormônios e citocinas (MACCANN et al., 1994). Neste primeiro estágio, um papel importante é desempenhado por macrófagos, células NK e neutrófilos, originados, em parte, pela ação de algumas citocinas, especialmente IL-6, IL-12, TNF- α e IFN- γ , sendo que IL-12 e TNF- α são os maiores ativadores das células NK para a síntese de IFN- γ . Em contrapartida, a ativação exagerada do gene da IL-6 leva a exacerbação da infecção por *Listeria monocytogenes* e ao decaimento das funções de neutrófilos e macrófagos (DARLYMPE et al., 1995).

Assim sendo, nossos resultados confirmam estes achados, visto que o comprometimento da resposta imunológica nos animais infectados com *Listeria monocytogenes* manifestou-se através de uma diminuição significativa no número de precursores mielóides da medula óssea de camundongos nos períodos de 48 e

72 horas após a infecção, quando comparados com animais controle não infectados. Em paralelo a diminuição de células progenitoras da medula óssea verificamos, nestes animais, um aumento significativo do número de precursores no baço em decorrência da hematopoiese extramedular.

O comprometimento de órgãos linfóides, como o baço, na presença da infecção por *Listeria monocytogenes* foi mais uma vez confirmado quando analisamos o peso deste órgão, o qual apresentou-se significativamente aumentado. Este achado em modelo de infecção com *Listeria monocytogenes* está bem definido na literatura, uma vez que inúmeros trabalhos demonstram uma migração das células fagocitárias originárias da medula óssea para o baço, local de replicação da bactéria, como um componente essencial à resposta primária à listeriose (BENNET & BAKER, 1997; QUEIROZ et al., 2003).

Desta forma, diante das inúmeras alterações causadas pela *Listeria monocytogenes* na resposta imuno-hematopoiética do hospedeiro, seu uso como modelo experimental tem contribuído de maneira significativa na identificação de novos compostos com propriedades imunomoduladoras (CHEERS & STANLEY, 1988; BINCOLETTO & QUEIROZ, 1996). Neste sentido, utilizando este modelo experimental de listeriose murina, nosso grupo de estudos tem contribuído para o crescimento da área da imunofarmacologia, identificando propriedades imunomoduladoras em compostos de origem vegetal (DANTAS & QUEIROZ, 1999; QUEIROZ et al., 2003).

Dando continuidade a estes estudos, com na ação múltipla da Geléia Real (GR) sobre o organismo humano e também devido ao crescente uso desta substância pela população em geral, tendo como base na maioria dos casos os

conhecimentos da medicina popular, investigamos as possíveis propriedades imunomoduladoras deste composto sobre a resposta imuno-hematopoiética do hospedeiro frente à infecção por *Listeria monocytogenes*.

Rica em nutrientes e quimicamente bem definida, a GR tem suas funções estritamente relacionadas aos seus componentes ativos, tais como aminoácidos livres, proteínas (12-15%), açúcares (10-16%), ácidos graxos (3-6%) e vitaminas (WEAVER & KUIKEN, 1951; PATEL, HAYDAK & GOCHNAVER, 1960; KARAALI, MEYDANOGLU & EKE, 1989; OKAMOTO et al., 2003). Muitos autores têm relatado o sucesso obtido com a GR, especialmente devido a ação do 10-HDA (ácido 10-hidroxidecanóico), constituinte de sua fração lipídica e um de seus principais componentes (BARKER et al., 1959; FAN et al., 1999; GENC & ASLAN, 1999).

Dotado de uma potente atividade antibiótica, o 10-HDA foi motivo de estudo para BLUM et al. (1959), que demonstraram sua ação antibacteriana e antifúngica. Estudos posteriores demonstraram uma relação entre a atividade antimicrobiana do 10-HDA com a atividade da penicilina e da clortetraciclina contra *Micrococcus piogenes* e *Escherichia coli* (NASSIS et al., 1995). Além disso, outra importante proteína presente na GR, denominada “Royalisin” também demonstrou possuir potente atividade antibacteriana contra certas bactérias Gram-positivas, tais como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Leuconostoc* (FUJIWARA et al., 1990).

Assim sendo, nossos resultados corroboram estes achados, visto que a administração profilática da GR por sete dias consecutivos em animais infectados com *Listeria monocytogenes* reverteu as alterações hematopoiéticas medular e extramedular produzidas pela infecção, aumentando assim, a probabilidade de

sobrevida dos animais tratados quando comparados ao grupo controle, sugerindo, desta maneira, que o composto aumenta a resistência à infecção de forma significativa.

Além desta ação antimicrobiana *in vivo*, descrita na literatura, nossos resultados também sugerem que a GR é capaz de normalizar a resposta imuno-hematopoiética do hospedeiro frente à listeriose. OKA et al. (2001) constataram que este composto é capaz de suprimir reações alérgicas por restaurar a função dos macrófagos e equilibrar a resposta imunológica por Th1/Th2, aumentando significativamente os níveis de GSH (glutationa reduzida) nos macrófagos. Em adição, a administração desta substância aumenta a expressão de IL-12 e a produção de óxido nítrico (NO), em paralelo a diminuição da síntese de prostaglandina-E₂ (PGE₂). Estes mediadores imunológicos são essenciais para a resistência à infecção por esta bactéria. Da mesma forma, a capacidade de induzir um aumento do número de monócitos e macrófagos, como consequência da estimulação da produção de IFN- γ pelas neopterinas, outro importante constituinte da fração lipídica da GR (HAMERLINK, 1999), deve ser levado em consideração, visto que elevadas concentrações de IFN- γ promovem a ativação de macrófagos, conduzindo a uma maior expressão das moléculas da classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC classe II). O MHC, por sua vez, é o grande responsável pela apresentação de um segundo sistema de defesa do organismo contra a bactéria, o qual atua de maneira específica na erradicação da infecção, através da ação das células T CD4⁺CD8⁺ (MOMBAERTS et al., 1993).

