

SOLANGE APARECIDA MALACRIDA

**Estudo da atividade imunomoduladora do
extrato de *Maytenus ilicifolia* em animais
infectados com *Listeria monocytogenes***

*Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado,
apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas -
UNICAMP, para obtenção do Título de Doutor em Farmacologia da
Bióloga – Solange Aparecida Malacrida.*

Campinas, 07 de agosto de 2003.

Profª. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz
- Orientadora -



CAMPINAS

2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

SOLANGE APARECIDA MALACRIDA

**Estudo da atividade imunomoduladora do
extrato de *Maytenus ilicifolia* em animais
infectados com *Listeria monocytogenes***

*Tese de doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor
em Farmacologia.*

Orientadora: Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz



CAMPINAS

2003

III

INIDADE	BC
1ª CHAMADA	UNICAMP
	M29e
/ EX	
OMBO BC/	57942
ROC.	16/16.117/04
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$11.00
DATA	24/5/04
Nº CPD	

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

CM00197052-4

31B ID 316061

Art61c

M29e

Malacrida, Solange Aparecida

Estudo da atividade imunomoduladora do extrato de *maytenus ilicifolia* em animais infectados com *listeria monocytogenes* / Solange Aparecida Malacrida. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador : Mary Luci de Souza Queiroz

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Espinha Santa. 2. Hematopoeese. 3. Interferon. 4. *Células exterminadoras naturais. I. Mary Luci de Souza Queiroz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



UNICAMP

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

- **Prof^a. Dr^a. Mary Luci de Souza Queiroz**
-

Membros:

- **Prof^a. Dr^a. Mary Luci de Souza Queiroz**
 - **Prof. Dr. João Palermo Neto**
 - **Prof. Dr. Ramon Kaneno**
 - **Prof^a. Dr^a. Marize Campos Valadares**
 - **Prof^a. Dr^a. Claudia Bincoletto Trindade**
-

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

Data: 07/08/2003

À Profa Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, orientadora deste trabalho, pelo estímulo e apoio ao meu desenvolvimento científico, assim como pelo carinho e amizade.

À minha família.

Aos amigos do laboratório de Cultura de células, pela amizade e cooperação no decorrer das minhas atividades, assim como, pelo ambiente de trabalho alegre, tranquilo e estimulante que me proporcionaram.

Aos funcionários do laboratório de Cultura de células, Raphael e Sueli pela colaboração e amizade.

Ao Departamento de Farmacologia/FCM, que possibilitou a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à NATURA e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

A todas as pessoas que me auxiliaram na realização desta tese e não estão aqui mencionadas.

	PAG.
RESUMO.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	26
1.1. Avaliação da atividade anti-bacteriana frente a <i>Listeria monocytogenes</i>	27
1.2. Potencial Terapêutico da <i>Maytenus ilicifolia</i> (Espinheira Santa – ES)..	33
2. OBJETIVOS.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1. Medicamento fitoterápico.....	38
3.2. Animais.....	38
3.3. Tratamento.....	39
3.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	39
3.5. Padronização da metodologia de cultura clonal de precursores hematopoiéticos da medula óssea e do baço de camundongos	41
3.6. Preparação do meio condicionado de células do baço (SCM).....	42
3.7. Obtenção de soro para detecção dos níveis de fator estimulador de crescimento de colônias (SCFs).....	44
3.8. Atividade de células “natural killer” (NK).....	44
3.8.1. Preparação das células efetoras.....	45
3.8.2. Preparação das células alvo.....	46

3.9. Dosagem de citocina (IFN- γ).....	46
3.10. Realização das curvas de sobrevida.....	48
3.11. Análise estatística.....	49
4. RESULTADOS.....	50
4.1. Curva de sobrevida de camundongos balb/c infectados com diferentes doses de <i>listeria monocytogenes</i>	51
4.2. Efeitos do ES na sobrevida de animais infectados com dose letal de <i>L. monocytogenes</i>	52
4.3. Efeitos do ES sobre o número de precursores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos da medula óssea e do baço de camundongos (CFU-C) infectados com <i>Listeria monocytogenes</i>	53
4.4. Efeitos do ES sobre a produção de fatores estimuladores de colônias (CSFs) em animais infectados com <i>Listeria monocytogenes</i>	56
4.5. Efeitos do ES sobre a atividade de células natural killer (NK) frente a infecção com <i>Listeria monocytogenes</i>	58
4.6. Efeito do ES sobre a produção de IFN- γ em animais infectados com <i>Listeria monocytogenes</i>	60
4.7. Efeitos do ES na sobrevida de animais C57BL/6 normais e Knockout para IFN- γ infectados com dose letal de <i>L. monocytogenes</i>	62
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÃO.....	68
7. SUMMARY.....	70
8. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
9. APÊNDICES.....	87

Figura 1. Curva da capacidade estimuladora do crescimento de colônias expressa em unidades/mL.....	44
Figura 2. Curva de sobrevivência de camundongos Balb/c infectados com diferentes doses de <i>Listeria monocytogenes</i> , a saber: 5×10^5 ; $2,5 \times 10^5$; 5×10^4 ; $2,5 \times 10^4$ e 5×10^3 bactérias/mL. * $P < 0,001$ entre os grupos. Análise de Kaplan-Meier seguido de Cox-Mantel. (n=6/grupo).....	51
Figura 3. Efeito do pré-tratamento com 250, 500 e 1000 mg/Kg/dia de <i>Maitenus ilicifolia</i> (ES), durante 5 dias, sobre a porcentagem de sobrevivência em camundongos Balb/c, inoculados com dose letal de <i>Listeria monocytogenes</i> (5×10^5 bac/mL).....	52
Figura 4. Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais Balb/c normais, tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de <i>Maitenus ilicifolia</i> , durante 5 dias e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> (5×10^3 bac/mL).....	54
Figura 5. Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais Balb/c normais, tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de <i>Maitenus ilicifolia</i> , durante 5 dias e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> (5×10^3 bac/mL).....	55

Figura 6. Efeitos da incubação de células progenitoras hematopoéticas de animal Balb/c normal com o soro de animais Balb/c controle, tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg/dia de <i>Maitenus ilicifolia</i> , durante 5 dias e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> (5×10^3 bac/mL).....	57
Figura 7 - Atividade de células NK de camundongos Balb/c controle, tratados com o extrato de <i>Maitenus ilicifolia</i> , 1000 mg/Kg/dia (V.O) por 5 dias consecutivos e/ou infectados com a <i>Listeria monocytogenes</i> na dose de 5×10^3 bac/mL.....	59
Figura 8 - Níveis de IFN- γ de camundongos Balb/c controles, tratados com o extrato de <i>Maitenus ilicifolia</i> , 1000 mg/Kg/dia (V.O) por 5 dias consecutivos, infectados com a <i>Listeria monocytogenes</i> (5×10^3 bac/mL). (i.p), e grupos tratados com o ES e infectados.....	61
Figura 9 - Efeito do pré-tratamento com 1000 mg/Kg/dia de <i>Maitenus ilicifolia</i> (ES), durante 5 dias, sobre a porcentagem de sobrevivência em camundongos C57BL/6 normais e Knockout para INF γ , inoculados com dose letal de <i>Listeria monocytogenes</i> (5×10^5 bac/mL). Análise de Kaplan-Meyer seguido de Cox-Mantel. (n=20/grupo).....	62

	PÁG.
Tabela 1. Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) em presença de células da medula óssea de camundongos Balb/c.....	43
Tabela 2. Avaliação da sobrevivência de animais tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de <i>Maitenus ilicifolia</i> , durante 5 dias, e infectados (LM) com <i>Listeria monocytogenes</i> (5×10^5 bac/mL).....	88
Tabela 3. Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de <i>Maytenus ilicifolia</i> (ES). Os animais do grupo controle receberam água e do grupo Amido receberam água com 1000mg/Kg de amido.....	88
Tabela 4 Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> (5×10^3 bac/mL) e tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de <i>Maytenus ilicifolia</i> (ES).....	89
Tabela 5. Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> (5×10^3 bac/mL) e tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de <i>Maytenus ilicifolia</i> (ES).....	89

Tabela 6 . Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> (5X10 ³ Bac/mL) e tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de <i>Maytenus ilicifolia</i> (ES).....	90
---	----

Tabela 7. Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de <i>Maytenus ilicifolia</i> (ES).....	90
--	----

Tabela 8. Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> (5x10 ³ bac/mL) e tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de <i>Maytenus ilicifolia</i> (ES).....	91
--	----

Tabela 9 Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> (5x10 ³ bac/mL) e tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de <i>Maytenus ilicifolia</i> (ES). Os animais foram sacrificados 48, horas após a infecção.....	91
--	----

Tabela 10. Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> (5x10 ³ bac/mL) e tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de <i>Maytenus ilicifolia</i> (ES).....	92
---	----

Tabela 11. Atividade de células NK de camundongos Balb/c controle (C), controle tratado com amido (C+Amido) tratados com o extrato de *Maitenus ilicifolia* (ES), 1000 mg/Kg/dia (V.O) por 5 dias consecutivos e/ou infectados com a *Listeria monocytogenes* na dose de 5×10^3 bac/mL (LM 48h/ LM 72h/LM 120) e grupos tratados com o ES e infectados (ES + LM 48h/ LM 72h/LM 120).....

93

Tabela 12 - Níveis de INF- γ de camundongos Balb/c controles, tratados com o extrato de *Maitenus ilicifolia* (ES), 1000 mg/Kg/dia (V.O) por 5 dias consecutivos infectados com a *Listeria monocytogenes* (LM 48h/ LM 72h) e grupos tratados com o ES e infectados (ES + LM 48h/ LM 72h). Os grupos infectados foram sacrificados 48 e 72 horas após a inoculação da bactéria.....

94

Tabela 13 – Avaliação da sobrevida de animais C57BL/6 normais e Knockout para INF γ , Tratados por 5 dias com 1000 mg/Kg de Extrato de *Maytenus ilicifolia* (ES) inoculados com dose letal de *Listeria monocytogenes* (5×10^5 bac/mL). (n=20/grupo).....

95

RESUMO

Neste trabalho, investigamos o efeito do extrato de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (ES), sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea e do baço, a atividade estimuladora de colônias do soro de animais infectados com dose sub-letal (5×10^3 Bac/mL) de *Listeria monocytogenes*, a atividade das células “natural killer” (NK) e a produção de IFN- γ . Redução significativa no número de CFU-GM da medula óssea foi observada na fase inicial da infecção em paralelo a um aumento significativo na hematopoese esplênica. O tratamento dos camundongos, com as doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg/dia por 5 dias anteriores à infecção, estimulou a produção de CFU-GM na medula óssea, reduziu aos níveis normais o número de CFU-GM no baço e aumentou a atividade hematopoética do soro. A presença da infecção estimulou a produção de IFN- γ e a atividade lítica das células NK nestes animais, o tratamento com as três doses do extrato de ES utilizando-se o mesmo protocolo anterior, potencializou a produção de IFN- γ e a atividade lítica das células NK, sendo este efeito mais marcante às 48 horas para as células NK e às 72 horas para o IFN- γ . A avaliação da eficácia terapêutica do extrato de ES, avaliada através da resistência produzida em camundongos infectados com dose letal da bactéria (5×10^5 Bac/mL), demonstrou proteção de 40% com a dose de 1000 mg/Kg e 30% com a dose de 250 mg/Kg, sendo que esta diferença entre as doses não foi significativa. Nossos resultados demonstram que o extrato de ES pode aumentar a resistência antibacteriana na listeriose através da geração de CFU-GM, da produção de IFN- γ e do aumento na atividade lítica das células NK.

1.INTRODUÇÃO

1.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA FRENTE À *Listeria monocytogenes*

Granulócitos e macrófagos são vitais na defesa contra infecções bacterianas. Várias bactérias facultativas intracelulares sobrevivem e multiplicam-se dentro dos macrófagos. Dentre estas, a *Listeria monocytogenes* tem sido amplamente estudada e utilizada como modelo de patógeno intracelular no estudo da imunidade contra infecção (MILON, 1997; NORTH et al., 1997). Estudos demonstram que linfócitos T e as citocinas por ele produzidas desempenham um papel crucial em determinar a evolução da resposta do hospedeiro contra infecção bacteriana. No entanto, antes do início desta imunidade celular específica adquirida, a intensidade da resposta inflamatória elicitada por macrófagos e leucócitos polimorfonucleares no local da infecção é crítica para a sobrevivência do hospedeiro na fase inicial da infecção (CZUPRYNSKI et al, 1984; MOCCI et al., 1997). Este processo depende da mobilização eficiente de células derivadas da medula óssea (NORTH, 1970; NORTH, 1973; LEPAY et al., 1985), particularmente os granulócitos e os macrófagos.

Listeria monocytogenes (LM) é uma bactéria gram-positiva, de multiplicação intracitoplasmática que elicitava reações semelhantes no homem e em roedores. Em pacientes imunossuprimidos causa sepse e meningite e produz infecção séria em mulheres grávidas, comprometendo também o feto. Em indivíduos normais a contaminação ocorre principalmente por meio de alimentos, produzindo um quadro mais benigno de gastroenterite. Esta bactéria constitui um dos modelos bastante utilizados para o estudo da resposta imune tipo celular, permitindo o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas nas imunopatologias mediadas pela célula T, sem interferir com a resistência inata, prevenção e cura de doenças mediadas por estas mesmas células.

Diferentes mecanismos estão envolvidos na resistência à *L. monocytogenes*. Vários estudos demonstram que a resistência de camundongos à infecção por *Listeria monocytogenes* é limitada pela capacidade do hospedeiro de estimular na medula óssea, as células progenitoras responsáveis pelo desenvolvimento de granulócitos e macrófagos. Este fato torna a avaliação funcional da medula óssea de importância especial, uma vez que ela pode refletir qualquer alteração celular possível que venha ocorrer como consequência da infecção. A resposta inflamatória de fagócitos que se acumulam rapidamente no local de deposição da bactéria participa no controle inicial do crescimento bacteriano (KAUFMANN, 1995) e nos estágios iniciais da listeriose os macrófagos são ativados por um mecanismo independente de células T (APPELBERG et al., 1994). Estes macrófagos fagocitam a bactéria e liberam IL-1, TNF- α e IL-12 e estimulam as células NK a produzirem IFN- γ . Estas citocinas por sua vez, ativam os macrófagos a apresentarem atividade antimicrobiana e citotóxica (BUCHMEIER & SCHEREIBER, 1985; BECKERMAN et al., 1993; MIELKE et al., 1993; TRINCHIERI, 1993 ROGERS et al., 1994). Este processo facilita a destruição da *Listeria* localizada dentro do macrófago ativado impedindo a disseminação da infecção. No animal normal, a destruição da *Listeria* por macrófagos ativados facilita a apresentação do antígeno para as células T levando conseqüentemente à indução de células T CD4⁺ e T CD8⁺ específicas contra o microorganismo.

