

SÍLVIA TORRES TEIXEIRA

***AVALIAÇÃO DO EXTRATO DA *Withania somnifera* NA
RESPOSTA HEMATOPOÉTICA DE CAMUNDONGOS
INFECTADOS COM *Listeria monocytogenes****

CAMPINAS

2004

SÍLVIA TORRES TEIXEIRA

***AVALIAÇÃO DO EXTRATO DA *Withania somnifera* NA
RESPOSTA HEMATOPOÉTICA DE CAMUNDONGOS
INFECTADOS COM *Listeria monocytogenes****

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a
obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica,
área de Medicina Experimental*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ

CAMPINAS

2004

DADE	30
CHAMADA	
UNICAMP	
235a	
EX	
BO BC/	62754
C.	16-86-05
C	☐
D	☒
ÇO	11-00
A	11-03-05
CPD	

6 id 344888

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

T235a

Teixeira, Silvia Torres

Avaliação do extrato da *Withania somnifera* na resposta hematopoética de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*. / Silvia Torres Teixeira. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Mary Luci de Souza Queiroz

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Imunologia. 2. Sistema imune. 3. Hematopoes. 4. Infecção. .I. Mary Luci de Souza Queiroz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à Mãe Natureza,
que faz brotar da terra a solução para as aflições do homem.*

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Mary Luci De Souza Queiroz

Membros:

1.

2.

3.

4

5

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 14.06.2004

*Agradeço à minha família, que sempre me estimulou a provar ao
mundo e a mim mesma*

a veracidade dos valores nos quais eu acredito.

*Agradeço à estimada colega Adriana de Melo, que, com sua
competência singular, me ensinou a admirar a Imunologia.*

*Agradeço à Dra. Mary Luci L. S. Queiroz, que me ofereceu esta
oportunidade de crescimento profissional sem igual.*

*Agradeço a todos os colegas do laboratório do CFU que me
acolheram carinhosamente e dos quais levarei boas lembranças.*

*Agradeço a todos os funcionários da UNICAMP com os quais
caminhei ao longo desta trajetória.*

	<i>Pág.</i>
RESUMO	x
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO	16
Considerações gerais da planta.....	17
Modelo experimental de infecção por <i>Listeria monocytogenes</i>	20
OBJETIVOS	23
MATERIAIS E MÉTODOS	25
1 - Animais.....	26
1.1 - Tratamento.....	26
1.2 - <i>Listeria monocytogenes</i>	27
2 - Cultura clonal de precursores hematopoéticos da medula óssea (CFU-C).....	28
3 - Peso do baço dos animais submetidos aos tratamentos.....	30
4 - Obtenção do soro dos animais para detecção da atividade dos fatores estimuladores de colônias.....	30
5 - Obtenção das células mononucleadas do baço e cultura das células esplênicas.....	31
6 - Dosagem de Interferon- γ pelo Método Imunoenzimático.....	32

7 - Realização da curva de sobrevida.....	34
8 - Métodos estatísticos.....	34
RESULTADOS.....	35
1 - Efeitos do extrato da WS sobre o crescimento e diferenciação de precusores hematopoiéticos da medula óssea (CFU-GM).....	36
2 - Efeitos do extrato da WS sobre o crescimento e diferenciação de precusores hematopoiéticos do baço (CFU-GM).....	37
3 - Efeitos do extrato da WS sobre o peso do baço dos animais.....	39
4 - Efeitos do extrato da WS sobre a produção de fatores estimuladores de colônias.....	40
5 - Efeitos do extrato da WS sobre a resposta proliferativa de células esplênicas.....	43
6 - Efeitos do extrato da WS na sobrevida de animais infectados com dose letal de <i>Listeria monocytogenes</i>	44
DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
APÊNDICE.....	58