Os resultados obtidos em nosso trabalho demonstraram relação com estes estudos, visto que ocorreu uma ação hematoprotetora nos camundongos tratados profilaticamente com GR e infectados com *Listeria monocytogenes*, quando comparados ao grupo apenas infectado. Notamos, no entanto, que a GR não apresentou potencial imunoestimulante sobre a hematopoiese, uma vez que não houve diferença significativa no número de precursores hematopoiéticos da medula óssea e do baço dos animais apenas tratados quando comparamos com o grupo controle não-tratado e não-infectado. No entanto, há um aumento da atividade estimuladora de colônias do soro em animais normais, apenas tratados com GR.

Outro resultado obtido recentemente por nosso grupo de estudos com este composto, foi a ausência de atividade antimicrobiana contra bactérias anaeróbias e aeróbias Gram-positivas *in vitro* (dados não publicados). Estes achados mais uma vez demonstram que a ação protetora da GRI frente ao processo infeccioso deve-se em grande parte ao seu efeito imunomodulador. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho, mostrando que a Geléia Real é capaz de normalizar a resposta hematopoiética medular e extramedular frente à listeriose, deixa claro que este composto é capaz de modular positivamente o sistema imunológico na vigência da infecção.

Estes dados foram mais uma vez confirmados, quando avaliamos a resistência dos animais infectados através da análise da sobrevida, visto que os camundongos previamente tratados com Geléia Real demonstraram maior resistência à infecção com uma probabilidade de sobrevida significativamente superior em relação aos animais apenas infectados.

Outro ponto interessante e que cabe ressaltarmos são os resultados obtidos com as diferentes doses analisadas (125, 250, 500 e 750 mg/Kg). No que diz respeito ao número de precursores hematopoiéticos da medula óssea e baço (CFU-GM), não houve diferença significativa entre elas. Em adição, a probabilidade de sobrevivência dos animais com estas diferentes doses também demonstrou-se similar, ou seja, não estatisticamente significativas entre si, o que nos levou a concluir que nesta faixa posológica, a ação imunomoduladora do composto é a mesma.

Diante destes resultados, e também dos inúmeros casos de resistência bacteriana, onde os antimicrobianos convencionais já não produzem a eficácia terapêutica esperada, a administração da Geléia Real em paralelo a terapia convencional pode ser útil como alternativa terapêutica. Além disso, em indivíduos imunodeprimidos a administração do composto em questão também pode ter um valor terapêutico que necessita ser investigado.

Estudos posteriores, principalmente no que diz respeito a avaliação das citocinas envolvidas neste mecanismo imunomodulador do composto em estudos “in vivo”, são necessários.



CONCLUSÃO

O presente estudo sobre os efeitos protetores da administração de Geléia Real (GR) em animais infectados com *Listeria monocytogenes*, demonstrou claramente que a administração profilática do composto em estudo é capaz de restabelecer o número de precursores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos infectados, retornando aos níveis normais, em associação com uma prevenção da hematopoiese extramedular. Em adição, houve uma normalização do peso do baço dos animais infectados, quando previamente tratados com GR.

A administração profilática de GR demonstrou também produzir um aumento na atividade estimuladora do soro de animais apenas tratados com as quatro doses avaliadas (125, 250, 500 e 750 mg/Kg) e, ainda, um aumento adicional nos níveis destes fatores estimuladores de colônias (CSFs) nos animais infectados que receberam tratamento prévio com GR.

Um aumento da probabilidade de sobrevida dos animais infectados, quando os mesmos foram previamente tratados com GR nas quatro doses avaliadas foi estatisticamente significativo, resultando em 37,5%, 37,5%, 25% e 12,5% de sobrevida, respectivamente.

A ausência de diferenças estatisticamente significativas entre as quatro doses de GR analisadas para todos os parâmetros imuno-hematopoiéticos avaliados nos permite concluir que, neste modelo experimental de listeriose murina, o composto possui uma ampla faixa terapêutica, já que a diminuição da dose não implica na redução de seus efeitos terapêuticos.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIZAWA, S.; HIRAMOTO, M; ARAKI, S.; NEGISH, S.; KIMURA, Y.; HOSHI, H.; KOJIMA, S.; WAKASUGI, K. – Stimulatory effects of neopterin on hematopoiesis in vitro are mediated by activation of stromal cells function. **Hematol Oncol**, **16**: 57-67, 1998.
- ALBERT, S.; BHATTACHARYA, D.; KLAUDINY, J.; SCHMITZOVA, J.; SIMUTH, J. The family of major royal jelly proteins and its evolution. **J Mol Evol**, **49**: 290-297, 1999.
- BARKER, S. A.; FOSTER, A. B.; LAMB, D.C.; HONDGSON, N. – Identification of 10-hydroxy-D 2-decenoic acid in royal jelly. **Nature**, **183**: 996-997, 1959.
- BENNETT, M. & BAKER, E.E. – Marrow-dependent cell function in early stages of infection with *Listeria monocytogenes*. **Cell Immun.**, **33**: 203-210, 1977.
- BINCOLLETO, C. & QUEIROZ, M. L. S. – The effect of lead on the bone marrow stem cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Vet. Human. Toxicol.**, **38**: 186-190, 1996.
- BLOODWORTH, B. C.; HARN, C. S.; HOCK, C. T.; BOON, Y. O. – Liquid chromatographic determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content of comercial products containing royal jelly. **J AOAC Int**, **78**: 1019-1023, 1995.
- BLUM, M. S.; NOVAK, ^a F.; TABER, S. – 10-HYDROXY-d 2-DECENOIC ACID, NA ANTIBIOTIC FOUND IN ROYAL JELLY. **Science**, **130**: 452-453, 1959.
- CHEERS, C. & STANLEY, E.R. – Macrophage producing during murine listeriosis: colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and CSF-1-binding cells in genetically resistant and susceptible mice. **Infect. Immun.**, **56**: 274-251, 1988.