Tem-se demonstrado o envolvimento obrigatório de neutrófilos na fase aguda não-específica da resistência à listeriose (CONLAN & NORTH, 1991, 1994; APPELBERG et al., 1994; CZUPRYNSKI et al., 1994) e a capacidade destas células de sintetizar e liberar citocinas (CASSATELLA, 1995). A utilização de anticorpo específico contra neutrófilos *in*

vivo reduz de forma significativa a resistência do hospedeiro e aumenta a mortalidade na listeriose (CZUPRYNSKI et al., 1994). No entanto, esta resposta inespecífica que ocorre nas primeiras 24 a 48 horas, mediada por macrófagos, neutrófilos e células NK, é incapaz de erradicar a infecção no baço e cavidade peritoneal (CONLAN & NORTH, 1994). Células NK e células T (células CD4 α/β , células CD8 α/β e células T γ/δ) são necessárias devido a produção de citocinas estimuladoras do macrófago, particularmente do IFN- γ (KAUFMANN, 1993).

A produção de granulócitos e macrófagos é feita a partir do crescimento e diferenciação de células precursoras hematopoiéticas presentes na medula óssea (CFC). Em animais geneticamente resistentes à *L. monocytogenes*, o número destas células precursoras está reduzido na medula óssea nas primeiras 24 horas após a infecção, enquanto que em cepas suscetíveis este número permanece constante. Na cepa resistente, este efeito coincide com um aumento de monócitos no sangue periférico associado a um menor crescimento bacteriano no fígado e baço. Estes resultados indicam que, a pronta mobilização dos precursores de granulócitos-macrófagos da medula óssea representa um papel importante no controle da infecção nos seus estágios iniciais (RUCO & MELTZER, 1978; TRIPP et al., 1993; MELO et al., 2001; QUEIROZ et al., 2003).

As células CD4 TCR $\alpha\beta$ reconhecem um grande número de proteínas presentes na *L. monocytogenes*. Estas células, após interação com a bactéria, produzem grandes quantidades de IFN- γ e IL-12, atuando na subpopulação Th1 (KAUFMANN et al., 1983). As células CD8 TCR $\alpha\beta$, embora atuem de forma mais pronunciada na infecção secundária, também secretam IFN- γ *in vitro* em presença de *L. monocytogenes* (KAUFMANN et al., 1986; EDELSON & UNANUE, 2000) e são responsáveis pela lise de

hepatócitos infectados através da perforina ou por atuação do mecanismo Fas-L/Fas (WING & GREGORY, 2000). Tanto as células CD4 quanto as CD8 são encontradas nas lesões granulomatosas de camundongos infectados (LADEL et al., 1994). As células TCR $\gamma\delta$ podem estimular tanto células Th1 quanto Th2 dependendo do organismo infectante, e em resposta a *L. monocytogenes* estimulam a produção de IFN- γ (FERRICK et al., 1995). Os macrófagos infectados com *L. monocytogenes* produzem IL-12 que estimula as células NK a produzirem IFN- γ (WAGNER & CZUPRYNSKI, 1993). Embora haja evidência de que as células NK sejam as maiores produtoras de IFN- γ no início da infecção por *Listeria*, acredita-se que o controle da produção de IFN- γ por estas células seja efetuado pelas TCR $\gamma\delta$. Portanto há indicação de que, além de células NK, pelo menos duas subpopulações de linfócitos T (TCR $\gamma\delta$ seguidas pelas células Th1) sejam responsáveis pela produção de IFN- γ para o desenvolvimento e manutenção da resposta de Th1 na listeriose (FARGEAS et al., 1992). A importância central do IFN- γ na resistência a *L. monocytogenes* e outros organismos intracelulares foi demonstrada em muitos estudos (KIRDELEN et al., 1984; BUCHMEIER & SCHEREIBER, 1985; HUANG et al., 1993; KAUFMANN, 1993), embora outros mecanismos com funções citolíticas pareçam também estar envolvidos (HARTY et al., 1992). Estudos mais recentes demonstram que a IL-18 apresenta efeitos mais globais na proteção contra a listeriose sendo comparável ao TNF. Isto se explica pelo fato do IL-18 ativar tanto a resposta imune específica levando o macrófago a secretar TNF e óxido nítrico, quando a celular através da ativação de Th1 e produção de IFN- γ (NEIGHBORS et al., 2001).

Embora a infecção de camundongos por *L. monocytogenes* constitua um modelo de imunidade antimicrobiana com predominância de Th1, a participação de IL-4 parece

também ocorrer na regulação da resposta imune nos estágios iniciais da infecção. (IZAWA & CZUPRYNSKI, 1992; IIZAWA et al., 1993). Acredita-se que a IL-4 tenha um efeito supressor da resposta imunológica nos estágios iniciais da listeriose, pois a administração de anticorpo monoclonal anti-IL-4 antes da infecção produz um aumento na resistência dos animais tratados, o que sugere uma regulação cruzada da IL-4 com o IFN- γ (HAAK-FREDNCHO et al., 1992). Os mesmos autores, no entanto, não conseguiram demonstrar um efeito significativo nos níveis de bactéria no fígado e baço após administração de IL-4 recombinante no início da infecção (IZAWA & CZUPRYNSKI, 1992). Embora os efeitos da IL-4 na eliminação da *Listeria monocytogenes* não estejam ainda definidos, há um consenso de que o anticorpo monoclonal anti-IL-4 não afeta a indução ou expressão da resposta imunológica do tipo tardio.

Uma outra citocina que também parece estar envolvida nos estágios iniciais da listeriose é a IL-10, uma vez que a desativação da função fagocítica pelo tratamento com IL-10 leva à morte do animal devido à disseminação da infecção mesmo em presença de microabcesso. Da mesma forma, a neutralização de IL-10 por anticorpos monoclonais específicos torna o animal mais resistente nos primeiros 5 dias da infecção. Em estágios mais adiantados da doença, no entanto, este tratamento reduz o clearance da bactéria, o que sugere uma ação mais complexa de IL-10 sobre os macrófagos (FLESCH & KAUFMANN, 1994). Portanto, a listeriose experimental induz quase que exclusivamente à resposta de células Th1, com alguma interferência na ativação de Th2, podendo, desta forma, ser utilizada como modelo para estudos do mecanismo de ação de substâncias imunomoduladoras.

Este modelo de infecção por *L.monocytogenes* vem sendo utilizado, com sucesso em nosso laboratório na investigação da atividade imunomoduladora de plantas medicinais e outros produtos naturais ou químicos. Resultados com o extrato da alga *Chlorella vulgaris* (ECV) demonstraram uma proteção dose-dependente em animais infectados com dose letal de *L. monocytogenes*, sendo que, em comparação com a morte de 100% dos animais no grupo controle, foi observado sobrevida de 20% e 52% para doses de 50 e 500 mg/Kg, respectivamente. A investigação dos mecanismos protetores subjacentes demonstraram um importante efeito restaurador na mielossupressão induzida pela infecção, paralelamente a um aumento adicional significativo na atividade estimuladora hematopoética do soro dos animais infectados e tratados (DANTAS & QUEIROZ, 1999; QUEIROZ et al., 2003). Da mesma forma, a atividade das células NK (DANTAS et al., 1999) e os níveis de IFN- γ (QUEIROZ et al., 2002) aumentaram de forma significativa nos animais infectados e tratados. Interessante observar que a administração de ECV no animal normal não produziu qualquer alteração nos parâmetros estudados. Resultados interessantes foram demonstrados com extratos da raiz da *Petiveria alliacea* (EPA). Ao contrário do observado com o ECV, a administração de EPA no animal normal produziu aumento nos níveis de IL-2, o qual foi potencializado no animal infectado/tratado. Em relação aos níveis de IFN- γ , o tratamento com EPA no animal infectado induziu aumento significativo numa fase mais tardia (72 h) à inoculação da bactéria (QUADROS et al., 1999; QUEIROZ et al., 2000a). A reversão da mielossupressão induzida pela infecção vem sendo observada paralelamente ao aumento no tempo ou na taxa de sobrevida em outros produtos naturais até agora testados em nosso laboratório que apresentaram atividade anti-bacteriana como a

Pluchea quitoc (QUEIROZ et al., 2000b), *Caesalpinia ferrea* (QUEIROZ et al., 2001) e um composto isolado de fungo (MELO et al., 2001).

1.2. PONTENCIAL TERAPÊUTICO DA *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek (ESPINHEIRA SANTA - ES)

A Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. – família Celastraceae), uma espécie medicinal utilizada amplamente e tradicionalmente na medicina popular, possui atividades farmacológicas bem definidas. A espécie medicinal possui atividade antiulcerogênica, protetora da mucosa gástrica, antitumoral, cicatrizante e antioxidante. Além disto, um dos princípios ativos da Espinheira Santa, a maitenina possui atividade antimicrobiana marcante (SANTANA, 1971; MONACHE, 1972; CARLINI, 1988; SOUZA-FORMIGONI, 1991; ALONSO, 1998; TABACH et al., 2001).

Os aspectos farmacológicos e toxicológicos da Espinheira Santa têm sido estudados em experimentação clínica com pacientes cancerosos (SANTANA, 1971; CARLINI et al., 1991; SIMÕES, 1999) e em estudos com animais (OLIVEIRA et al., 1991; VARGA, 1991; CAMPAROTO et al., 2002). De acordo com investigações que utilizam as diversas formas galênicas de Espinheira Santa, não há registros de efeitos tóxicos nem teratogênicos em animais de laboratório, tanto na administração aguda como na crônica. Estudo realizado com células de medula óssea de ratos Wistar demonstrou que infusão das folhas de Espinheira Santa não provocam alterações cromossômicas nestas células. Além disto, a administração de extrato da planta não apresentou distúrbios desfavoráveis à espermatogênese, nem atividade embriotóxica ou alterações morfológicas na mucosa uterina e ovário de animais (MONTANARI et al., 1998, 2002).

Em 1988, através de um projeto da Central de Medicamentos (CEME), a Escola Paulista de Medicina realizou um estudo de Toxicologia clínica (Fase I) da Espinheira Santa. Foram administrados a sete voluntários sadios o abafado da planta em dosagem correspondente ao dobro da utilizada comumente na etnofarmacologia, durante 14 dias. Os voluntários foram submetidos a exame físico, ECG, dosagem bioquímica sérica, exame de urina, hematologia (série branca e vermelha). Não foram observados resultados indesejáveis que pudessem ser atribuídos ao uso da planta, apenas sintomas como boca seca, náusea, gastralgia em poucos voluntários, os quais melhoraram no decorrer do estudo (SANTANA, 1971; CARLINI, 1988; GEOCZE et al., 1988). Outros testes com seres humanos não apresentaram efeitos colaterais (TABACH et al., 2002).

2.OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho consiste em avaliar a eficácia e o mecanismo de ação do fitoterápico Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*) em animais infectados com dose subletal da bactéria *Listeria monocytogenes*. A eficácia antibacteriana dos diferentes esquemas posológicos foi avaliada em camundongos inoculados com dose letal da bactéria.

O mecanismo de ação antibacteriana foi avaliado através dos seguintes parâmetros imunohematopoéticos:

- Crescimento e diferenciação dos precursores hematopoéticos para a série granulócito e macrófago (CFU-GM) da medula óssea e do baço.
- Níveis séricos de fatores estimuladores de colônias (CSFs) hematopoéticos.
- Atividade das células NK.
- Produção de IFN- γ .

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MEDICAMENTO FITOTERÁPICO

O fitoterápico Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*) utilizado é um extrato seco padronizado, produzido pela técnica “spray-dry”, comercializado em cápsulas pelo Laboratório Flora Medicinal. Sua composição química inclui: Alcalóides: maitanprina, maitansina, maitanbutina. Terpenos: maitenina, tringenona, isotenginona III, congorosina A e B, ácido maitenóico, ácido salasperônico, friedelina e friedelinol (triterpenos), maitenoquinona (diterpeno). Ácidos orgânicos: tânico, silícico, clorogênico. Taninos: fenóis totais 19,4%, taninos gálicos 0,2% e taninos condensados. Compostos ansa-macrolídeos: mantansinóides. Sais minerais: ferro, enxofre, sódio, cálcio. Outros: pristimerina e isopritimerina III, flavonóides, leucoantocianidinas, delta-amirina, β -amirina, derivados de epigallocatequinas, resinas, matérias aromáticas.

3.2. ANIMAIS

Foram utilizados neste estudo as seguintes linhagens de camundongos: Balb/c, susceptíveis à infecção pela *Listeria monocytogenes* e C57BL/6 normais e Knockout para IFN- γ . Os animais foram obtidos do Biotério Central da UNICAMP e mantidos em nosso biotério agrupados ao acaso em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura constante de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 h. O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e água fornecidas *ad libitum*.

Para realização dos experimentos os animais foram distribuídos nos seguintes grupos (n=6/grupo):

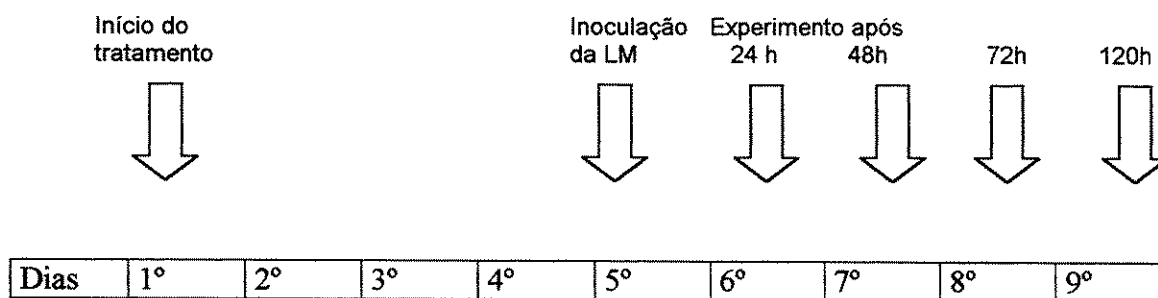
- Controle tratados com água.
- Controle tratados com amido.

- Inoculados com *Listeria monocytogenes*.
- Tratados com as diferentes doses do extrato.
- Tratados e infectados com *Listeria*.

3.3. TRATAMENTO

O Extrato de *Maytenus ilicifolia* (ES) foi administrado nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg/dia (via oral), pelo método de gavagem. A escolha das doses foi baseada em estudos realizados anteriormente (CARLINI et al., 1991; GONZALES et al., 2001; TABACH et al., 2002). Os animais controle, não tratados com extrato, receberam água. Tendo em vista a presença de amido no extrato, um grupo de animais recebeu água com amido dissolvido na mesma concentração encontrada na dose de 1000 mg/Kg.