	<i>Pág.</i>
Figura 1 - Curva de capacidade estimuladora do crescimento de colônias expressa em unidades.....	31
Figura 2 - Avaliação dos efeitos da WS sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com <i>Listeria monocytogenes</i> (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. Os grupos controles receberam somente diluente da droga (n=6, ANOVA, Tukey).....	37
Figura 3 - Avaliação dos efeitos da WS sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com <i>Listeria monocytogenes</i> (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. Os grupos controles receberam somente diluente da droga (n=6, ANOVA, Tukey).....	38
Figura 4 - Avaliação dos efeitos da WS sobre o peso do baço de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com <i>Listeria monocytogenes</i> (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção (n=6, ANOVA, Tukey).....	40
Figura 5 - Avaliação dos efeitos da WS sobre a produção de fatores estimuladores de colônias de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com <i>Listeria monocytogenes</i> (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção (n=6, ANOVA, Tukey).....	42

- Figura 6 -** Avaliação dos efeitos da WS sobre a proliferação de células esplênicas de animais inoculados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 células/animal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga (n=6, ANOVA, Tukey)..... 44
- Figura 7 -** Avaliação dos efeitos da WS na sobrevivência de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (2×10^5 bactérias/animal) em relação ao grupo apenas infectado. Os grupos controles receberam somente diluente da droga (n=24, Curva de Kaplan-Maier, Long-rank)..... 45



RESUMO

A *Withania somnifera* (WS) é uma planta popularmente conhecida na medicina hindu pela sua potente capacidade de reforçar a saúde e prevenir doenças. Diversas investigações científicas têm atribuído essa qualidade ao potencial adaptógeno das suas raízes, que provaram estimular a celularidade da medula óssea e a atividade de linfócitos e macrófagos peritoneais em camundongos normais e imunocomprometidos, além de elevar os níveis de citocinas e anticorpos circulantes. Estes achados têm qualificado a WS como droga imunopotencializadora e mieloprotetora, e abrem discussão para o seu uso como agente adjuvante em terapias imunossupressoras, tais como a quimioterapia e radioterapia do câncer e a antibioticoterapia em infecções severas. O nosso trabalho consistiu em avaliar os efeitos imunomoduladores da WS em um modelo experimental de infecção, uma vez que a maioria dos estudos *in vivo* envolvendo a planta foram realizados em animais induzidos artificialmente ao estresse ou ao câncer. No nosso estudo, os camundongos inoculados peritonealmente com uma dose subletal de uma bactéria intracitoplasmática (*Listeria monocytogenes*) apresentaram uma queda na atividade hematopoética (CFU-GM) da medula óssea e na produção de células linfocitárias do baço que, por sua vez, foram aumentadas nos camundongos profilaticamente tratados com a WS. A administração oral do extrato em camundongos normais também estimulou significativamente a proliferação e diferenciação de granulócitos, macrófagos e linfócitos quando comparados com os animais não tratados. Nós também pudemos notar que a listeriose promoveu marcada migração das células fagocitárias da medula óssea em direção ao baço, mas o pré-tratamento com a WS restabeleceu essa hematopoese extramedular aos níveis normais nos camundongos infectados. Esta proteção pôde ser confirmada pela redução no peso do baço dos camundongos infectados que receberam tratamento profilático em contraste com o grupo somente infectado. A WS foi igualmente capaz de estimular a produção de fatores estimuladores de colônias no grupo imunossuprimido com a bactéria, bem como nos animais normais, quando estes valores foram comparados com o controle. Todos estes benefícios somados culminaram na resistência do hospedeiro contra a listéria, uma vez que os grupos infectados e previamente tratados por 10 dias consecutivos com as doses de 100 e 500mg/Kg apresentaram 10% de sobrevida contra 100% de mortalidade entre aqueles somente inoculados com uma dose letal da *L. monocytogenes* na nossa curva de sobrevida. Embora as ditas doses tenham aumentado a resistência dos camundongos, o maior índice de

sobrevivência foi alcançado com a administração de 250mg/Kg da *W. somnifera*, a qual protegeu 30% dos animais inoculados. Os resultados obtidos neste estudo sustentam a proposta de aplicação da WS como agente adjuvante no tratamento de pacientes submetidos à terapia antimicrobiana, com o intuito de proteger uma das manifestações fisiológicas mais importantes na luta contra as infestações por patógenos, a resposta imunológica. Os nossos achados também podem ser estendidos até a medicina preventiva, visto que o estilo de vida moderno pode afetar o delicado sistema imunológico por meio dos efeitos imunossupressores dos corticosteróides e opióides endógenos, catecolaminas e hormônios da pituitária, predispondo os indivíduos às infecções oportunistas.