- CHO, Y. T. – Studies on royal jelly and anormal cholesterol and triglycerides. **Am Bee J**, **117**: 36-38, 1977.
- COLAN, J. W. & NORTH, R.J. – Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver , but not in the spleen or peritoneal cavity , as revealedby a granulocyte-depleting monoclonal antibody. **J. Exp. Med.**, **179**: 259-268, 1994.
- DALRYMPLE, S. A., LCIAN, L. A., SLATTERY, R., AUD, D. M.; FUCHINO, S.; LEE, F. & MURRAY, R. – Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: Correlation with inefficient neutrophilia. **Infect. Immun.**, **63**: 2262-2268, 1995.
- DANTAS, D. C. M. & QUEIROZ, M. L. S. – Effects of *Chlorella vulgaris* on boné marrow progenitor cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Immunopharmacol.**, **21**: 499-508, 1999.
- DRAMSI, S.; LEVI, S; TROLLER, A.; COSSART, P. – Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an *in vitro* study. **Infect. Immun.**, **66**: 4461-4468, 1998.
- FAN, H; HE, C.; HAN, H. – Determination of 10-HDA in honeybee body by HPLC. **Se Pu**, **17(3)**: 301-302, 1999.
- FARRAR, M.A.; SCHREIBER, R.D. – The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. **Annu Rev Immunol**, **11**: 571-611, 1993.
- FUJIWARA, S.; IMAI, J.; FUJIWARA, M.; YAESHIMA, T.; KAWASHIMA, T.; KOBAYASHI, K. – A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and

- determination of the the primary structure of royalisin. **J Biol Chem**, **265**: 11333-11337, 1990.
- GARCIA-AMOEDO, L. H. G. – **Geléia Real: Análises físico-químicas e químicas úteis para a caracterização e detecção da autenticidade ou adulteração do produto. São Paulo, 1999.** [Tese Mestrado – Universidade de São Paulo]
- GENC, M.; ASLAN, A. Determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content in pure royal jelly and royal jelly products by column liquid chromatography. **J Chromatogr A**, **839**: 265-268, 1999.
- GERALD, L.; MANDELL, E.; WILLIAM, A. PETRI JUNIOR – Fármacos antimicrobianos. Penicilinas, cefalosporina e outros antibióticos β -lactâmicos. In: GILMAN, A. G. – **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** Rio de Janeiro, mcGraw-Hill, 1997. p. 790-811.
- HAMERLINCK, F. F. – Neopterin: a review. **Exp Dermatol**, **3**: 167-176, 1999.
- HANH, H. & KAUFMANN, S.H.E. – The role cell-mediated immunity in bacterial infections. **Rev. Infect. Dis.**, **3**: 1221-1250, 1981.
- HARTY, J. T.; LENS, L. L. & BEVAN, M. J. – Primary and secondary immune responses to *Listeria monocytogenes*. **Curr. Opin Immunol.** **8**: 526-530, 1996.
- HARTY, J. T. & BEVAN, M. J. – Specific immunity to *Listeria monocytogenes* in absense of IFN- γ . **Immunity** **3**: 109-117, 1995.
- HAYDAK, M. H. – Larval food and development of castes in the honey bee. **J Econ Entomol**, **36**: 778-792, 1943.

- HAYDAK, M. H. & PALMER, L. S. – Royal Jelly and bee bread as source of vitamins B1, B2, B6, C and nicotinic and pantothenic acids. **J Econ Entomol**, **35**: 319-320, 1942.
- HEO, Y.; PARSONS, P. J.; LAWRENCE, D. A. – Lead differentially modifies cytokine production in vitro and in vivo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **138**: 149-157, 1996.
- HILKENS, C. M. U.; JOOST-VAN-NEERVEN, R. J.; SINIJDENWINT, F. G. M.; WIERENGA, E. A.; KAPSENBERG, M. L. – Differentiation of T helper type 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E2 critically depends on interleukin-2. **Eur J Immunol**, **25**: 59-63, 1995.
- KAMAKURA, M. Signal transduction mechanism leading to enhanced proliferation of primary cultured adult rat hepatocytes treated with royal jelly 57-kDa protein. **J Biochem**, **132**: 911-919, 2002.
- KAMAKURA, M.; MITANI, N.; FUKUDA, T.; FUKUSHIMA, M. Antifatigue effect of fresh royal jelly in mice. **J Nutr Sci Vitaminol**, **47**: 394-401, 2001.
- KARAALI, A.; MEYDANOGLU, F.; EKE, D. – Studies on composition, freeze-drying and storage of Turkish royal jelly. **J Apic Res**, **27**: 182-185, 1998.
- KAUFMANN, S. H. E. – Immunity to intracellular bacteria. **Annu. Rev. Immunol.**, **11**: 129-163, 1993.
- KELLY, J. P. & BANCROFT, G. J. – Administration of interleukin-10 abolishes innate resistance to *Listeria monocytogenes*. **Eur. J. Immunol.**, **26**: 356-364, 1996.