Os animais foram pré-tratados com 5 doses do extrato e infectados, intraperitonealmente, logo após a administração da última dose.



3.4. *Listeria monocytogenes* (LM)

A bactéria *Listeria monocytogenes* é um cocobacilo gram-positivo de multiplicação intracitoplasmática, anaeróbio facultativo, móvel por flagelos peritríquios a temperatura ambiente, facilmente cultivável em ágar-sangue. Esta bactéria foi obtida no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

Para provocar infecção nos animais foi necessário determinar o número ideal de microorganismos a ser injetado. A dose ideal não deveria provocar a morte do animal para que fosse possível a realização dos experimentos após a infecção. A bactéria foi mantida em meio de cultura BHI e incubada por 24-48 horas a 37°C. Os repiques foram feitos com alça de platina, em ágar-sangue, e novamente incubado a 37°C por 24-48 horas. As colônias obtidas nas culturas frescas de ágar-sangue foram diluídas em salina e as concentrações determinadas por espectrofotometria por meio do aparelho “Vitek Colorimeter”.

Para a manutenção da patogenicidade da bactéria, a mesma foi periodicamente repassada por vinte e cinco vezes em camundongos, através da inoculação intraperitoneal da bactéria diluída em solução salina 0,9 %. Quarenta e oito horas após a inoculação da bactéria, os baços foram removidos em ambiente estéril, macerados, mantidos em BHI por 24-48 horas e, logo após, foram realizados repiques desse BHI para placas de ágar-sangue para um novo isolamento da bactéria. Após o crescimento e identificação das colônias nessas placas, novas diluições foram realizadas até atingir a concentração apropriada para o uso.

Para avaliarmos a resistência dos animais à *L. monocytogenes* realizamos uma curva de sobrevida. Um volume de 0,2 mL de suspensão de bactérias, diluída em salina estéril, foi injetado por via intraperitoneal em cada camundongo. As concentrações de bactéria testadas foram: 5×10^5 ; $2,5 \times 10^5$; 5×10^4 ; $2,5 \times 10^4$ e 5×10^3 bactérias/mL.

Os resultados apresentados para determinação da dose subletal de *L. monocytogenes* demonstraram que a diluição ideal para realização dos experimentos foi de 5×10^3

bactérias/mL. Para a avaliação da sobrevivência dos animais a melhor concentração encontrada foi de 5×10^5 bactérias/mL. (Figura 2).

Os parâmetros imunohematopoiéticos foram avaliados às 24, 48, 72 e 120 horas após a infecção com *Listeria* utilizando-se as células do baço e da medula óssea dos animais em estudo.

3.5. PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE CULTURA CLONAL DE PRECURSORES HEMATOPOÉTICOS DA MEDULA ÓSSEA E DO BAÇO DE CAMUNDONGOS (CFU-C)

Após sacrificar-se o animal por deslocamento cervical, limpou-se a pele com álcool 70%. Expôs-se o fêmur, removeu-se a cartilagem sobre o orifício na extremidade distal e cortou-se o osso na junção superior. A medula óssea foi transferida com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo 5 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Chemical, St. Louis. MO, USA). O baço foi removido assepticamente e colocado em tubo de ensaio estéril, contendo 5 mL de meio de cultura RPMI. As células foram liberadas cuidadosamente, utilizando-se um macerador. Mais 4 mL de RPMI-1640 foram adicionados ao tubo de ensaio contendo as células do baço.

O número de células na suspensão foi contado em câmara hemocitométrica, após diluição (1:10) das células, em Turkey 1%, para células da medula e a concentração da suspensão celular ajustada para 1×10^5 células/mL. O mesmo procedimento foi realizado para as células de baço, porém a diluição feita foi de (1:100) e a concentração ajustada para $2,5 \times 10^5$ células/mL.

Preparou-se a suspensão para a incubação das células em cultura a qual consistia de:

-30% de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-SigmaTM) 2x concentrado;

-20% de soro bovino fetal (SBF);

-50% de ágar (0,3%) (Bacto-ágar-DifcoTM).

A seguir, adicionou-se ao meio descrito acima, o volume apropriado de células (1×10^5 células/mL para a medula óssea e $2,5 \times 10^5$ células/mL para o baço) e distribuiu-se um volume de 2 mL em cada placa de Petri (35 mm), já contendo 100 µl do fator estimulador (SCM), homogenizou-se a placa com movimentos giratórios permitindo uma maior distribuição por toda a superfície da placa. Deixou-se gelificar e incubou-se por 7 dias a 37 °C em presença de 5% de CO₂. Após este período contou-se o número de colônias formadas em microscópio de dissecação, em aumento de 40x (METCALF, 1995).

3.6. PREPARAÇÃO DO MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS DO BAÇO (SCM)

Baços de camundongos BALB/c foram removidos sob condições assépticas e passados delicadamente através de peneira de aço inoxidável estéril com auxílio de meio RPMI. A concentração da suspensão celular foi ajustada para 2×10^6 células/mL em meio RPMI contendo 10% de SBF. A seguir 5×10^{-5} moles/L de 2-mercaptoetanol foram adicionados à suspensão celular e a cultura estimulada com pokeweed mitogen (GibcoTM, Grand Island, NY, USA) na proporção de 0,05 mL do mitógeno para 1 mL de meio. Após 7 dias de incubação a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO₂ no ar, a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante filtrado em membrana de 0,22 µm (MilliporeTM).

A atividade funcional do SCM foi determinada mediante os estímulos produzidos sobre o crescimento clonal de células progenitoras hematopoéticas de animais em meio

semi-sólido. A diluição a ser utilizada nos experimentos foi selecionada dentro dos níveis de resposta supramáxima (METCALF, 1995). Os resultados obtidos, em duplicata por diluição, da titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) em presença de células de medula óssea de camundongos Balb/c estão apresentados na tabela 1. O estudo morfológico das colônias após a coloração indicou o predomínio de colônias de granulócito e macrófago.

De acordo com VAN DEN ENGH & BOL, 1975, a menor concentração capaz de estimular o crescimento de clones é considerada 1 unidade de CSF. A curva obtida mostrando a capacidade estimuladora do crescimento de colônias expressa em unidades por mL deste lote de SCM está representada na Figura 1.

Tabela 1: Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) em presença de células da medula óssea de camundongos Balb/c. *Número total de colônias por 1×10^5 cél/mL.

Diluição SCM	*CFU-C $\times 10^2$
1:1	109,2 $\pm$ 4,2
1:2	102 $\pm$ 3,5
1:4	105,6 $\pm$ 5,1
1:8	75,6 $\pm$ 4,2
1:16	57,6 $\pm$ 4,0
1:32	34,8 $\pm$ 3,0
1:64	7,2 $\pm$ 1,2
1:168	0

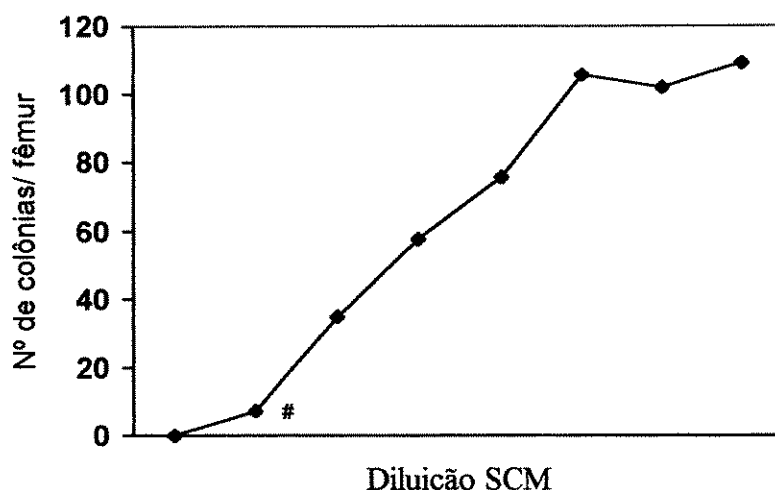


Figura 1: Curva da capacidade estimuladora do crescimento de colônias expressa em unidades/mL. # Uma unidade

3.7. OBTENÇÃO DO SORO DE ANIMAIS PARA A AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE FATOR ESTIMULADOR DE CRESCIMENTO DE COLÔNIAS (CSFs)

Sangue dos animais tratados com extrato em estudo foi coletado por punção cardíaca e centrifugado para obtenção do soro. Os níveis séricos de CSFs foram determinados pela capacidade promotora do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de animais normais (não tratados).

3.8. ATIVIDADE DE CÉLULAS “NATURAL KILLER” (NK)

Para este método foram utilizadas células tumorais alvo YAC-1 (originadas de linfoma de células T murino, induzido pelo vírus Moloney), adaptado para crescer em cultura líquida (CIKES et al., 1973). Células YAC-1 incorporam o isótopo crômio-51 (^{51}Cr), que se liga a proteínas. As células NK (células efectoras) ao serem colocadas em

contato com as células alvo (YAC-1) promovem a lise e a liberação do crômio para o sobrenadante da cultura. A atividade citotóxica das células NK é proporcional à quantidade de crômio liberada no meio.

3.8.1. PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS EFETORAS

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, o baço foi removido e macerado cuidadosamente.

As células mononucleares foram separadas em gradiente de Ficoll-Hypaque (Ficol-Sigma; Hypaque-Pharmacia, Piscataway, USA) e lavadas em RPMI contendo 10% de soro bovino fetal. A seguir, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio RPMI e incubadas em placa de Petri por 90 minutos a 37°C em estufa de CO₂ 5%. As células-não aderentes foram lavadas com RPMI e ressuspensas a uma concentração de 5x10⁶ células/mL.

Distribuíram-se 0,1 mL da suspensão em placas de microcultura fundo em forma de U (Corning, New York, USA) fazendo-se diluições seriadas em triplicatas e com reserva de três orifícios para lise máxima (0,1 mL de detergente diluído 1:2) e outros três para a lise espontânea (0,1 mL de SBF).

As células alvo previamente marcadas foram distribuídas (0,1 mL) nos orifícios de reação e controles. As placas foram centrifugadas por 5 minutos, a 800 rpm e em seguida incubadas a 37°C, por 4 h em estufa de CO₂ 5%. Após este período de incubação, centrifugou-se por 10 minutos a 1500 rpm e transferiu-se 0,1 mL do sobrenadante para tubos plásticos. A leitura foi feita em contador gama (Gamma Counter 5500B-BeckmannTM, Irvine, USA).

Cálculo da porcentagem de lise específica:

$$\% \text{ de lise específica} = (\text{lise teste} - \text{lise espontânea}) / (\text{lise máxima} - \text{lise espontânea})$$

3.8.2. PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS ALVO

A linhagem tumoral YAC-1 foi mantida em meio RPMI-1640 enriquecido com 20% de SBF, penicilina (100 µg/mL), hepes 25 mmol/L, 2-mercaptoetanol (1:100) e L-glutamina (216 mg/mL), a 37°C e 5% de CO₂.

Para o ensaio, 5x10⁶ células YAC-1 foram lavadas duas vezes com meio RPMI. Ressuspendeu-se o precipitado com 0,2 mL de SBF. A seguir, adicionou-se 100µCi de cromato de sódio marcado (IPEN) e incubou-se em banho-maria a 37°C sob agitação periódica por 90 minutos. Lavou-se duas vezes e ressuspendeu-se em meio RPMI suplementado a uma concentração final de 1x10⁵ células/mL.

3.9. DOSAGEM DE CITOCINA (IFN-γ).

A concentração de IFN-γ foi dosada no sobrenadante de culturas de células esplênicas pelo método imunoenzimático ELISA (ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), utilizando-se anticorpo monoclonal específico (PharmingenTM, San Diego, CA, USA).

Baços de camundongos foram coletados assepticamente e homogeneizados utilizando-se meio RPMI. Células mononucleares foram obtidas adicionando-se tampão de lise ao botão celular previamente concentrado. Após lavagem em meio RPMI, as células foram ajustadas a uma concentração de 1x10⁶ células/mL em meio RPMI suplementado com 5% de SBF.

Nos poços da placa de cultura (24 wells, maxisorb, NUNC, Roskilde, DM) contendo 800 μ L de meio RPMI enriquecido com 5% de SBF, foram adicionados 200 μ L da suspensão celular e 50 μ L de solução de Con A (2,5 μ g/mL). Concomitantemente também foram incubadas células de cada amostra sem Con A.

As placas foram incubadas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂. Após 48 horas foram coletados os sobrenadantes.

Nos poços de uma placa de microcultura para ELISA (“maxi sorp”- 96 wells, NUNC TM) foram adicionados 100 μ L do anticorpo monoclonal de captura anti-citocina (0,5-4 μ g/mL). A placa protegida adequadamente foi incubada “overnight” a 4°C. Após este período, os poços foram lavados duas vezes com solução de PBS/Tween (0,5 mL de Tween-20 em 1 L de PBS). A solução permaneceu em contato com a placa por um período de pelo menos 1 minuto antes do descarte. Em seguida, 200 μ L de PBS contendo 10% de SBF, foram adicionados por orifício e a placa foi mantida à temperatura ambiente por 2h. Lavou-se novamente duas vezes com solução PBS/Tween.

As amostras (sobrenadante da cultura) e os padrões (anticorpo monoclonal recombinante diluído em PBS enriquecido com 10% de SBF) foram adicionados a um volume de 100 μ L por poço e a placa foi incubada novamente “overnight”, à temperatura ambiente. Seguiram-se quatro lavagens utilizando-se solução PBS/Tween.

O anticorpo monoclonal de detecção anti-citocina, marcado com biotina, foi diluído em PBS enriquecido com 10% de SBF (0,5-4 μ g/mL) e 100 μ L foram adicionados por orifício. Incubou-se à temperatura ambiente por 45 minutos e em seguida lavou-se seis vezes com solução PBS/Tween.

Adicionou-se 100 µL de uma solução de avidina-peroxidase diluída em PBS contendo 10% de SBF (1:400 de uma solução 1 mg/mL, Sigma) incubou-se por mais 30 minutos à temperatura ambiente e lavou-se oito vezes com solução PBS/Tween. Nesta etapa, o substrato foi preparado adicionando-se 10 µL de H₂O₂ 30% e 1 comprimido de OPD (diidrocloreto de o-fenilenodiamina, Sigma) a 10 mL de tampão citrato, pH 5,6. Adicionou-se 100 µL do substrato por orifício até o desenvolvimento da cor por um período de 10-80 minutos, à temperatura ambiente. A leitura foi realizada em leitor de ELIZA ($\lambda = 492$ nm) (Labsystems, Finland). A concentração da citocina nas amostras foi expressa em pg/mL calculada por meio de uma curva-padrão realizada com concentrações conhecidas da citocina recombinante.