ABSTRACT

Withania somnifera (WS) is a popular plant in the hindu medicine known for its strong capacity to reinforce health and prevent diseases. Many investigations have related this quality to the roots' adaptogenic potential, which proved to stimulate marrow cellularity and to activate lymphocytes and peritoneal macrophages in normal and immunocompromised mice, as well as to elevate cytokine and circulating antibody levels. These findings regard WS as an immunopotentializing and myeloprotecting drug, and open discussion for its use as an adjuvant agent in immunosuppressing therapies, such as chemotherapy and radiotherapy in câncer and antibiotictherapy in severe infections. Our work consisted of evaluating WS's immunomodulatory effects in an experimental infection model, once most of the studies involving this plant were carried out in animals artificially induced to stress or cancer. In our study, the peritoneal injection of a sublethal dose of an intracitoplasmatic bacteria (*Listeria monocytogenes*) reduced bone marrow hematopoietic activity (CFU-GM) and spleen lymphocyte production in mice, which were increased when the animals were prophylatically treated with WS. The oral administration of the extract to normal mice significantly stimulated granulocyte, macrophage and lymphocyte production as well when the results were compared to the non-treated animals. We could also note that listeriosis promoted phagocytic cellular migration from marrow towards spleen, but the pretreatment with WS re-established this extramedular hematopoiesis back to normal levels in the infected group. This protection could be confirmed through spleen weight reduction in the treated infected mice in contrast to the non-treated infected ones. WS was likely able to augment colony stimulating factor levels in the bacteria-immunosuppressed group, as well as in the non-infected animals, when the values were compared with the control. The sum of all of these benefits culminated in the host's resistance to listeria, since the infected groups previously treated with 100 and 500mg/Kg for 10 consecutive days had a 10% survival against 100% mortality of the animals infected with a lethal dose of *L. monocytogenes* in our life-span curve. Although the cited doses had increased mice resistance, the major index survival was reached with 250mg/Kg of the extract, which protected 30% of the inoculated animals. These results sustain our proposal for WS's use as an adjuvant agent in the treatment of patients undergoing antimicrobial therapy, aiming to protect one of the most important physiologic manifestations in the fight against pathogen infection, the immune response. Our findings also could be extended to the preventive



INTRODUÇÃO

CONSIDERAÇÕES GERAIS DA PLANTA

A *Withania somnifera* (WS) é uma planta distribuída desde a região Leste do Mediterrâneo até o sul da Ásia, e extensamente utilizada na medicina Ayurvédica como remédio caseiro em várias condições patológicas. O extrato das suas raízes é oficialmente mencionado na Farmacopéia Indiana, cujos principais constituintes são alcalóides, terpenóides com esqueleto tetracíclico similar ao cortisol, e lactonas esteroidais, incluindo withanolídeos (I, II, III, IV, V, VI e VII) e withaferina A. Outras substâncias e suas respectivas atividades farmacológicas estão sendo descobertas em pesquisas recentes. Além das lactonas withanolídicas, a fruta da WS também contém cumarinas, escopoletina, aesculetina, beta-amirina e físteróis (estigmasterol e sitosterol) (RAHMAN et al, 2003; ILAYPERUMA et al, 2002; IUVONE et al, 2002; ABOU-DOUH, 2001; DAVIS et al, 1998).

Bastante conhecida como Ashwagandha ou Ginseng Indiano, a WS é um tônico geral popularmente usado para aumentar a energia orgânica, melhorar as condições gerais de saúde e longevidade, e prevenir doenças na terceira idade. Muitos estudos farmacológicos têm sido conduzidos para investigar as suas propriedades e validar a sua aplicação como agente medicinal de múltiplas particularidades. Os experimentos têm demonstrado que a WS possui propriedade antiinflamatória, antioxidante e imunoestimulante. É um potente agente antitumoral, anti-ulcerogênico, antihepatotóxico, antiartrítico e cardioprotetor, além de ser ativo contra picada de escorpião. Parece que a planta em questão também exerce influência positiva sobre o sistema endócrino, urogenital e nervoso central (DEEPA et al, 2002; IUVONE et al, 2002; LEEMOL et al, 2000).