- KIM, D.; REILLY, A.; LAWRENCE, D. A. – Relationships between IFN- γ , IL-6, corticosterone, and *Listeria monocytogenes* pathogenesis in BALB/c mice. **Cell. Immun.**, **207**: 13-18, 2001.
- KIMURA, Y.; KAJIYAMA, S.; KANAEDA, J. IZUKAWA; YONEKURA, M. – N-linked sugar chains of 55-kDa royal jelly glycoprotein. **Biosci Biotechnol Biochem**, **60**: 2099-2102, 1996.
- KIMURA, Y.; KAJIYAMA, S.; KANAEDA, J.; YONEKURA, M. – N-linked sugar chains of 350-kDa royal jelly nglycoprotein. **Bioschi Biotechnol Biochen**, **59**: 507-509, 1995.
- KIMURA, Y.; WASHINO, N.; YONEKURA, M. N-linked sugar chains of 350-kDa royal jelly glycoprotein. **Biosci Biotechnol Biochem**, **59**: 507-509, 1995.
- KISHIKAWA, H.; SONG, R.; LAWRENCE, D. A. – Interleukin-12 promoters enhanced resistance to *Listeria monocytogenes* infection of lead-exposed mice. **Toxicol Appl Pharmacol.**, **147**: 180-189, 1997.-
- KOHASHI, M.; TOMITA, K.; IWAI, K. - Analysis of unconjugated pterins in food resources and human urine. **Agric Biol Chem**, **44**: 2089-2094, 1980.
- MACCANN, S.M.; KARANTH, S.; KAMAT, A.; LES DESS, W.; LYSON, K.; GIMENO, M.; RETTORI, V. - Induction by cytokines of yhe pattern of pituitary hormone secretion in infection. **Neuroimmunomodulation**, **1**: 2-13, 1994.
- MARSICANO, G.; SHEHU, D.; GALLI, C. – Factors controlling haemopoiesis in ovine long term bone marrow cultures. **Veterinary and Immunopathology**, **55**: 291-301, 1997.
- METCALF, D. – Hematopoietic growth factors 1. **Lancet**, **8642**: 825-827, 1989.

- METCALF, D. – The bioassay of colony stimulating factors. In:_____ - **The hemapoietic colony stimulating factors**. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevire, 1984. p. 187-213.
- MOMBAERTS, P.; ARNOLDI, J.; RUSS, F.; TONEGAWA, S.; KAUFFMAN, S.H.E. – Different roles of alphabeta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. **Nature**, **365**: 53-56, 1993.
- NASSIS, C. Z.; RODRIGUES, A. P., CASSETTARI, A; LÚCIA, ^a M. S.; MELLO, F. R. L. H. – Estudo “in vitro” da atividade antifúngica e antibacteriana da geléia real. **J Bras Med**, **69**: 80-95, 1995.
- NISHIBORI, T.; XIONG, H.; KAWAMURA, I.; ARAKAWA, M.; MITSUYAMA, M. – Induction of cytokine gene expression by Listeriolysin O and roles of macrophages and NK cells. **Infect Immun.**, **64**: 3188-3195, 1996.
- OKA, H.; EMORI, Y.; KOBAYASHI, N.; HAYASHI, Y.; NOMOTO, K. Supression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and the improvement of Th1/Th2 cell responses. **Int Immunopharmacol**, **1**: 521-532, 2001.
- OKAMOTO, I.; TANIGUCHI, Y.; KUNIKATA, T.; KOHNO, K.; IWAKI, K.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. **Life Sciences**, **73**: 2029-2045, 2003.
- PARKER, A. N. & PRAGNELL, I. B. – Inibitors of hematopoieis and their potential clinical relevance. **Blood Rev**, **9**: 226-233, 1995.
- PATEL, N. G.; HAYDAK, M. H.; GOCHNAUER, T. A. – Electrophoretic components of the proteins in honey bee larval food. **Nature**, **186**: 336-364, 1960.

- PFEIFER, R. W. & IRONS, R. D. – Mechanism of sulfhydryl-dependent Immunotoxicity. *Immunotoxicol Immunopharmacol*. Raven Press, New York, 1985.
- PRATT, J. J. & HOUSE, H. L. – A qualitative analysis of the amino acids in royal jelly. **Science**, **110**: 9-10, 1949.
- POLLET, S.; BOTTEX-GAUTHIR, C.; LI, M.; POTTIER, P.; FAVIER, A.; VIDAL, D. – Insight into some of the signaling pathways triggered by a lipid immunomodulator. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, **24(4)**: 527-546, 2002.
- QUEIROZ, M.L.S. – Células pluripotenciais em cultura: revisão bibliográfica. **Ciência e Cultura**, **40**: 421-426, 1988.
- QUEIROZ, M.L.S.; RODRIGUES, A.P.O.; BINCOLLETO, C.; FIGUEIREDO, C.A.V. – Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes* – **Int Immunopharmacol**, **492**: 1-12, 2003.
- SHEN, X.; LU, R.; HE, G. Effects of lyophilized royal jelly on experimental hyperlipid and thrombosis. **Zhonghua Yu Fang Yi Za Zhi**, **29**: 27-29, 1995.
- SVER, L.; ORSOLIC, N.; TADIC, Z.; NJARI, B.; VALPOTIC, I. – A royal jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. **Comp Immun Microbiol Infect Dis**, **19**: 31-38, 1996.
- TANIGUCHI, Y.; KOHNO, K.; INOUE, S.; SATOMI, K.; OKAMOTO, I.; ARAI, N.; IWAKI, K.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. **Int Immunopharmacol**, **3**: 1313-1324, 2003.