3.10. REALIZAÇÃO DAS CURVAS DE SOBREVIDA

O estudo dos efeitos do tratamento com o fitoterápico foi realizado através da avaliação da sobrevida de animais inoculados com dose letal da bactéria, após tratamento com as diferentes doses do composto em estudo. Foram utilizados 5 grupos de animais Balb/c, sendo, 2 grupos Controle, tratados com água ou com amido, e 3 grupos tratados com o extrato nas concentrações de 250, 500 e 1000 mg/Kg/dia.

Para avaliarmos os efeitos do tratamento com o fitoterápico na sobrevida de animais C57BL/6 Knockout para IFN- γ , dose de 1000mg/Kg/dia foi administrada por 5 dias antes da infecção a um grupo de animais. Um grupo de animais normais C57BL/6 e outro grupo de animais C57BL/6 Knockout para IFN- γ foram apenas infectados. Grupos de 20 animais foram observados por um período de até 45 dias.

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação estatística dos resultados para avaliar as variáveis CFU, CSFs e atividade de células NK foi realizada pelo teste de análise de variância ANOVA e quando significativo, pelo Teste de Comparação Tukey. A diferença entre os grupos para a citocina foi verificada utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e, posteriormente, o teste de Wilcoxon. Para as curvas de sobrevida dos animais foi aplicado o teste de análise de Kaplan-Meier seguido de Cox-Mantel. Em todos os grupos estudados, considerou-se estatisticamente significativos aqueles cujos valores de P foram $< 0,05$. Os dados foram expressos como média+DP.

4.RESULTADOS

4.1. CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM DIFERENTES DOSES DE *Listeria monocytogenes*.

Os resultados apresentados na figura 2, para determinação da dose subletal de *Listeria monocytogenes* demonstraram que a diluição ideal para realização dos experimentos foi de 5×10^3 bactérias/mL. Para a avaliação da sobrevivência dos animais a dose letal observada foi de 5×10^5 bactérias/mL.

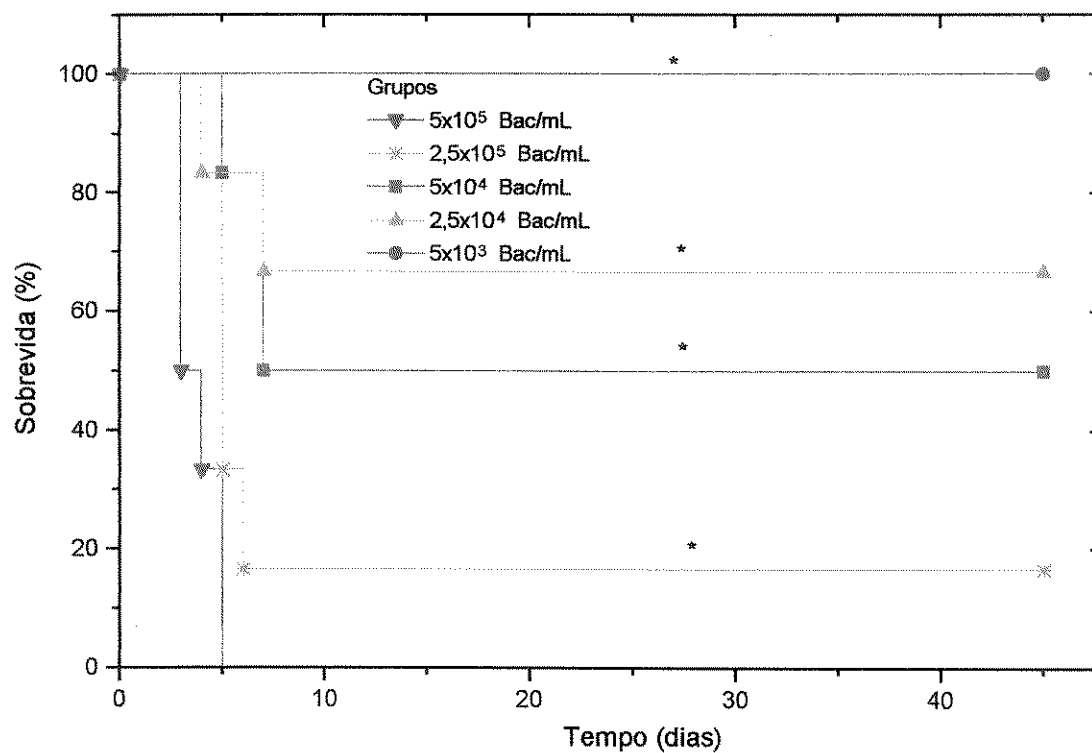


Figura 2 – Curva de sobrevivência de camundongos Balb/c infectados com diferentes doses de *Listeria monocytogenes*, a saber: 5×10^5 ; $2,5 \times 10^5$; 5×10^4 ; $2,5 \times 10^4$ e 5×10^3 bactérias/mL.

* $P < 0,001$ entre os grupos. Análise de Kaplan-Meier seguido de Cox-Mantel. (n=6/grupo)

4.2. EFEITOS DO ES NA SOBREVIVÊNCIA DE ANIMAIS INFECTADOS COM DOSE LETAL DE *L. monocytogenes*

Como podemos observar na figura 3, os animais controle apenas infectados apresentaram uma mortalidade de 100%. A eficácia antibacteriana das diferentes doses da administração preventiva do extrato da Espinheira Santa foi representada pela proteção de 40, 35 e 30% dos animais, com as doses de 1000, 500 e 250 mg/Kg respectivamente. Não houve diferença significativa entre as diferentes doses de Espinheira Santa.

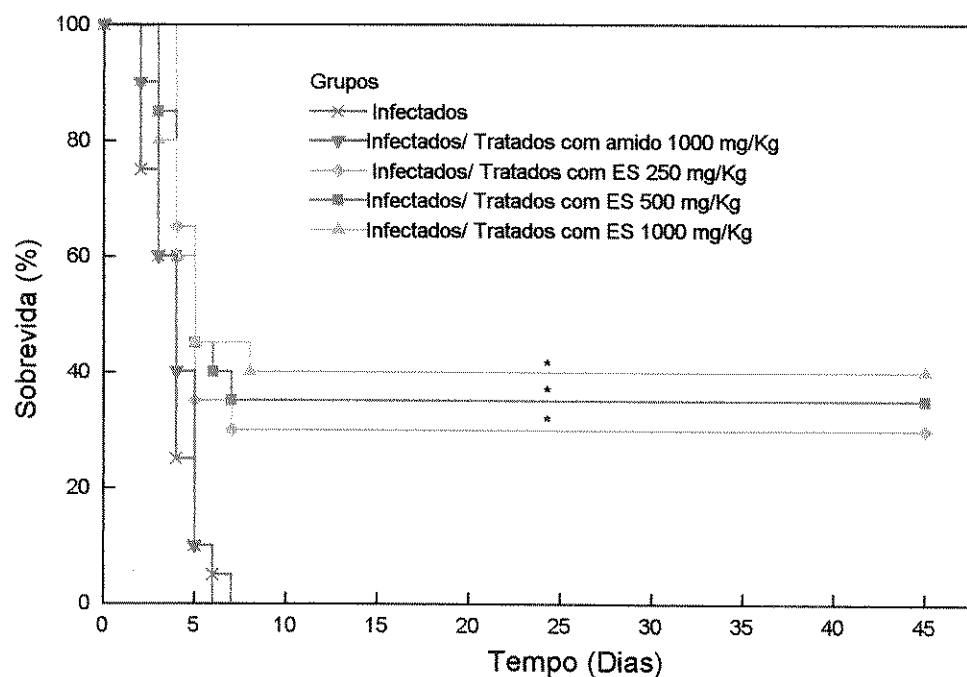


Figura 3 - Efeito do pré-tratamento com 250, 500 e 1000 mg/Kg/dia de *Maytenus ilicifolia* (ES), durante 5 dias, sobre a porcentagem de sobrevivência em camundongos Balb/c, inoculados com dose letal de *Listeria monocytogenes* (5×10^5 bac/mL). Análise de Kaplan-Meier seguido de teste de Cox-Mantel. * $P < 0,02$ em relação ao grupo infectado e ao grupo infectado/tratado com amido 1000 mg/Kg. (n=20/grupo)

4.3. EFEITOS DO ES SOBRE O NÚMERO DE PRECURSORES HEMATOPOÉTICOS PARA GRANULÓCITOS E MACRÓFAGOS DA MEDULA ÓSSEA E DO BAÇO DE CAMUNDONGOS (CFU-C) INFECTADOS COM *Listeria monocytogenes*.

Os efeitos da administração do extrato de ES sobre o número de CFU-GM da medula óssea de camundongos infectados pela *L. monocytogenes* estão apresentados na figura 4. O tratamento de animais normais (não infectados) com o extrato de ES não produziu alterações no número de CFU-GM medular quando comparado ao controle. Por outro lado, a infecção causou uma redução no número de CFU-GM que foi observado 48 horas após a infecção comparado aos controles. No entanto, quando os animais foram previamente tratados com o extrato de ES e infectados, houve reversão da redução do número de CFU-GM observada às 48 h da infecção.

Não observamos qualquer alteração na hematopoese esplênica de animais normais tratados com o extrato de ES (figura 5). Por outro lado, no animal infectado, um aumento significativo na hematopoese extramedular foi observado. O tratamento com as diferentes doses de extrato de ES reverteu este quadro produzido pela infecção.

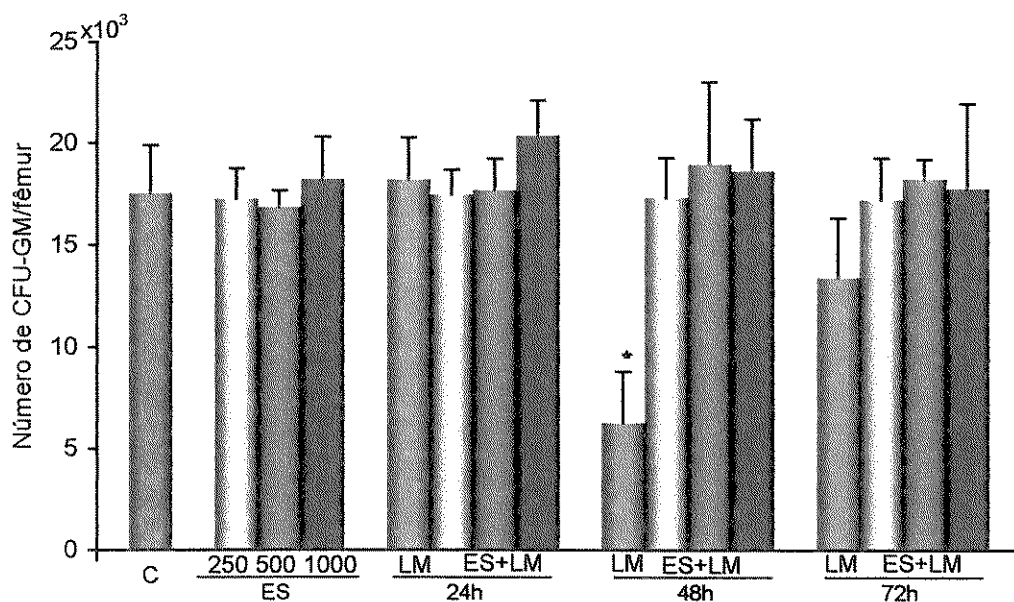


Figura 4 – Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais Balb/c normais, tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de *Maytenus ilicifolia*, durante 5 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bac/mL). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. O grupo controle recebeu água. Os resultados representam a média $\pm$ DP de 6 animais. ANOVA, Teste Tukey. * $P < 0,001$ em relação aos demais grupos.

ES 250 ■ ES 500 ■ ES 1000 ■ LM

C: Controle

LM: Infectados com *Listeria monocytogenes*

ES: Tratados com Extrato de *Maytenus ilicifolia*.

ES+LM: Infectados com *L. monocytogenes* e tratados com Extrato de *Maytenus ilicifolia*

24h: 24 horas após a infecção

48h: 48 horas após a infecção

72h: 72 horas após a infecção

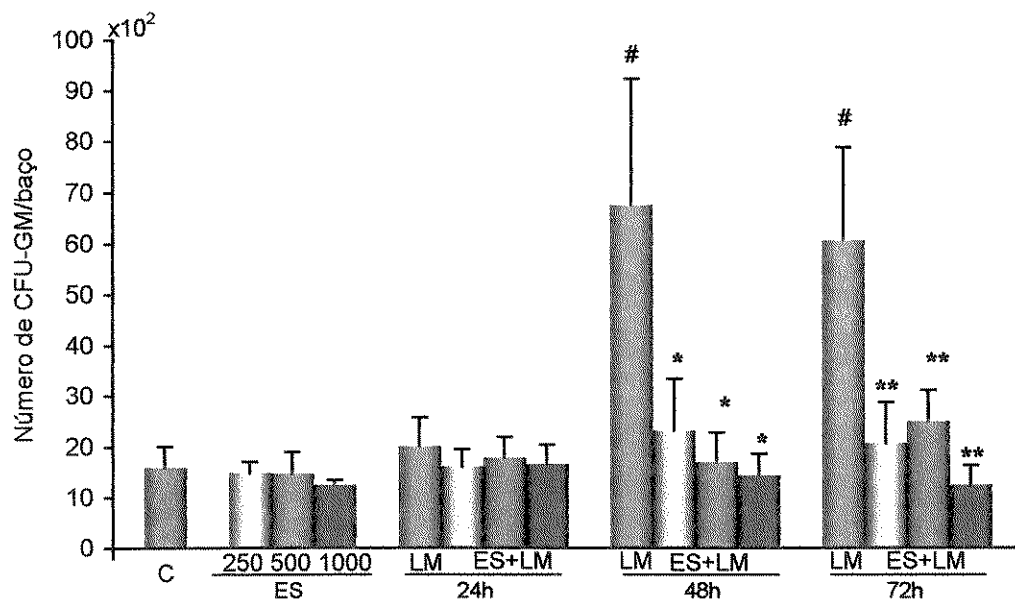


Figura 5 – Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais Balb/c normais, tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de *Maytenus ilicifolia*, durante 5 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bac/mL). Os animais foram sacrificados 24,48 e 72 horas após a infecção. Os grupos controle receberam água. Os resultados representam a média $\pm$ DP de 6 animais. ANOVA, Teste Tukey. #P< 0,001 em relação grupo C. *P< 0,001 em relação grupo LM 48. **P< 0,001 em relação grupo LM 72.