Alguns autores relacionam o poder revitalizante dessa planta com o efeito imunoestimulante das suas raízes, mas os mecanismos que explicam essa propriedade são escassamente compreendidos. As raízes da WS são classificadas como “rasayanas”, um grupo de drogas isoladas de fitoterápicos da medicina hindu com propriedades marcadamente semelhantes às aquelas observadas nas plantas adaptogênicas, tal como o *Panax ginseng*. Estas plantas incrementam a resistência não específica do corpo contra diversos agentes estressores e ajudam a promover os estados físico e mental do indivíduo. De fato, a atividade adaptogênica da WS foi comparada àquela do *Panax ginseng* num

modelo de estresse crônico envolvendo ratos Wistar. Ambas atenuaram os sintomas provocados pelo estresse, tais como imunossupressão, hiperglicemia, intolerância à glicose, níveis plasmáticos aumentados de corticosterona, úlceras gástricas, disfunção sexual masculina, déficits cognitivos e depressão mental. Os resultados observados para a WS neste estudo foram produzidos com doses menores (25 e 50mg/Kg) do que aquela usada para o *P. ginseng* (100mg/Kg) (BHATTACHARYA et al, 2003; IUVONE et al, 2002; LEEMOL et al, 2000).

O poder imunoestimulador da WS é tal que um extrato comercial da sua raiz foi utilizado como controle positivo numa avaliação da atividade anti-estresse da *Trichopus zeylanicus* pela equipe de SINGH (2001) (SINGH et al, 2001).

Diversas investigações envolvendo a WS têm revelado um perfil de atividade consoante com qualidades imunomoduladoras. Descobriu-se que a WS é capaz de aumentar as células brancas totais da medula óssea, o que indica significativamente estimulação do sistema hematopoético. Seus glicowithanolídeos e uma mistura de sitoindosídeos IX e X também produzem a mobilização e ativação estatisticamente significativa de macrófagos peritoneais e da fagocitose, assim como aumentam a atividade das enzimas lisossomais. O extrato da raiz da WS foi igualmente testado quanto ao seu efeito imunomodulador em três modelos murinos de mielossupressão: ciclofosfamida, azatioprina e prednisolona (ZIAUDDIN et al, 1996). Neste estudo, foram observados incrementos significativos na concentração de hemoglobina, na contagem de células brancas e vermelhas, na contagem de plaquetas e no peso corporal dos camundongos mielocomprometidos e tratados com a WS quando comparados com o grupo controle não tratado (DAVIS et al, 1999).

Parece que a *W. somnifera* exerce efeito ao nível transcripcional de genes por meio da ativação do fator- κ B nuclear (NF- κ B). Em sinergia com outros fatores de ativação transcripcional, NF- κ B exerce papel central na coordenação da expressão gênica do óxido nítrico sintase induzível (iNOS), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e diversas interleucinas em macrófagos ativados (IUVONE et al, 2003). De fato, IUVONE et al (2002) puderam confirmar que o extrato metanólico das raízes da WS estimula a expressão do iNOS em macrófagos murinos (IUVONE et al, 2003). Outro estudo também mostra que

o tratamento de camundongos normais com a WS eleva os níveis de anticorpos circulantes, em especial interferon-gama (INF- γ), interleucina-2 (IL-2) e fator estimulador de granulócitos e macrófagos [unidades formadoras de colônias (CFU-GM)], e reverte os níveis reduzidos destas substâncias em animais previamente tratados com ciclofosfamida (DAVIS et al, 1999). O extrato em questão ainda aumenta a proliferação e diferenciação de células-tronco e inibe os níveis de produção do TNF- α (IUVONE et al, 2003). Estes resultados conferem qualidade imunopotencializadora e mieloprotetora à WS através da estimulação da produção de citocinas (MISHRA et al, 2000).