- TRIPP, C. S.; WOLF, S. F. & UNANUE, E. R. – Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. **Proc Natl. Acad. Sci. Usa** **90**: 3725-3729, 1993.
- UNANUE, E.R. – Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance. **Curr. Opinion. Immunol.**, **9**: 35-43, 1997.
- WAGNER, R. D.; MAROUSER, N. M.; BROWN, J. F.; CZUPRYNSKI, C. J. – Treatment with anti interleukin-10 monoclonal antibody enhances early but impairs complete clearance of *Listeria monocytogenes* infection mice. **Infect. Immun.**, **62**: 2345-2353, 1994.
- WEAVER, N. & KUIKEN, K. A. – Quantitative analysis of the essential amino acids of royal jelly and some pollens. **J Econ Entomol**, **44**: 635-638, 1951.
- WEAVER, N.; JOHNSTON, N. C.; BENJAMIN, R.; LAW, J. H. – Novel fatty acids from the royal jelly of honey bees (*Pis mellifera*, L.). **Lipids**, **3**: 535-538, 1969.
- XU, D; MEI, X.; XU, S. The research of 10-hydroxy-2-decanoic acid on experiment hyperlipidemic rat. **Zhong Yao Cai**, **25(5)**: 346-347.



APÊNDICE

Tabela 1. Avaliação dos efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hemotopoiéticos da medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^3$ bactérias/animal – via intraperitoneal). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.

CFU-GM - FÊMUR

Parâmetros x 10^3

N	CTRL	GR125	GR250	GR500	GR750	I	GR125 + I	GR250 + I	GR500 + I	GR750 + I
1	18,75	19,90	19,95	19,85	19,95	18,31	19,90	19,88	17,46	19,19
2	20,67	20,55	20,53	19,60	20,29	17,50	19,50	19,60	18,62	20,09
3	20,29	17,80	17,85	19,00	19,40	19,00	19,20	19, 19	20,09	19,05
4	19,80	19,62	19,62	18,02	19,11	17,34	18,90	18,87	18,31	19,60
5	18,55	20,70	20,67	19,69	20,21	19,19	18,30	18,31	19,32	18,00
6	18,45	20,55	20,52	19,61	19,47	19,62	18,16	18,18	19,67	19,95
X	19,41	19,85	19,85	18,79	19,73	18,49	18,99	19,00	18,91	19,31
DP	0,960	1,092	1,063	1,268	0,480	0,934	0,679	0,683	0,968	0,761

CTRL: controle

GR125: tratados com GR 125mg/Kg

GR250: tratados com GR 250mg/Kg

GR500: tratados com GR 500mg/Kg

GR750: tratados com GR 750mg/Kg

I: infectados

GR125+I: tratados com GR 125mg/Kg e infectados com LM

GR250+I: tratados com GR 250mg/Kg e infectados com LM

GR500+I: tratados com GR 500mg/Kg e infectados com LM

GR 750+I: tratados com GR 750mg/Kg e infectados com LM

Tabela 2. Avaliação dos efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hemotopoiéticos da medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^3$ bactérias/animal – via intraperitoneal). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.

CFU-GM - FÊMUR

Parâmetros x 10^3

N	CTRL	GR125	GR250	GR500	GR750	I	GR125 + I	GR250 + I	GR500 + I	GR750 + I
1	18,75	19,90	19,95	19,85	19,95	4,32	19,60	19,30	18,83	19,50
2	20,67	20,55	20,53	19,60	20,29	4,59	19,70	22,22	17,72	19,00
3	20,29	17,80	17,85	19,00	19,40	4,88	21,90	21,06	19,28	17,64
4	19,80	19,62	19,62	18,02	19,11	5,70	18,88	17,76	20,51	18,62
5	18,55	20,70	20,67	19,69	20,21	6,195	18,20	18,70	20,66	18,94
6	18,45	20,55	20,52	19,61	19,47	6,27	18,16	18,90	19,84	18,91
X	19,41	19,85	19,85	18,79	19,73	5,325	19,40	19,65	19,47	18,76
DP	0,960	1,092	1,063	1,268	0,480	0,840	1,388	1,658	1,108	0,621

CTRL: controle

GR125: tratados com GR 125mg/Kg

GR250: tratados com GR 250mg/Kg

GR500: tratados com GR 500mg/Kg

GR750: tratados com GR 750mg/Kg

I: infectados

GR125+I: tratados com GR 125mg/Kg e infectados com LM

GR250+I: tratados com GR 250mg/Kg e infectados com LM

GR500+I: tratados com GR 500mg/Kg e infectados com LM

GR 750+I: tratados com GR 750mg/Kg e infectados com LM

Tabela 3. Avaliação dos efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hemotopoiéticos da medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^3$ bactérias/animal – via intraperitoneal). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.