ES 250 ES 500 ES 1000 LM

C: Controle

LM: Infectados com *Listeria monocytogenes*

ES: Tratados com Extrato de *Maytenus ilicifolia*.

ES+LM: Infectados com *L. monocytogenes* e tratados com Extrato de *Maytenus ilicifolia*

24h: 24 horas após a infecção

48h: 48 horas após a infecção

72h: 72 horas após a infecção

4.4. EFEITOS DO ES SOBRE A PRODUÇÃO DE FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS (CSFS) EM ANIMAIS INFECTADOS COM *Listeria monocytogenes*.

O tratamento com as três doses do extrato da Espinheira Santa não produziu qualquer efeito na atividade estimuladora hematopoética no soro (CSF) de animais normais. A simples presença da infecção produziu aumento significativo nos níveis séricos de CSF, o qual foi mais acentuado às 48 e 72 h após a inoculação da bactéria. Por outro lado, observamos às 24 h da infecção um aumento significativo menos expressivo, nos níveis séricos de CSF em relação ao obtido às 48 e 72 h. (Figura 6)

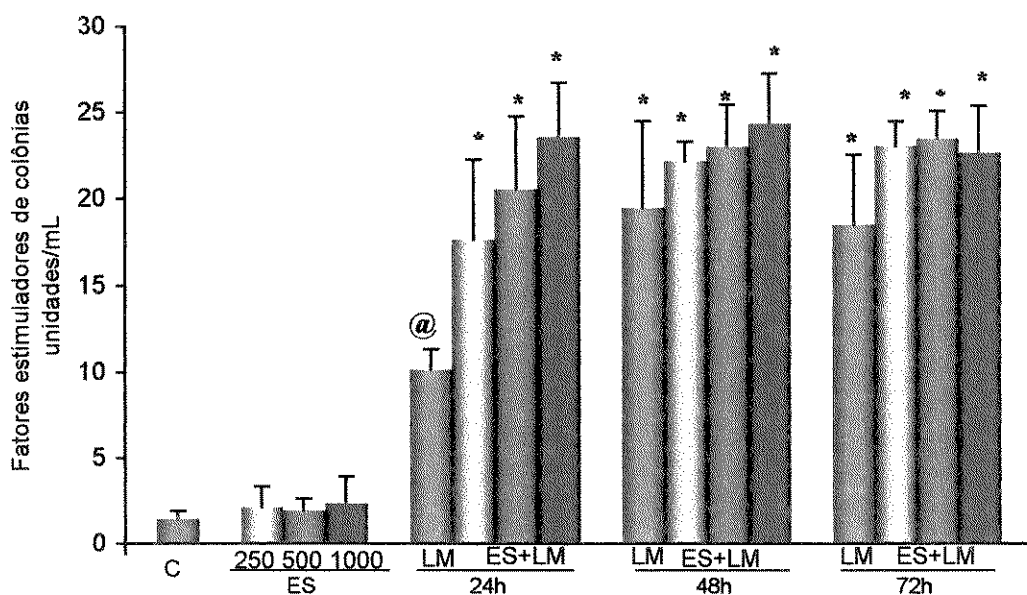


Figura 6 – Efeitos da incubação de células progenitoras hematopoéticas de animal Balb/c normal com o soro de animais Balb/c controle, tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg/dia de *Maytenus ilicifolia*, durante 5 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bac/mL). Os animais foram sacrificados 24,48 e 72 horas após a infecção. Os grupos controle receberam água. Os resultados representam a média $\pm$ DP de 6 animais. ANOVA, Teste Tukey. @P< 0,001 em relação ao grupo Controle e aos grupos tratados (ES). *P<0,01 em relação aos grupos Controle, tratados e LM 24h.

ES 250 ■ ES 500 ■ ES 1000 ■ LM

C: Controle

LM: Infectados com *Listeria monocytogenes*

ES: Tratados com Extrato de *Maytenus ilicifolia*.

ES+LM: Infectados com *L. monocytogenes* e tratados com Extrato de *Maytenus ilicifolia*

24h: 24 horas após a infecção / 48h: 48 horas após a infecção / 72h: 72 horas após a infecção

4.5. EFEITOS DO ES SOBRE A ATIVIDADE DE CÉLULAS “NATURAL KILLER” (NK) FRENTE A INFEÇÃO COM *Listeria monocytogenes*.

O tratamento de animais normais com o ES na dose de 1000mg/Kg/dia produziu um aumento na atividade de células NK em relação ao controle. Da mesma maneira, a infecção com *Listeria monocytogenes* na dose de 5×10^3 bac/mL produziu um aumento na atividade dessas células de forma significativa em relação ao grupo controle. Um aumento adicional, produzido pelo ES, na atividade de células NK, foi observado 48, 72 e 120 horas após a infecção comparado aos respectivos grupos somente infectados e ao controle. (Figura 7)

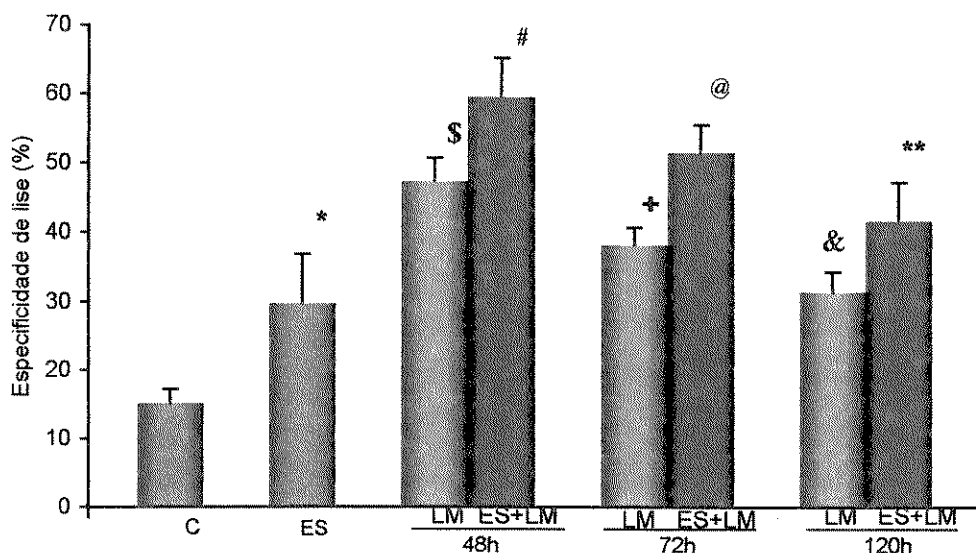


Figura 7 - Atividade de células NK de camundongos Balb/c controle, tratados com o extrato de *Maytemus ilicifolia*, 1000 mg/Kg/dia (V.O.) por 5 dias consecutivos e/ou infectados com a *Listeria monocytogenes* na dose de 5×10^3 bac/mL. Os grupos infectados foram sacrificados 48, 72 e 120 horas após a inoculação da bactéria. ANOVA, teste de Tukey. * $P < 0,001$ em relação aos grupos C, LM e ES+LM 48 e 72h. # $P < 0,001$ em relação ao grupo LM 48h e ES+LM 120. @ $P < 0,001$ em relação ao grupo LM 72h, LM 120 e ES+LM 120. ** $P < 0,01$ em relação aos grupos C, LM 120, ES+LM 48 e ES+LM 72. \$ $P < 0,05$ em relação aos grupos LM 72 e LM 120. + $P < 0,05$ em relação aos grupos C, ES, LM 48. & $P < 0,05$ em relação aos grupos C, ES+LM 48 e ES+LM 72

■ ES ■ LM ■ ES+LM

C: Controle

LM: Infectados com *Listeria monocytogenes*

ES: Tratados com Extrato de *Maytemus ilicifolia*.

ES+LM: Infectados com *Listeria monocytogenes* e tratados com Extrato de *Maytemus ilicifolia*

48h: 48 horas após a infecção / 72h: 72 horas após a infecção / 120h: 120 horas após a infecção

4.6. EFEITO DO ES SOBRE A PRODUÇÃO DE IFN- γ EM ANIMAIS INFECTADOS COM *Listeria monocytogenes*

Como pode ser observado na figura 8, houve um aumento significativo dessa citocina na vigência da infecção, comparado ao grupo controle. A produção desta citocina foi potencializada nos grupos de animais tratados com o ES e infectados, principalmente às 72 horas após a infecção.

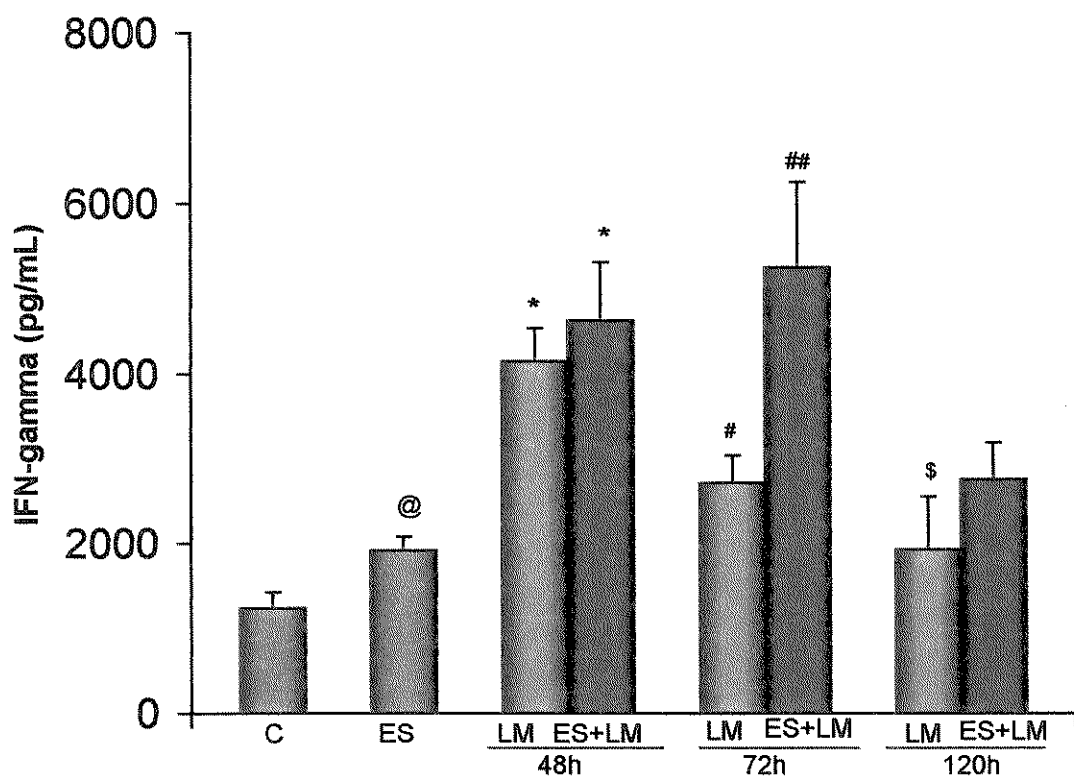


Figura 8 - Níveis de IFN- γ de camundongos Balb/c controles, tratados com o extrato de *Maytenus ilicifolia*, 1000 mg/Kg/dia (V.O) por 5 dias consecutivos, infectados com a *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bac/mL). (i.p), e grupos tratados com o ES e infectados. Os grupos infectados foram sacrificados 48, 72 e 120 horas após a inoculação da bactéria. @P< 0,05 em relação ao grupo C. *P< 0,05 em relação aos grupos C e ES. #P< 0,05 em relação aos grupos C e LM 48. ##P<0,05 em relação aos grupos C, ES e LM 72. \$ P<0,05 em relação aos grupos ES+LM 48 e ES+LM 72. Teste de Kruskal-Wallis e Wilcoxon.

■ ES ■ LM ■ ES+LM

C: Controle

LM: Infectados com *Listeria monocytogenes*

ES: Tratados com Extrato de *Maytenus ilicifolia*.

ES+LM: Infectados com *Listeria monocytogenes* e tratados com ES

24h: 24 horas após a infecção / 48h: 48 horas após a infecção / 72h: 72 horas após a infecção

4.7. EFEITOS DO ES NA SOBREVIVÊNCIA DE ANIMAIS C57BL/6 NORMAIS E KNOCKOUT PARA IFN- γ INFECTADOS COM UMA DOSE LETAL DE *L. monocytogenes*

Como podemos observar na figura 9, animais C57BL/6, os quais são geneticamente resistentes a *Listeria monocytogenes*, apresentaram total resistência à infecção, com sobrevivência de 100%. Em contrapartida, todos os animais knockout para IFN- γ tiveram óbito até o 3º dia após a infecção, sendo que, o tratamento prévio com o ES não modificou a resistência destes animais à infecção.

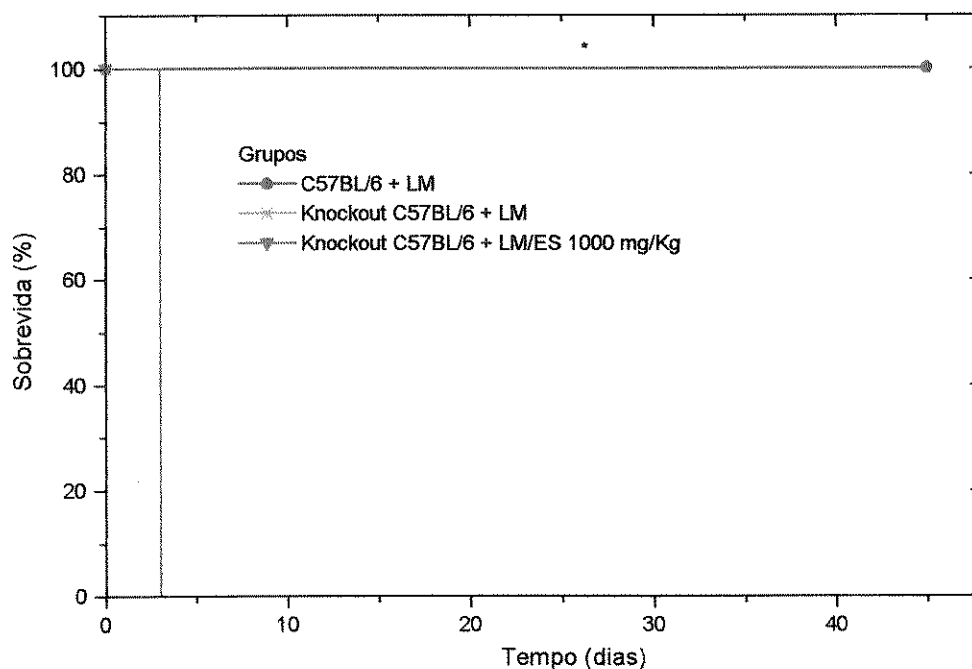


Figura 9 - Efeito do pré-tratamento com 1000 mg/Kg/dia de *Maytenus ilicifolia* (ES), durante 5 dias, sobre a porcentagem de sobrevivência em camundongos C57BL/6 normais e Knockout para IFN- γ , inoculados com dose letal de *Listeria monocytogenes* (5×10^5 bac/mL). *P<0,001 em relação aos demais grupos. Análise de Kaplan-Meier seguido de Cox-Mantel. (n=20/grupo)

5.DISSCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos a habilidade do extrato de Espinheira Santa (ES) em estimular a resposta hematopoética durante a infecção com *Listeria monocytogenes*. Nossos resultados demonstraram um aumento significativo na sobrevivência dos animais infectados com LM, tratados com três diferentes doses do extrato de ES. Em paralelo ao aumento na sobrevivência, a administração do extrato produziu aumento sobre o número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos infectados com LM, causando reversão da mielossupressão induzida pelo desenvolvimento da infecção. Em contrapartida, observamos uma reversão no aumento da hematopoese extramedular esplênica produzida pela infecção, nos animais tratados com as três doses do extrato de ES. Outros achados importantes relacionados ao tratamento foram a potencialização na atividade estimuladora de colônia no soro, observada principalmente às 24 horas após a infecção, nos níveis de IFN- γ e na atividade das células NK de animais infectados.