O extrato da WS ainda foi testado em um modelo experimental de aspergilose, no qual prolongou o tempo de sobrevivência dos camundongos infectados quando oralmente administrada por 7 dias consecutivos no estudo de Dhuley (1998). Essa capacidade protetora foi relacionada com o aumento da fagocitose e com o extermínio intracelular exercido pelos macrófagos peritoneais sobre os microrganismos (DHULEY, 1998). O número de leucócitos periféricos não foi modificado, sugerindo uma possível mobilização celular de outros compartimentos (IUVONE et al, 2002; DHULEY, 1998).

A nossa equipe também avaliou os efeitos da WS em camundongos normais e inoculados com tumor ascítico de Ehrlich (TAE), cujos resultados recentemente produzidos e publicados corroboram com aqueles supracitados (MELO et al, 2004). A administração prévia de 20, 50 e 100mg/Kg da planta por 10 dias consecutivos em camundongos mielossuprimidos com TAE aumentou o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoéticos da medula óssea murina. Da mesma forma, a WS restabeleceu a hematopoese extramedular produzida pelo tumor nos mesmos camundongos e reverteu, concomitantemente, o peso do baço de volta aos valores normais. O TAE ainda produziu uma redução drástica na proliferação de células linfocitárias e *natural killer* (NK) do grupo não tratado, ao passo que a WS elevou esses níveis acima do normal numa relação dose-dependente nos animais inoculados. MELO (2004) comprovou que a planta em questão impede a polarização da resposta imunológica Th1-Th2 típica de organismos inoculados com TAE por meio de um aumento significativo dos níveis de IL-1, IL-6, IL-10 e INF- γ . Por fim, a equipe do nosso laboratório encontrou que a administração profilática dos camundongos induzidos ao câncer com 20, 50 e 100mg/Kg do extrato estendeu a

sobrevida do grupo tratado em 30, 35 e 40 dias, respectivamente, em contraste com os animais somente inoculados, os quais morreram até o 20º dia de observação (MELO et al, 2004).

Estudos de toxicidade aguda também revelaram boa margem de segurança com elevado índice terapêutico para a WS (SINGH et al, 2003).

Os benefícios exercidos pela WS sobre o sistema imunológico estão claros, assim como está evidente seu potencial de proteção do organismo diante de agentes infecciosos. Visto que fitocompostos adaptógenos estão encontrando seu papel como agentes adjuvantes ao lado das drogas classicamente prescritas pelos médicos, nós nos propusemos a avaliar a atividade imunomoduladora da planta em camundongos infectados pela bactéria *Listeria monocytogenes*, uma vez que os estudos envolvendo seu valor mieloestimulante em modelos de infecção são escassos. A maioria dos estudos sustenta o poder imunomodulador da WS em modelos de estresse e de câncer.

Aplicando esse modelo experimental, nós também esperamos contribuir para a maior compreensão do mecanismo pelo qual a WS aumenta e/ou modula a resposta imunológica na presença de microrganismos patogênicos.

MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO POR *Listeria monocytogenes*

O modelo experimental de infecção com a *Listeria monocytogenes* possibilita o estudo da resistência do hospedeiro contra bactérias e facilita a avaliação dos efeitos produzidos pelo agente em estudo. A infecção por *Listeria monocytogenes* em camundongos tem sido extensivamente utilizada como modelo de interação entre parasita e hospedeiro para o estudo da resposta imunológica (MACKANESS, 1962; HAHN et al, 1981).

A *Listeria monocytogenes* é um bacilo gram-positivo pertencente a um grupo de microrganismos de ação intracitoplasmática. O processo de defesa envolvido na resistência contra essa bactéria é caracterizado inicialmente pela imunidade inata do hospedeiro, seguida por uma resposta imune específica como tentativa de garantir a total erradicação do patógeno.