CFU-GM - FÊMUR

Parâmetros x 10^3

N	CTRL	GR125	GR250	GR500	GR750	I	GR125 + I	GR250 + I	GR500 + I	GR750 + I
1	18,75	19,90	19,95	19,85	19,95	12,55	18,32	17,36	18,68	18,87
2	20,67	20,55	20,53	19,60	20,29	14,40	18,80	19,79	18,49	18,90
3	20,29	17,80	17,85	19,00	19,40	15,54	19,55	19,60	17,64	18,81
4	19,80	19,62	19,62	18,02	19,11	14,58	19,95	20,10	18,32	19,19
5	18,55	20,70	20,67	19,69	20,21	13,82	18,20	18,31	20,05	19,11
6	18,45	20,55	20,52	19,61	19,47	15,01	18,02	17,51	19,97	18,13
X	19,41	19,85	19,85	18,79	19,73	14,31	18,80	18,77	18,85	18,83
DP	0,960	1,092	1,063	1,268	0,480	1,041	0,785	1,207	0,958	0,375

CTRL: controle

GR125: tratados com GR 125mg/Kg

GR250: tratados com GR 250mg/Kg

GR500: tratados com GR 500mg/Kg

GR750: tratados com GR 750mg/Kg

I: infectados

GR125+I: tratados com GR 125mg/Kg e infectados com LM

GR250+I: tratados com GR 250mg/Kg e infectados com LM

GR500+I: tratados com GR 500mg/Kg e infectados com LM

GR 750+I: tratados com GR 750mg/Kg e infectados com LM

Tabela 4. Avaliação dos efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hemotopoiéticos do baço de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^3$ bactérias/animal – via intraperitoneal). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.

CFU-GM - BAÇO

Parâmetros x 10²

N	CTRL	GR125	GR250	GR500	GR750	I	GR125 + I	GR250 + I	GR500 + I	GR750 + I
1	4,32	4,80	4,86	4,86	5,40	5,64	5,20	5,40	5,40	5,40
2	4,50	3,43	2,43	3,96	4,05	4,20	4,05	3,96	4,32	4,95
3	4,05	2,15	3,15	3,60	3,40	3,65	4,05	4,32	3,94	3,40
4	2,97	2,65	2,97	5,40	4,95	4,75	3,90	3,96	3,76	3,40
5	4,05	4,05	4,32	5,67	3,05	3,02	5,20	5,40	3,68	3,50
6	2,97	4,20	4,50	4,32	3,60	3,85	3,50	3,40	4,05	3,05
X	3,81	3,54	3,70	4,63	4,07	4,18	4,31	4,40	4,19	3,95
DP	0,672	1,002	0,981	0,816	0,922	0,915	0,713	0,823	0,633	0,971

CTRL: controle

GR125: tratados com GR 125mg/Kg

GR250: tratados com GR 250mg/Kg

GR500: tratados com GR 500mg/Kg

GR750: tratados com GR 750mg/Kg

I: infectados

GR125+I: tratados com GR 125mg/Kg e infectados com LM

GR250+I: tratados com GR 250mg/Kg e infectados com LM

GR500+I: tratados com GR 500mg/Kg e infectados com LM

GR 750+I: tratados com GR 750mg/Kg e infectados com LM

Tabela 5. Avaliação dos efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hemotopoiéticos do baço de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^3$ bactérias/animal – via intraperitoneal). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.

CFU-GM - BAÇO

Parâmetros x 10²

N	CTRL	GR125	GR250	GR500	GR750	I	GR125 + I	GR250 + I	GR500 + I	GR750 + I
1	4,32	4,80	4,86	4,86	5,40	49,14	4,80	4,87	4,95	5,85
2	4,50	3,43	2,43	3,96	4,05	51,75	4,00	3,80	4,50	4,50
3	4,05	2,15	3,15	3,60	3,40	44,37	5,60	5,87	5,40	4,40
4	2,97	2,65	2,97	5,40	4,95	52,92	4,05	4,34	3,85	4,95
5	4,05	4,05	4,32	5,67	3,05	46,17	3,90	3,80	5,40	4,50
6	2,97	4,20	4,50	4,32	3,60	55,44	3,95	4,08	3,96	4,05
X	3,81	3,54	3,70	4,63	4,07	49,96	4,38	4,46	4,67	4,70
DP	0,672	1,002	0,981	0,816	0,922	4,202	0,683	0,798	0,685	0,628

CTRL: controle

GR125: tratados com GR 125mg/Kg

GR250: tratados com GR 250mg/Kg

GR500: tratados com GR 500mg/Kg

GR750: tratados com GR 750mg/Kg

I: infectados

GR125+I: tratados com GR 125mg/Kg e infectados com LM

GR250+I: tratados com GR 250mg/Kg e infectados com LM

GR500+I: tratados com GR 500mg/Kg e infectados com LM

GR 750+I: tratados com GR 750mg/Kg e infectados com LM

Tabela 6. Avaliação dos efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hemotopoiéticos do baço de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^3$ bactérias/animal – via intraperitoneal). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.