A resistência à infecção pela *Listeria monocytogenes* pode ser resultado de diferentes mecanismos. Um papel central dos macrófagos contra a infecção pela LM tem sido sugerido pela demonstração de que o fim da infecção está associado com a aquisição de macrófagos com habilidade listericida aumentada (DENIS et al., 1990; ROGERS et al., 1994; KAUFMANN, 1993, 1995;). A medula óssea é o sítio primário da geração de células progenitoras de granulócitos e macrófagos e a migração de células para o local da infecção é de importância crítica para aumentar a resistência do hospedeiro na fase inicial da infecção (RUCO & MELTZER, 1978; TRIPP et al., 1993; MELO et al., 2001; QUEIROZ et al., 2003). Este fato, bem documentado na literatura, é refletido pelo decréscimo no número de CFU-GM da medula óssea de animais infectados pela LM (WING et al., 1984;

CHEERS & STANLEY, 1988; DANTAS & QUEIROZ, 1999; QUADROS et al., 1999; QUEIROZ et al., 2000b; MELO et al., 2001). Resultados similares foram obtidos neste estudo, sugerindo que o efeito proliferativo pode ser, pelo menos em parte, responsável pela proteção dos animais frente à infecção.

Evidências na literatura indicam que o aumento da resistência à infecção secundária pode ser resultado da aumentada mobilização de fagócitos (CZUPRINSKY et al., 1985; MIELKE et al., 1988). Além disto, o aumento no CFU-GM da medula óssea de camundongos C57BL, resistentes à LM, sugerem que a produção destas células seja fundamental para a resistência destes animais (MANDEL & CHEERS, 1980; SADARANGANI et al., 1980; STEVENSON et al., 1981; WOOD et al., 1986; YOUNG & CHEERS, 1986; WOOD et al., 1986; CHEERS et al., 1988;).

Outro aspecto que deve ser considerado é o elevado nível de CSFs no soro de animais infectados. Foi relatada a importância crucial de fatores estimuladores de células na resposta hematopoética de animais infectados com LM. Destes o GM-CSF, o M-CSF e o G-CSF são os fatores encontrados em maior concentração no soro e em alguns órgãos como o baço e fígado. GM-CSF pode estimular a proliferação e diferenciação de células pluripotentes influenciando a migração destas células durante a infecção (WING et al., 1984; YOUNG & CHEERS, 1986; CHEERS et al., 1988; CHEERS & STANLEY, 1988; GREGORY et al., 1991; GREGORY & WING, 1993; ZHAN et al., 1998). Além disto, tem sido mostrado que esta citocina pode ativar neutrófilos maduros, aumentando a capacidade citolítica destas células (METCALF, 1995). Desta forma, podemos sugerir que o extrato de ES pode promover a liberação destas citocinas e assim aumentar a proliferação de CFU-GM e, conseqüentemente, a produção de células sanguíneas periféricas funcionais.

A reversão da mielossupressão e do aumento na proliferação do CFU do baço parece ser importante para a resistência dos animais à infecção. A este respeito, o aumento rápido dos números de precursores hematopoéticos é característico em uma infecção secundária a LM, o qual se mantém por vários dias (WING et al., 1985, 1987; GREGORY & WING, 1993).

As células NK também possuem papel primordial na defesa do hospedeiro à infecção por LM (KEARNS & LEU, 1984; POSTON & KURLANDER, 1991; BANCROFT, 1993; TEIXEIRA & KAUFMANN, 1994; LADEL et al., 1996). Macrófagos infectados pela bactéria produzem IL-1, TNF- α e IL-12 que estimulam células NK a produzirem o IFN- γ , que, por sua vez, estimula a atividade antimicrobiana e citotóxica dos macrófagos (HAHN & KAUFMANN, 1981; NISHIBORI et al., 1996).

Apesar destas células fagocitárias serem as efetoras iniciais da resposta imunológica à bactéria, a resposta dos linfócitos T parece ser essencial na fase tardia da infecção agindo na erradicação da bactéria. Embora as células NK controlem a replicação da listeria na fase inicial, animais deficientes de células T não resistem à infecção (MACKANESS & HILL, 1969; DAUGELAT & KAUFMANN, 1996; MIYAMOTO et al., 2001). A este respeito, experimentos realizados com camundongos nude, os quais não possuem células T, demonstraram que os mesmos podem responder temporariamente à doença, mas não conseguem controlá-la (EMMERLING et al., 1974; BANCROFT et al., 1991; UNANUE, 1997). Todos os três subtipos de linfócitos T, CD4⁺ auxiliar, CD8⁺ supressor e CD4⁻CD8⁻, contribuem para a proteção do organismo contra a bactéria, predominando a resposta do tipo Th1 (MOMBAERTS et al., 1993). As células CD4⁺ reconhecem as proteínas processadas pelas células apresentadoras de antígeno e medeiam uma reação de

hipersensibilidade do tipo tardio (KAUFMANN et al., 1987; MIELKE, 1988; BEATTI et al., 1991; DAUGELAT et al., 1994).

Muitos estudos confirmam o papel relevante do IFN- γ na resistência à LM a qual torna-se fatal na ausência desta citocina (BUCHMEIER & SCHREIBER, 1985; NAKANE et al., 1989, 1990; DUNN e NORTH, 1991; LEIST et al., 1991; 1992; HUANG et al., 1993). Observamos no estudo de sobrevivência com animais C57BL/6, resistentes geneticamente a *Listeria*, que a presença de IFN- γ é crucial para manutenção da vida do animal, tendo em vista que, no grupo de animais C57BL/6 Knockout para IFN- γ , todos os animais morreram em até 72 h após a infecção.

As células NK e as células CD4⁺CD8⁻ são potentes produtores de IFN- γ , o qual ativa as funções antimicrobiais dos macrófagos (BANCROFT, 1993; KAUFMANN, 1993; MOMBAERTS et al., 1993; LADEL et al., 1996;). Além disto, as células NK necessitam da presença das células CD4⁺CD8⁻ para que a resposta seja efetiva, pois na ausência destas, é observada exacerbação da doença (LADEL et al., 1996).

Diante do fato, bem documentado na literatura, de que as células NK são as principais produtoras de IFN- γ , podemos sugerir que o tratamento com Espinheira Santa, de animais infectados promove reversão da mielossupressão e do aumento da hematopoese esplênica. Aumenta a produção de fatores estimuladores de colônias no soro de animais infectados e, potencializa a atividade das células NK e conseqüentemente o aumento do IFN- γ .

6.CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a eficácia antibacteriana representada pela proteção de até 40%, produzida pelo tratamento com diferentes doses de extrato de Espinheira Santa, nos camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*, está relacionado à modulação de vários parâmetros imunohematopoéticos:

1. Reversão da mielossupressão e do dramático aumento na hematopoese esplênica produzidos pela evolução temporal da infecção.
2. Aumento na atividade estimuladora de colônias (CSF) no soro
3. Aumento da atividade das células “natural killer”.
4. Aumento na produção de IFN- γ .
5. O fitoterápico apresenta ampla faixa terapêutica.

7.SUMMARY

In this work, we have investigated the effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (ES) extract on the growth and differentiation of bone marrow and spleen granulocyte-macrophage progenitor cells (CFU-GM), serum colony stimulating activity (CSA), natural killer (NK) cell activity and IFN- γ production in a *Listeria monocytogenes* infected mice. A significant reduction in the CFU-GM number was observed in the initial phase of the infection with sublethal dose of (5×10^3 bac/mL), in parallel to a significant increase in the spleen hematopoiesis. The treatment of mice with 250, 500 and 1000 mg/Kg/day ES extract for five days prior to the infection stimulated bone marrow myelopoiesis, reduced to normal levels CFU-GM number in the spleen and increased the serum colony stimulating activity. The infection enhanced IFN- γ levels and NK cell activity. Treatment with ES extract using the same dose schedule presented above, led to further increases in IFN- γ levels and NK cell activity. Peak levels of IFN- γ was seen at 72 h after the infection and NK cell activity was mostly increased at 48 h after the infection. Evaluation of the therapeutic efficacy of the ES extract, evaluated by the resistance of infected mice exposed to lethal dose of the bacteria (5×10^5 Bac/mL), resulted in protection of 40% with dose of 1000 mg/Kg and of 30% with 250 mg/Kg. Difference between the doses was not significant. Our results show that ES extract can increase antibacterial resistance in the listeriosis by modulation of CFU-GM generation, increased IFN- γ production and lytic NK cells activity.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, J. R. - **Tratado de Fitomedicina: Bases clínicas e farmacológicas**. Ed. SRL,. Argentina, ISIS Ediciones S.R.L., 1998, p. 419-23.
- APPELBERG, R.; CASTRO, A. G.; SILVA, M. T. - Neutrophils as effector cells of T-cell-mediated, acquired immunity in murine listeriosis. **Immunology**, **83**: 302-7, 1994.
- BANCROFT, G. J.; SCHREIBER, R. D.; UNANUE, E. R. - Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation defined in the scid mouse. **Immunological Reviews**, **124**: 5-24, 1991.
- BANCROFT, G.J. - The role of natural killer cells in innate resistance to infection. **Current Opinion in Immunology**, **5**: 503-10, 1993.
- BEATTI, I. A.; SWAMINATHAN, B.; ZIEGLER, H. K. - Cloning and characterization of T cell-reactive protein antigens from *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, **58**: 2792-803, 1991.
- BECKERMAN, K. P.; ROGERS, H. W.; CORBETT, J. A.; SCHREIBER, R. D.; MEDANIEL, M. L.; UNANUE, E. R. - Release of nitric oxide during the T cell-independent pathway of macrophage activation. **Journal of Immunology**, **150**: 888-95, 1993.
- BUCHMEIER, N. A.; SCHREIBER, R.D. - Requirement of endogenous interferon- γ production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. **Proceedings of the National Academy of the United States of America**, **82**: 7404-08, 1985.
- CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. - Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. And *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, **25**(1): 85-9, 2002.

- CARLINI, E. A. - Estudos da ação antiulcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* - espinheira santa e outras). Brasília, CEME/AFIP, 1988.
- CARLINI, E. A.; OLIVEIRA, M. G.; MONTEIRO, M. G.; MACAUBAS, C.; BARBOSA, V. P. - Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, **34(1)**: 29-41, 1991.
- CASSATELLA, M. A. - The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunology Today**, **16(1)**: 21-6, 1995.
- CHEERS, C.; HAIGH, A. M.; METCALF, D.; STANLEY, E. R. - Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separated determinations of macrophages; granulocyte; granulocyte-macrophage and CSFs. - **Infection Immunity**, **56**: 225-47, 1988.
- CHEERS, C.; STANLEY, E. R. - Macrophage production during murine listeriosis: colony-stimulating factor (CSF-1) and CSF-1 binding cells is genetically resistant and susceptible mice. - **Infection immunity**, **56**: 2972-8, 1988.
- CIKES, M.; FRIBERG, F.; KLEIN, G. - Progressive loss of H-2 antigen(s) determined by Maloney leukemia virus in culture murine lymphoma. **Journal National Cancer Institute**, **50**: 347, 1973.
- CONLAN, J. W.; NORTH, R.J. - Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defence strategy against a facultative intracellular bacterium. **Journal of Experimental Medicine**, **174**: 741-4, 1991.
- CONLAN, 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 revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. **Journal of Experimental Medicine**, **179**: 259-68, 1994.

- CZUPRYNSKI, C. J.; HENSON, P. M.; CAMPBELL, P. A. – Killing of *Listeria monocytogenes* by inflammatory neutrophils and mononuclear phagocytes from immune and non-immune mice. **Jornal of Leukocyte Biology**, **35**: 193-208, 1984.
- CZUPRINSKI, C. J.; HENSON, P. M.; CAMPBELL, P. A. – Enhanced accumulation of inflammatory neutrophils and macrophage mediated by transfer of T cells from mice immunized with *Listeria monocytogenes*. **Journal of Immunology**, **134**: 3449-54, 1985.
- DANTAS, D. C. M.; QUEIROZ, M. L. S. - Effects of *Chlorella vulgaris* in bone marrow progenitor cells in mice infected with *Listeria monocytogenes*. **The International Journal of Immunopharmacology**, **21**: 499-508, 1999.
- DANTAS, D. C. M.; KANENO, R.; QUEIROZ, M. L. S. - The effect of *Chlorella vulgaris* in the protection of mice infected with *Listeria monocytogenes*. Role of natural killer cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, **21(3)**: 609-619, 1999.
- DAUGELAT, S.; LADEL, C. H.; SCHOEL, B.; KAUFMANN, S. H. E. - Antigen-specific T cell responses during primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection. **Infection Immunity**, **62**: 1881-8, 1994.
- DAUGELAT, S.; KAUFMANN, S. H. E. - Role of the Th1 and Th2 cells in bacterial infections. In: Th1 and Th2 cells in health and disease. **Chemical Immunology**, **63**: 66-97, 1996.
- DENIS, M.; GREGG, E. O. – studies on cytokine activation of listericidal activity in murine macrophages. **Canadian Journal of Microbiology**, **36**: 671-5, 1990.
- DUNN, D. L.; NORTH, R. J. - Early gamma interferon production by natural killer cells important in defense against murine listeriosis. **Infection and Immunity**, **59**: 2892-900, 1991.