Ao entrar em contato com o organismo, a listéria deixa rapidamente a corrente sanguínea, alojando-se em células fagocitárias, preferencialmente células hepáticas e macrófagos, iniciando o processo infeccioso, que, além de fagócitos, envolve as células T e citocinas também (KAUFMANN, 1993). Após ser fagocitada, a *L. monocytogenes* produz uma toxina denominada listeriolisina O (LLO) que lisa o fagolisossomo e permite sua saída para o citoplasma. Neste local, a bactéria prolifera-se, migra para as células adjacentes e inicia, assim, a sua disseminação (NISHIBORI et al., 1996; SOUTHWICK e PURICH, 1996; DRAMSI et al., 1998). Assim sendo, a migração de células fagocitárias como macrófagos, granulócitos e células natural killer (NK) para o local de replicação da bactéria é um componente essencial para a sobrevivência do animal durante esta fase inicial da infecção (NORTH, 1970; BENNET e BAKER, 1977; LEPAY et al., 1985; ROSEN et al., 1989).

Estas células fagocitárias são originárias das células primitivas pluripotenciais da medula óssea, denominadas células formadoras de colônias (CFCs), as quais podem dar origem a qualquer célula sanguínea dependendo do estímulo recebido (METCALF, 1984; QUEIROZ, 1988). O crescimento e a diferenciação dessas células são modulados pelos fatores estimuladores de colônias (CSFs) (STEVENSON et al., 1981; METCALF, 1989; HUME et al., 1988). Elevados níveis destes fatores aparecem no soro e tecidos dos animais infectados no período inicial da infecção (WING, 1987; YOUNG e CHEERS, 1986).

Os macrófagos são as principais células atuantes nessa fase e ao serem infectados, liberam algumas citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-12 e TNF- α , que estimulam as células NK a secretarem IFN- γ (ROGERS et al., 1994; LIU e CHEERS, 1993; MIELKE et al., 1993; TRIPP et al., 1993; KOPF et al., 1994; DALRYMPLE et al., 1995; HUNTER et al., 1995; LIU e KURLANDER, 1995; SKEEN e ZIEGLER, 1995; UNANUE, 1997). Altas concentrações de IFN- γ promovem a ativação dos macrófagos, conduzindo a uma maior expressão das moléculas da classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC classe II). Este complexo apresenta a bactéria à resposta imune adquirida do organismo, que atuará de maneira específica na erradicação da infecção, através da ação de células T CD4⁺CD8⁺ α/β

e CD4⁺CD8⁻ γ/δ (MOMBAERTS et al., 1993). Diante da importância das células fagocíticas na fase inicial da infecção pela listéria, a avaliação do crescimento e diferenciação das células de defesa citadas por meio da técnica de cultura clonal de precursores hematopoiéticos da medula óssea para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) é um indicador fiel do grau de comprometimento do organismo dos animais infectados pelo microrganismo em questão.



OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da WS em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* sobre os seguintes parâmetros:

- Os efeitos da WS sobre o crescimento e a diferenciação de granulócitos e macrófagos da medula óssea (CFU-GM) em animais normais e infectados que receberam tratamento com diferentes doses da planta em estudo.
- O peso do baço (presença de esplenomegalia).
- A presença de fatores estimuladores de colônias (CSF) de células precursoras hematopoéticas no soro de animais tratados com a WS.
- Avaliar o efeito do tratamento com a WS sobre a capacidade de proliferação de linfócitos T em animais normais e infectados.
- A resistência dos animais tratados com diferentes doses do extrato da WS e infectados com uma dose letal de *Listeria monocytogenes*.



***MATERIAIS E
MÉTODOS***

1 - ANIMAIS

Para a realização deste estudo foram utilizados camundongos machos BALB/c com idade de 8 a 10 semanas, os quais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Durante a fase experimental, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura constante de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo escuro de 12 horas. O regime alimentar foi o tipo clássico com ração comercial padrão. O tratamento foi realizado pela via oral (gavagem).

Os experimentos foram realizados em grupos de animais submetidos aos seguintes tratamentos:

- a) animais controle (sem tratamento);
- b) animais inoculados com a *Listeria monocytogenes*
- c) animais não inoculados com a bactéria e tratados com o extrato da WS;
- d) animais inoculados com a bactéria e tratados com o extrato da WS.