CFU-GM - BAÇO

Parâmetros x 10²

N	CTRL	GR125	GR250	GR500	GR750	I	GR125 + I	GR250 + I	GR500 + I	GR750 + I
1	4,32	4,80	4,86	4,86	5,40	15,84	4,90	4,95	4,68	4,50
2	4,50	3,43	2,43	3,96	4,05	15,30	4,95	5,40	4,95	4,68
3	4,05	2,15	3,15	3,60	3,40	16,20	4,12	3,82	5,40	4,95
4	2,97	2,65	2,97	5,40	4,95	15,84	4,05	4,36	3,60	5,40
5	4,05	4,05	4,32	5,67	3,05	16,20	3,60	3,10	5,40	3,40
6	2,97	4,20	4,50	4,32	3,60	17,81	3,02	3,08	3,60	3,96
— X	3,81	3,54	3,70	4,63	4,07	16,19	4,10	4,11	4,60	4,48
DP	0,672	1,002	0,981	0,816	0,922	0,855	0,745	0,958	0,825	0,713

CTRL: controle

GR125: tratados com GR 125mg/Kg

GR250: tratados com GR 250mg/Kg

GR500: tratados com GR 500mg/Kg

GR750: tratados com GR 750mg/Kg

I: infectados

GR125+I: tratados com GR 125mg/Kg e infectados com LM

GR250+I: tratados com GR 250mg/Kg e infectados com LM

GR500+I: tratados com GR 500mg/Kg e infectados com LM

GR 750+I: tratados com GR 750mg/Kg e infectados com LM

Tabela 7. Avaliação dos efeitos da GR sobre o peso do baço de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^3$ bactérias/animal – via intraperitoneal). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.

PESO DO BAÇO (gramas)

Parâmetros x 10^{-2}

N	CTRL	GR125	GR250	GR500	GR750	I	GR125 + I	GR250 + I	GR500 + I	GR750 + I
1	20,0	19,0	20,1	19,8	20,3	20,9	19,0	19,1	20,1	20,0
2	19,6	18,9	19,7	20,2	19,5	21,5	19,1	19,5	19,2	19,8
3	18,5	18,5	18,5	19,7	19,7	22,3	19,5	19,7	18,3	18,7
4	18,0	19,9	20,6	20,7	20,1	22,0	18,5	18,3	19,0	20,1
5	19,4	18,7	18,8	19,0	18,7	23,2	19,0	18,1	18,5	19,0
6	20,2	18,9	19,1	18,5	19,0	20,9	18,5	19,0	19,9	19,5
X	19,2	18,9	19,4	19,6	19,5	21,8	18,9	18,9	19,1	19,5
DP	0,863	0,483	0,806	0,796	0,618	0,889	0,383	0,638	0,725	0,563

CTRL: controle

GR125: tratados com GR 125mg/Kg

GR250: tratados com GR 250mg/Kg

GR500: tratados com GR 500mg/Kg

GR750: tratados com GR 750mg/Kg

I: infectados

GR125+I: tratados com GR 125mg/Kg e infectados com LM

GR250+I: tratados com GR 250mg/Kg e infectados com LM

GR500+I: tratados com GR 500mg/Kg e infectados com LM

GR 750+I: tratados com GR 750mg/Kg e infectados com LM

Tabela 8. Avaliação dos efeitos da GR sobre o peso do baço de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^3$ bactérias/animal – via intraperitoneal). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.

PESO DO BAÇO (gramas)

Parâmetros x 10⁻²

N	CTRL	GR125	GR250	GR500	GR750	I	GR125 + I	GR250 + I	GR500 + I	GR750 + I
1	20,0	19,0	20,1	19,8	20,3	29,4	19,0	20,7	19,9	20,1
2	19,6	18,9	19,7	20,2	19,5	26,9	19,9	21,0	18,9	19,7
3	18,5	18,5	18,5	19,7	19,7	28,6	19,7	21,5	20,1	18,9
4	18,0	19,9	20,6	20,7	20,1	26,9	20,8	19,0	19,0	19,9
5	19,4	18,7	18,8	19,0	18,7	23,7	20,5	20,7	19,3	19,2
6	20,2	18,9	19,1	18,5	19,0	30,1	18,5	20,1	18,7	19,3
X	19,2	18,9	19,4	19,6	19,5	27,6	19,7	20,5	19,31	19,51
DP	0,863	0,483	0,806	0,796	0,618	2,31	0,873	0,864	0,567	0,457

CTRL: controle

GR125: tratados com GR 125mg/Kg

GR250: tratados com GR 250mg/Kg

GR500: tratados com GR 500mg/Kg

GR750: tratados com GR 750mg/Kg

I: infectados

GR125+I: tratados com GR 125mg/Kg e infectados com LM

GR250+I: tratados com GR 250mg/Kg e infectados com LM

GR500+I: tratados com GR 500mg/Kg e infectados com LM

GR 750+I: tratados com GR 750mg/Kg e infectados com LM

Tabela 9. Avaliação dos efeitos da GR sobre o peso do baço de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^3$ bactérias/animal – via intraperitoneal). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.

PESO DO BAÇO (gramas)

Parâmetros x 10^{-2}

N	CTRL	GR125	GR250	GR500	GR750	I	GR125 + I	GR250 + I	GR500 + I	GR750 + I
1	20,0	19,0	20,1	19,8	20,3	26,7	19,0	21,1	20,1	19,3
2	19,6	18,9	19,7	20,2	19,5	31,2	21,0	22,6	18,7	20,1
3	18,5	18,5	18,5	19,7	19,7	24,3	19,9	21,0	19,9	19,1
4	18,0	19,9	20,6	20,7	20,1	22,9	20,8	20,0	19,0	19,5
5	19,4	18,7	18,8	19,0	18,7	24,2	20,8	20,3	18,9	19,7
6	20,2	18,9	19,1	18,5	19,0	26,3	19,9	20,5	19,1	19,2
X	19,2	18,9	19,4	19,6	19,5	25,9	20,2	20,9	19,2	19,4
DP	0,863	0,483	0,806	0,796	0,618	2,94	0,77	0,923	0,574	0,371

CTRL: controle

GR125: tratados com GR 125mg/Kg

GR250: tratados com GR 250mg/Kg

GR500: tratados com GR 500mg/Kg

GR750: tratados com GR 750mg/Kg

I: infectados

GR125+I: tratados com GR 125mg/Kg e infectados com LM

GR250+I: tratados com GR 250mg/Kg e infectados com LM

GR500+I: tratados com GR 500mg/Kg e infectados com LM

GR 750+I: tratados com GR 750mg/Kg e infectados com LM

Tabela 10. Avaliação dos efeitos da GR sobre a produção de fatores estimuladores de colônias em camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^3$ bactérias/animal – via intraperitoneal). O soro dos animais foi coletado 24 horas após a infecção.

FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS

Unidades/mL

N	CTRL	GR125	GR250	GR500	GR750	I	GR125 + I	GR250 + I	GR500 + I	GR750 + I
1	1,2	3,2	3,5	4,5	3,0	8,5	12,9	13,5	13,0	12,8
2	0,7	3,5	3,8	3,5	3,5	9,0	13,0	12,0	15,2	13,7
3	1,2	3,9	4,2	3,2	3,2	10,6	12,0	12,8	14,5	14,8
4	0,8	4,1	4,0	3,0	4,2	10,8	14,0	14,5	13,8	13,5
5	0,5	3,7	3,3	3,8	4,0	8,7	12,9	13,8	14,0	14,0
6	1,0	4,0	4,3	4,2	3,8	9,0	14,1	14,0	13,5	14,5
X	0,9	3,7	3,8	3,7	3,6	9,4	13,1	13,4	14,0	13,8
DP	0,282	0,338	0,393	0,579	0,466	1,001	0,786	0,900	0,772	0,719

CTRL: controle

GR125: tratados com GR 125mg/Kg

GR250: tratados com GR 250mg/Kg

GR500: tratados com GR 500mg/Kg

GR750: tratados com GR 750mg/Kg

I: infectados

GR125+I: tratados com GR 125mg/Kg e infectados com LM

GR250+I: tratados com GR 250mg/Kg e infectados com LM

GR500+I: tratados com GR 500mg/Kg e infectados com LM

GR 750+I: tratados com GR 750mg/Kg e infectados com LM

Tabela 11. Avaliação dos efeitos da GR sobre a produção de fatores estimuladores de colônias em camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^3$ bactérias/animal – via intraperitoneal). O soro dos animais foi coletado 48 horas após a infecção.

FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS

Unidades/mL

N	CTRL	GR125	GR250	GR500	GR750	I	GR125 +I	GR250 +I	GR500 +I	GR750 +I
1	1,2	3,2	3,5	4,5	3,0	11,8	16,9	17,0	16,2	17,5
2	0,7	3,5	3,8	3,5	3,5	13,5	17,0	16,8	17,0	16,5
3	1,2	3,9	4,2	3,2	3,2	14,3	17,0	17,5	17,5	18,0
4	0,8	4,1	4,0	3,0	4,2	14,0	18,0	18,0	16,8	17,2
5	0,5	3,7	3,3	3,8	4,0	12,9	17,9	17,2	17,0	16,8
6	1,0	4,0	4,3	4,2	3,8	12,0	16,1	16,8	17,2	16,3
X	0,9	3,7	3,8	3,7	3,6	13,0	17,1	17,2	16,9	17,0
DP	0,282	0,338	0,393	0,579	0,466	1,034	0,706	0,466	0,437	0,641

CTRL: controle

GR125: tratados com GR 125mg/Kg

GR250: tratados com GR 250mg/Kg

GR500: tratados com GR 500mg/Kg

GR750: tratados com GR 750mg/Kg

I: infectados

GR125+I: tratados com GR 125mg/Kg e infectados com LM

GR250+I: tratados com GR 250mg/Kg e infectados com LM

GR500+I: tratados com GR 500mg/Kg e infectados com LM

GR 750+I: tratados com GR 750mg/Kg e infectados com LM

Tabela 12. Avaliação dos efeitos da GR sobre a produção de fatores estimuladores de colônias em camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^3$ bactérias/animal – via intraperitoneal). O soro dos animais foi coletado 72 horas após a infecção.

FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS

Unidades/mL

N	CTRL	GR125	GR250	GR500	GR750	I	GR125 + I	GR250 + I	GR500 + I	GR750 + I
1	1,2	3,2	3,5	4,5	3,0	6,2	11,9	11,5	12,7	11,5
2	0,7	3,5	3,8	3,5	3,5	5,8	10,0	10,7	11,5	10,5
3	1,2	3,9	4,2	3,2	3,2	5,5	12,0	12,7	10,8	12,5
4	0,8	4,1	4,0	3,0	4,2	7,0	12,0	12,2	10,6	11,8
5	0,5	3,7	3,3	3,8	4,0	6,8	11,9	11,9	12,3	10,8
6	1,0	4,0	4,3	4,2	3,8	6,2	11,1	11,5	11,8	11,6
X	0,9	3,7	3,8	3,7	3,6	6,2	11,4	11,7	11,6	11,4
DP	0,282	0,338	0,393	0,579	0,466	0,571	0,803	0,686	0,823	0,717

CTRL: controle

GR125: tratados com GR 125mg/Kg

GR250: tratados com GR 250mg/Kg

GR500: tratados com GR 500mg/Kg

GR750: tratados com GR 750mg/Kg

I: infectados

GR125+I: tratados com GR 125mg/Kg e infectados com LM

GR250+I: tratados com GR 250mg/Kg e infectados com LM

GR500+I: tratados com GR 500mg/Kg e infectados com LM

GR 750+I: tratados com GR 750mg/Kg e infectados com LM