- EDELSON, B. T.; UNANUE, E. R. - Immunity to *Listeria* infection. **Current Opinion in Immunology**, 12(4): 425-31, 2000.
- EMMERLING, P.; FINGER, H.; BOCKEMUHL, J. - *Listeria monocytogenes* infection in nude mice. **Infection and Immunity**, 12: 437-9, 1974.
- FARGEAS, C.; WU, C. Y.; NAKAJIMA, T.; COX, D.; NUTMAN T.; DELESSESSE, G. - Differential effect of transforming growth factor beta on the synthesis of Th1- and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes. **European Journal of Immunology**, 22(8): 2173-6, 1992.
- FERRICK, D. A.; SCHRENZEL, M. D.; MULVANIA, T.; HSIEH, B.; FERLIN, W.G.; LEPPER, H. - Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. **Nature**, 373: 255-7, 1995.
- FLESH, I. E. A.; KAUFMANN, S. H. E. - Role of macrophages and $\alpha\beta$ T lymphocytes in early interleukin 10 production during *Listeria monocytogenes* infection. **International Immunology**, 6: 463-8, 1994.
- GEOCZE, S.; VILELA, M. P.; CHAVES, B. D. R.; FERRARI, A. P.; CARLINI, E. A. - Tratamento de pacientes portadores com dispepsia alta ou úlcera péptica com preparações de Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). Publicação CEME, PPPM No. 2, 1988, p.75-87.
- GONZALES, F. G.; PORTELA, T. Y.; STIPP, E. J.; DI STASI, L. C. - Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, 77(1): 41-47, 2001.

GREGORY, S. H., MAGEE, D. M., WING, E. - The role of colony-stimulating factors in host defenses. **Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine**, **197**: 349-60, 1991.

GREGORY, S. H.; WING, E. J. - Interferon-gama inhibits the replication of *Listeria monocytogenes* in hepatocytes. **Journal of Immunology**, **151**: 1401-9, 1993.

HAAK-FRENDSCHO, M.; BROWN, I. F.; ISAWA, Y.; WAGNER, R. D.;
CZUPRYNSKI, C. J. - Administration of anti-IL-4 antibody 11B11 increases the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. **Journal of Immunology**, **148**: 3978-85, 1992.

HAHN, H.; KAUFMANN, S. H. E. - The role of cell-mediated immunity in bacterial infections. **Reviews of Infection Disease**, **3**: 1221-50, 1981.

HARTY, J. T.; SCHREIBER, R. D.; BEVAN, M. J. - CD8 T cells can protect against an intracellular bacterium in an interferon gamma-independent fashion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; **89**(23): 11612-6, 1992.

HUANG, S.; HENDRIKS, W.; ALTHAGE, A.; HEMMI, S.; BLUETHMANN, H.;
KAMIJO, R. et al. - Immune response in mice that lack the interferon-g receptor. **Science**, **259**: 1742-5, 1993.

IZAWA, Y.; CZUPRYNSKI, C. J. - Effects of administration of murine recombinant IL-4 on the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. **Immunology Letters**, **32**(2): 185-9, 1992.

IZAWA, Y.; WAGNER, R. D.; CZUPRYNSKI, C. J. - Analysis of cytokine mRNA expression in *Listeria*-resistant C57BL/6 and *Listeria*-susceptible A/J mice during *Listeria monocytogenes* infection. **Infection and Immunity**, **61**(9): 3739-44, 1993.

- KAUFMANN, S. H. E.; HAHN, H.; BERGER, R.; KIRCHER, H. - Interferon-gamma production by *Listeria monocytogenes*-specific T cells active in cellular antibacterial immunity. **European Journal of Immunology**, **13**: 265-8, 1983.
- KAUFMANN, S. H. E.; HUG, E.; DELIBERO, G. - *Listeria monocytogenes*-reactive T lymphocyte clones with cytolytic activity against infected target cells. **Journal of Experimental Medicine**, **164**(1): 363-8, 1986.
- KAUFMANN, S. H. E.; HUG, E.; VÄTH, U.; DELIBERO, G. - Specific lysis of *Listeria monocytogenes*-infected macrophages by class II-restricted L3T4+ T cells. **European Journal of Immunology**, **17**: 237, 1987.
- KAUFMANN, S. H. E. - Immunity to intracellular bacteria. **Annual Review of Immunology**, **11**: 129-63, 1993.
- KAUFMANN, S. H. E.; BLUM, C.; YAMAMOTO, S. - Crosstalk between $\alpha\beta$ T cells and $\gamma\delta$ T cells in vivo: activation of $\alpha\beta$ T cell responses after $\gamma\delta$ T-cell modulation with the monoclonal antibody GL3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **90**: 9620-24, 1993.
- KAUFMANN, S. H. E. - Immunity to intracellular microbial pathogens. **Immunology Today**, **16**(7): 338-42, 1995.
- KEARNS, R. J.; LEU, W. J. - Modulation of natural killer activity in mice following infection with *Listeria monocytogenes*. **Cellular Immunology**, **84**: 361-71, 1984.
- KIRDELEN, A. F.; KAUFMANN, S. H. E.; LOBAMANN-MATTHES, M. L. - Protection of mice against the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* by recombinant immune interferon. **European Journal of Immunology**, **14**: 964-7, 1984.

- LADEL, C. H.; FLESCH, I. E. A.; ARNOLDI, J.; KAUFMANN, S. H. E. - Studies of MHC-deficient Knock-out mice reveal impact of both MHC-I and MHC-II dependent T cell responses on *Listeria monocytogenes* infection. **Journal of Immunology**, **153**: 3116-22, 1994.
- LADEL, C. H.; BLUM, C.; KAUFMANN, S. H. E. - Control of natural killer cell-mediated innate resistance against the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes* by γ/δ lymphocytes. **Infection and Immunity**, **64**: 1744-9, 1996.
- LEIST, T. P.; MEAGER, A.; EXLEY, T.; ZINKERNAGEL, R. M. - Evidence for a role of IFN- γ in control of *L. monocytogenes* in T cell deficient mice. **Experientia**, **47**: 630-2, 1991.
- LEPAY, D. A.; STEINMAN, R. M.; NATHAN, C. F.; MURRAY, H. W.; COHN, Z. A. - Liver macrophages in murine listeriosis: cell mediated immunity is correlated with an influx of macrophages capable of generating reactive oxygen intermediates. **Journal of Experimental Medicine**, **161**: 1503-12, 1985.
- MACKANESS, G. B.; HILL, W. C. - The effect anti-lymphocyte globulin on cell-mediated resistance to infection. **Journal of Experimental Medicine**, **129**: 993-1012, 1969.
- MANDEL, T. E.; CHEERS, C. - Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: histopathology of listeriosis in resistant and susceptible strains. **Infection and Immunity**, **30**: 851-61, 1980.
- MELO, A.; JUSTO, G. Z.; QUEIROZ, M. L. S. - Stimulation of myelopoiesis in *Listeria monocytogenes*-infected mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **Human and Experimental Toxicology**, **20**: 38-45, 2001.
- METCALF, D. - **The hemopoietic colony stimulating factors from biology to clinical applications.** Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1995.

- MIELKE, M. E. A.; EHLERS, S.; HANN, H. - T-cell subsets in delayed-type hypersensitivity, protection and granuloma formation in primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection in mice: superior role of Lyt-2 T cells in acquired immunity. **Infection and Immunity**, **56**: 1920-5, 1988.
- MIELKE, M. E. A.; EHLERS, S.; HANN, H. - The role of cytokines in experimental listeriosis. **Immunobiology**, **189**: 285-315, 1993.
- MILON, G. – *Listeria monocytogenes* in laboratory mice: a model of short-term infections and pathogenic process controllable by regulated protective immune responses. **Immunological Review**, **158**: 37-46, 1997.
- MIYAMOTO, E. M.; EMOTO, M.; ZERRAHN, J.; KAUFMANN, S. H. – A critical role of T-cell receptor gamma/delta cells in antibacterial protection in mice early in life. **Hepatology**, **33**(4): 887-93, 2001.
- MOCCI, S.; DALRYMPLE, A S.; NISHINAKAMURA, R.; MURRAY, R. – The cytokine stew and innate resistance to *L. monocytogenes*. **Immunological Review**, **158**: 107-14, 1997.
- MOMBAERTS, P.; AMOLDI, J.; RUSS, F.; TONEGAWA, S.; KAUFMANN, S. H. E. - Different roles of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in immunity against an intracellular bacterium. **Nature**, **365**: 53-56, 1993.
- MONACHE, F. D. - Maitenin: a new antitumoral substance from *Maytenus* sp. **Gazetta Chimica Italiana**, **102**: 317-20, 1972.
- MONTANARI, T.; CARVALHO, J. E.; DOLDER, H. – Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss on spermatogenesis. **Contraception**, **57**: 335-9, 1998.

- MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. – Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. **Contraception**, **65(2)**: 171-5, 2002.
- NAKANE, A.; MINAGAWA, T.; KOHANAWA, M.; CHEN, Y.; SATO, H.; MORIYAMA, M. et al. - Interactions between endogenous gamma interferon and tumor necrosis factor in host resistance against primary and secondary *Listeria monocytogenes* infections. **Infection and Immunity**, **57**: 3331-7, 1989.
- NAKANE, A.; NUMATA, A.; ASANO, M.; KOHANAWA, M.; CHEN, Y.; MINAGAWA, T. - Evidence that endogenous gamma interferon is produced early in *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, **58**: 2386-88, 1990.
- NAKANE, A.; NUMATA, A.; MINAGAWA, T. - Endogenous tumor necrosis factor, interleukin-6, and gamma interferon levels during *Listeria monocytogenes* infection in mice. **Infection and Immunity**, **60**: 523-8, 1992.
- NEIGHBORS, M.; XU, X.; BARRAT, F. J.; RUULS, S. R.; CHURAKOVA, T.; DEBETS, R. et al. – A critical role for interleukin 18 in primary and memory effector responses to *Listeria monocytogenes* that extends beyond its effects on Interferon gamma production. **Journal of Experimental Medicine**, **194(3)**: 343-54, 2001.
- NISHIBORI, T.; XIONG, H.; KAWAMURA, I.; ARAKAWA, M.; MITSUYAMA, M. – Induction of cytokine gene expression by listeriolysin O and roles of macrophage and NK cells. **Infection and Immunity**, **64(8)**: 3188-95, 1996.
- NORTH, R. J. - The relative importance of blood monocytes and fixed macrophages to the expression of cell-mediated immunity to infection. **Journal of Experimental Medicine**, **132**: 521-34, 1970.

- NORTH, R. J. - Cellular mediators of anti-*Listeria* immunity as an enlarged population of short-lived, replicating T cells. **Journal of Experimental Medicine**, 138: 342-55, 1973.
- NORTH, R. J.; DUNN, P. L.; CONLAN, J. W. – Murine listeriosis as a model of antimicrobial defense. **Immunological Review**, 158: 27-36, 1997.
- OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, G. M.; MACAUBAS, C.; BARBOSA, V. P.; CARLINI, E. A. – Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytemus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, 34(1): 29-41, 1991.
- POSTON, R. M.; KURLANDER, R. A. J. - Analysis of the time course of IFN- γ mRNA and protein production during murine listeriosis. **Journal of Immunology**, 146: 4333-7, 1991.
- QUADROS, M. R.; BRITO, A. R. M. S.; QUEIROZ, M. L. S. - *Petiveria alliacea* L. extract protects mice against *Listeria monocytogenes* infection – Effects on bone marrow progenitor cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 21(1): 109-24, 1999.
- QUEIROZ, M. L. S.; SANTOS, L. M. B.; QUADROS, M. R. - Cytokine profile and natural killer cell activity in *Listeria monocytogenes* infected mice treated orally with *Petiveria alliacea* extract.. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 22(3): 501-18, 2000a.
- QUEIROZ, M. L. S.; JUSTO, G. Z.; PEREIRA-DA-SILVA, F. R. R.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P. - Stimulatory action of *Pluchea quitoc* extract on the hematopoietic response during murine listeriosis. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 22(4): 721-40, 2000b.

- QUEIROZ, M. L. S.; JUSTO, G. Z.; VALADARES, M. C.; PEREIRA-DA-SILVA, F. R.
R. - Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, **23(3)**: 367-82, 2001.
- QUEIROZ, M. L. S.; BINCOLETTO, C.; VALADARES, M. C.; DANTAS, D. C. M.; SANTOS, L. M. B. – Effects of *Chlorella vulgaris* extract on cytokines production in *Listeria monocytogenes* infected mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, **24(3)**: 483-96, 2002.
- QUEIROZ, M. L. S.; RODRIGUES, A. P. O.; BINCOLETTO, C.; FIGUEIREDO, C. A. V.; MALACRIDA, S. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. **International Immunopharmacology**, **3**: 889-900, 2003.
- ROGERS, H. W.; TRIPP, C. S.; SCHREIBER, R. D.; UNANUE, E. R. - Endogenous IL-1 is required for neutrophil recruitment and macrophage activation during murine listeriosis. **Journal of Immunology**, **153**: 2093-101, 1994.
- ROGERS, H. W.; UNANUE, E. R. – Neutrophils as effector cells of T-cell-mediated, acquired immunity in murine listeriosis. **Immunology**, **83**: 302-7, 1994.
- RUCO, L. P.; MELTZER, M. S. – Macrophage activation for tumor cytotoxicity: tumoricidal activity by macrophages from C3H/HeJ mice requires at last two activation stimuli. **Cell Immunology**, **41**: 35-51, 1978.
- SADARANGANI, C.; SKAMENE, E.; KONGSHAVN, P. Cellular basis for genetically determined enhanced resistance of certain mouse strains to listeriosis. **Infection and Immunity**, **28**: 381-6, 1980.

- SANTANA, C. F. - Estudos farmacodinâmicos e histopatológicos da Maitenina. **Revista do Instituto de Antibióticos**, 11(2): 61-7, 1971.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. - **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Editora da UESC, 1ª. Ed., 1999, p.30-1, 42-7, 50-1, 154-7, 222,
- SOUZA-FORMIGONI, M. L. O. - Antiulcerogenics effects of two species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, 34: 21-7, 1991.
- STEVENSON, M. M.; KONGSHAVN, P.; SKAMENE, E. – Genetic linkage of resistance to *Listeria monocytogenes* with macrophage inflammatory response. **Journal of Immunology**, 127: 402-7, 1981.
- TABACH, R.; RODRIGUES, E.; MOURA, Y. G.; CARLINI, E. A. – Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss): efeitos do pH, volume e índice de úlceras estomacais – estudos experimentais e clínicos. **Revista Racine**, 61: 44-8, 2001.
- TABACH, R.; CARLINI, E. A; MOURA, Y. G. – Um novo extrato de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. (Toxicologia clínica – Fase I) avaliação em seres humanos. **Revista Racine**, 71: 38, 2002.
- TEIXEIRA, H. C.; KAUFMANN, S. H. E. - Role of NK1.1+ cells in experimental listeriosis. NK1+ cells are early IFN-gamma producers but impair resistance to *Listeria monocytogenes*. **Journal of Immunology**, 152: 1873-82, 1994.
- TRINCHIERI, G. - Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. **Immunology Today**, 14: 335-38, 1993.

- TRIPP, C. S.; WOLF, S. H.; UNANUE, E. R. - Interleukin 12 and tumor necrosis factor α are costimulants of interferon- γ production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and IL-10 is a physiologic antagonist. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **90**: 3725-9, 1993.
- UNANUE, E. R. - Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. **Immunological Review**, **158**: 11-25, 1997.
- VAN DEN ENGH, G. J.; BOL, F. - The presence of CSF activity in the serum of endotoxin treated mice. **Cell Tissue Kinetic**, **82**: 579, 1975.
- VARGA, V. M. F.; GUIDOBONO, R. R.; HENRIQUES, J. A. - Genotoxicity of Plant Extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **86(2)**: 67-70, 1991
- WAGNER, R. D.; CZUPRYNSKI, C. J. - Cytokine mRNA expression in livers of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Journal of Leukocyte Biology**, **53**: 525-31, 1993.
- WING, E. J.; WAHEED, A.; SHADDUCK, R. K. - Changes in serum colony-stimulating factor and monocytic progenitor cells during *Listeria monocytogenes* infection in mice. **Infection and Immunity**, **45**: 180-4, 1984.
- WING, E. J.; BARCZYNSKI, L. K.; WAHEED, A.; SHADDUCK, R. K. - Effect of *Listeria monocytogenes* infection on serum levels of colony-stimulating factor and number of progenitor cells in immune and non-immune animals. **Infection and Immunity**, **49**: 325-8, 1985.
- WING, E. J.; MAGEE, D. M.; BARCZYNSKI, L. K. - Analysis of colony-stimulating factors and macrophage progenitor cells in mice immunized against *Listeria monocytogenes* by adoptive transfer. **Infection and Immunity**, **55**: 1843-7, 1987.

WING, E. J.; GREGORY, S. H. - An updated model of cell-mediated immunity-listeriosis: clinical and research aspects. **Allergy and Asthma Proceedings**, **21(4)**: 209-14, 2000.

WOOD P. R.; SPANIDIS, V.; FRANGOS, K.; CHEERS, C. – The in vitro bactericidal activity of peritoneal and spleen cells from *Listeria*-resistant and susceptible mouse strains. *Cell Immunology*, 99: 160-9, 1986.

YOUNG, A M.; CHEERS, C. – Colony-forming cells and colony-stimulating activity during listeriosis in genetically resistant or susceptible mice. **Cell Immunology**, **97**: 227-37, 1986.

ZHAN, Y. F.; LIESCHKE, G. J.; GRAIL, D.; DUNN, A. R.; CHEERS, C. - Essential roles for granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF in the sustained hematopoietic response of *Listeria monocytogenes*. **Blood**, **91**: 863-9, 1998.

9.APÊNDICE

Tabela 2 - Avaliação da sobrevida de animais tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de *Maytemus ilicifolia*, durante 5 dias, e infectados (LM) com *Listeria monocytogenes* (5×10^5 bac/mL). Análise de Kaplan-Meier seguido de teste de Cox-Mantel. * P< 0,01 em relação ao grupo infectado e #P< 0,02 em relação ao grupo infectado e tratado com amido 1000 mg/Kg. (n=20/grupo)

Sobrevida					
Dias	LM	LM + Amido 1000 mg/Kg	LM + ES 250 mg/Kg *#	LM + ES 500 mg/Kg *#	LM + ES 1000 mg/Kg *#
2	5	2			2
3	3	6		3	2
4	7	4	7	5	4
5	3	6	6	3	3
6	1	2		1	
7	1		1	1	
8					1
45					

Tabela 3 – Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de *Maytemus ilicifolia* (ES). Os animais foram sacrificados 24, horas após o último tratamento. Os animais do grupo controle receberam água e do grupo Amido receberam água com 1000mg/Kg de amido.

N	Controle	Amido	ES 250	ES 500	ES 1000
1	20,91	16,1	19,35	17,86	17,94
2	17,82	17,94	15,19	15,68	17,68
3	17,28	14,41	18,54	16,00	16,83
4	13,52	21,07	17,46	17,17	19,89
5	18,05	15,96	16,45	16,83	15,5
6	17,57	15,65	16,32	17,32	21,24
Média	17,52	16,85	17,21	16,81	18,18
DP	2,36	2,35	1,54	0,82	2,07

Tabela 4 – Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais infectados com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bac/mL) e tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de *Maytenus ilicifolia* (ES). Os animais foram sacrificados 24, horas após a infecção. Os animais do grupo controle receberam água e do grupo Amido receberam água com 1000mg/Kg de amido.

N	Controle	Amido	LM 24	LM +250	LM+500	LM+1000
1	20,91	16,10	20,46	19,42	19,00	21,56
2	17,82	17,94	19,27	16,89	18,13	20,08
3	17,28	14,41	20,21	16,05	16,15	20,80
4	13,52	21,07	15,75	16,45	16,80	16,95
5	18,05	15,96	16,45	17,46	15,96	21,00
6	17,57	15,65	16,97	18,24	19,69	21,52
Média	17,52	16,85	18,18	17,41	17,62	20,31
DP	2,36	2,35	2,04	1,24	1,55	1,73

Tabela 5 – Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais infectados com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bac/mL) e tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de *Maytenus ilicifolia* (ES). Os animais foram sacrificados 48, horas após a infecção. Os animais do grupo controle receberam água e do grupo Amido receberam água com 1000mg/Kg de amido. *P<0,001 em relação ao grupo infectado LM 48. ANOVA, teste de Tukey.

N	Controle	Amido	LM 48	*LM+250	*LM+500	*LM+1000
1	20,91	16,1	3,99	14,25	22,11	23,10
2	17,82	17,94	7,75	16,72	24,12	15,84
3	17,28	14,41	2,64	20,30	16,10	18,18
4	13,52	21,07	7,26	16,87	21,06	19,38
5	18,05	15,96	9,46	17,98	15,51	16,92
6	17,57	15,65	6,58	17,32	14,41	17,94
Média	17,52	16,85	6,28	17,24	18,88	18,56
DP	2,36	2,35	2,52	1,96	4,04	2,52

Tabela 6 – Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais infectados com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bac/mL) e tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de *Maytenus ilicifolia* (ES). Os animais foram sacrificados 72, horas após a infecção. Os animais do grupo controle receberam água e do grupo Amido receberam água com 1000mg/Kg de amido.

N	Controle	Amido	LM 72	LM +250	LM+500	LM+1000
1	20,91	16,10	16,02	20,16	16,74	22,38
2	17,82	17,94	11,90	14,70	19,42	10,73
3	17,28	14,41	11,25	16,83	18,62	18,15
4	13,52	21,07	16,77	18,15	18,72	15,52
5	18,05	15,96	14,24	15,08	17,85	20,91
6	17,57	15,65	9,25	17,86	17,51	18,37
Média	17,52	16,85	13,23	17,13	18,14	17,67
DP	2,36	2,35	2,92	2,04	0,96	4,15

Tabela 7 – Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de *Maytenus ilicifolia* (ES). Os animais foram sacrificados 24, horas após o último tratamento. Os animais do grupo controle receberam água e do grupo Amido receberam água com 1000mg/Kg de amido.

N	Controle	Amido	ES 250	ES 500	ES 1000
1	17,55	11,70	12,96	11,52	12,96
2	18,90	10,80	12,24	12,24	13,68
3	16,20	16,20	14,40	20,16	12,96
4	13,68	14,40	18,72	12,24	12,24
5	8,64	17,10	14,40	11,52	10,80
6	20,25	11,70	15,84	20,16	11,88
Média	15,87	13,65	14,76	14,64	12,42
DP	4,20	2,63	2,31	4,28	1,01

Tabela 8 – Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais infectados com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bac/mL) e tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de *Maytenus ilicifolia* (ES). Os animais foram sacrificados 24, horas após a infecção. Os animais do grupo controle receberam água e do grupo Amido receberam água com 1000mg/Kg de amido.

N	Controle	Amido	LM 24	LM +250	LM+500	LM+1000
1	17,55	11,70	18,90	12,96	16,56	17,10
2	18,90	10,80	12,24	20,25	15,84	16,20
3	16,20	16,20	19,08	16,20	23,40	11,88
4	13,68	14,40	21,60	12,15	21,60	22,95
5	8,64	17,10	18,90	19,80	17,10	14,40
6	20,25	11,70	29,70	14,85	12,15	17,10
Média	15,87	13,65	20,07	16,03	17,77	16,60
DP	4,20	2,63	5,65	3,40	4,08	3,69

Tabela 9 – Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais infectados com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bac/mL) e tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de *Maytenus ilicifolia* (ES). Os animais foram sacrificados 48, horas após a infecção. Os animais do grupo controle receberam água e do grupo Amido receberam água com 1000mg/Kg de amido. *P<0,001 em relação aos demais grupos. ANOVA, teste de Tukey.

N	Controle	Amido	*LM 48	LM +250	LM+500	LM+1000
1	17,55	11,70	47,52	24,30	10,80	19,44
2	18,90	10,80	79,56	11,52	14,40	18,00
3	16,20	16,20	35,10	11,25	16,20	21,60
4	13,68	14,40	86,40	37,80	25,92	14,40
5	8,64	17,10	99,00	29,16	12,96	11,52
6	20,25	11,70	56,70	24,48	21,61	20,16
Média	15,87	13,65	67,38	23,08	16,98	17,52
DP	4,20	2,63	24,74	10,30	5,70	3,82

Tabela 10 – Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais infectados com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bac/mL) e tratados com 250, 500 e 1000 mg/Kg de *Maytenus ilicifolia* (ES). Os animais foram sacrificados 72, horas após a infecção. Os animais do grupo controle receberam água e do grupo Amido receberam água com 1000mg/Kg de amido. *P<0,001 em relação aos demais grupos. ANOVA, teste de Tukey.

N	Controle	Amido	*LM 72	LM +250	LM+500	LM+1000
1	17,55	11,70	40,50	32,76	25,92	19,44
2	18,90	10,80	90,0	27,00	22,68	18,00
3	16,20	16,20	45,00	16,20	25,20	21,60
4	13,68	14,40	63,00	17,28	32,40	14,40
5	8,64	17,10	54,00	20,16	28,80	11,52
6	20,25	11,70	70,20	10,08	14,40	20,16
Média	15,87	13,65	60,45	20,58	24,90	17,52
DP	4,20	2,63	18,18	8,12	6,12	3,82

Tabela 11 Atividade de células NK de camundongos Balb/c controle (C), controle tratado com amido (C+Amido) tratados com o extrato de *Maytenus ilicifolia* (ES), 1000 mg/Kg/dia (V.O) por 5 dias consecutivos e/ou infectados com a *Listeria monocytogenes* na dose de 5×10^3 bac/mL (LM 48h/ LM 72h/LM 120) e grupos tratados com o ES e infectados (ES + LM 48h/ LM 72h/LM 120). Os grupos infectados foram sacrificados 48, 72 e 120 horas após a inoculação da bactéria. ANOVA, teste de Tukey. *P<0,001 em relação aos grupos Controle, infectados e infectados/tratados 48 e 72h. #P<0,001 em relação ao grupo infectado LM 48h. @P<0,001 em relação ao grupo infectado LM72h. **P<0,01 em relação ao grupo infectado LM 120h.

N	C	C+A	LM 48	LM 72	LM 120	*ES	#ES LM48	@ES LM72	**ES LM120
1	18.3	16.6	48.9	41.3	34.7	36.6	54.7	53.4	30.3
2	15.0	13.9	42.6	36.5	33.9	38.1	69.1	53.1	45.2
3	12.4	17.2	51.8	34.3	32.6	21.0	53.9	57.6	41.7
4	14.3	14.7	44.6	37.8	27.1	32.5	61.4	50.8	43.9
5	16.5	16.2	49.3	39.6	30.4	23.0	62.0	45.7	42.6
6	13.9	14.1	46.9	39.7	29.4	27.2	56.4	49.2	45.8
MÉDIA	15.1	15.5	47.4	38.2	31.4	29.7	59.6	51.6	41.6
DP	2.1	1.4	3.4	2.5	2.9	7.1	5.8	4.1	5.7

Tabela 12 - Níveis de IFN- γ de camundongos Balb/c controles, tratados com o extrato de *Maytenus ilicifolia* (ES), 1000 mg/Kg/dia (V.O) por 5 dias consecutivos infectados com a *Listeria monocytogenes* (LM 48h/ LM 72h) e grupos tratados com o ES e infectados (ES + LM 48h/ LM 72h). Os grupos infectados foram sacrificados 48 e 72 horas após a inoculação da bactéria. @P< 0,05 em relação ao grupo C. *P< 0,05 em relação aos grupos C e ES. #P< 0,05 em relação aos grupos C e LM48. ##P<0,05 em relação aos grupos C, ES e LM72. Teste de Kruskal-Wallis e Wilcoxon.

L. monocytogenes (5×10^3 bac/mL). (i.p.)

N	C	@ES	*LM 48	*ES + LM 48	#LM 72h	##ES + LM 72	LM 120h	ES + LM120
1	1282	1935	4511	3423	3354	5410	3022	3287
2	1208	1787	4539	4950	2543	6958	1567	2778
3	1590	2195	3935	5467	2609	4877	1769	2783
4	1095	1958	3568	4532	2567	4153	1295	2583
5	1133	1878	4352	4623	3492	4484	2213	2994
6	1114	1738	3945	4723	2645	5520	1659	1993
MÉDIA	1237	1915	4142	4620	2868	5234	1921	2736
DP	186,3	161,1	387,0	674,9	433,3	994,3	617,5	435,8

Tabela 13 – Avaliação da sobrevida de animais C57BL/6 normais e Knockout para $\text{INF}\gamma$, Tratados por 5 dias com 1000 mg/Kg de Extrato de *Maytenus ilicifolia* (ES) inoculados com dose letal de *Listeria monocytogenes* (5×10^5 bac/mL). *P<0,001 em relação ao grupo C57BL/6. Análise de Kaplan-Meier seguido de Cox-Mantel. (n=20/grupo)

Sobrevida			
Dias	C57BL/6	*Knockout +LM	*Knockout +LM + 1000 ES
2			
3		20	20
4			
5			
6			
7			
8			
45	20		