1.1 - Tratamento

O extrato da WS foi gentilmente cedida pela Galena Indústria Farmacêutica Ltda (Brasil). O produto consiste de um pó marrom claro a marrom escuro com odor e sabor característicos.

Para o tratamento dos animais, o extrato da WS foi ressuspensão em água destilada e preparado nas doses de 100, 250, 500 e 900mg/Kg. Os animais controle não infectados receberam todas as doses pela via oral (gavagem) durante 10 dias consecutivos. Já os grupos infectados que receberam a planta foram tratados profilaticamente por 10 dias consecutivos. A bactéria foi inoculada 2 horas depois da última administração.

1.2 - *Listeria monocytogenes*

A bactéria utilizada para infectar os animais consiste de um cocobacilo gram-positivo, anaeróbio facultativo, móvel por flagelo peritríquios a temperatura ambiente, facilmente cultivável em ágar-sangue. Esta cepa foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica – Hospital de Clínicas desta universidade. Após a aquisição, a listéria foi submetida a vários testes bioquímicos que confirmaram a sua identidade. Os testes realizados demonstraram os seguintes resultados:

- Oxidase- positivo
- Catalase- positivo
- Carboidratos- ação fermentativa
- Xilose- negativo
- Manitol- negativo
- Bile esculina- positivo
- Beta hemólise- positivo
- CAMP-Test: *Staphylococcus aureus*- positivo

Rhodococcus equi- negativo

Para desencadear a infecção nos animais, foi necessário determinar o número ideal de microrganismos a ser injetado. A dose ideal não provocou a morte rápida dos animais para que fosse possível a realização dos experimentos após a infecção. A bactéria foi mantida em meio de cultura BHI (Brain-Heart Infusion) e incubada por 24 a 48 horas à temperatura de 37°C. As colônias obtidas nas culturas frescas de ágar-sangue foram diluídas em solução salina 0,9% e as concentrações foram determinadas por espectrofotometria através da Escala de McFarland (Vitek Colorimeter).

Para a manutenção da patogenicidade da bactéria, a mesma foi periodicamente repassada sucessivamente por 25 vezes em camundongos, conforme descrito a seguir. As bactérias diluídas em solução salina a 0,9% foram inoculadas intraperitonealmente nos camundongos. Nas quarenta e oito horas seguintes, os baços foram isolados em ambiente estéril, macerados, mantidos em BHI por 24 a 48 horas e, logo depois, a bactéria foi isolada em placas de ágar-sangue. Após o seu isolamento, diluições da mesma foram realizadas até atingir a concentração apropriada para o uso.

Para o estudo dos parâmetros imunológicos e hematológicos foi utilizada a dose subletal de 5×10^3 bactérias/animal. Para a avaliação da sobrevivência dos animais foi necessário utilizar uma concentração letal de 2×10^5 bactérias/animal. As bactérias foram inoculadas intraperitonealmente em ambas as situações. A resposta hematopoiética foi avaliada 24, 48 e 72 horas após a infecção.

2 - CULTURA CLONAL DE PRECURSORES HEMATOPOIÉTICOS DA MEDULA ÓSSEA(CFU - C)

Após sacrificar o animal por deslocamento cervical e realizar assepsia da pele com álcool 70%, o fêmur foi exposto. A cartilagem foi removida sobre o orifício da extremidade distal e o osso foi cortado na junção superior. A medula óssea foi transferida com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co, USA).

O número de células na suspensão foi determinado em câmara hematócitométrica após diluição 1:10 em eosina 1% e a concentração ajustada para 1×10^5 células/mL. Logo depois, o meio mais ágar foi preparado. Este meio consistiu de:

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

2.1 – Produção do SCM

Baços de camundongos BALB/c foram removidos sob condições assépticas e passados delicadamente através de peneira de aço inoxidável estéril. Uma suspensão com 2×10^6 células/mL em meio RPMI-1640 (Sigma) contendo 10% de soro humano inativado (30 minutos a 56°C) ou 19% de soro fetal bovino foi preparado. Ainda adicionou-se ao meio 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol (concentração final) e 0,05 mL de “pokeweed mitogen” por cada 1 mL de meio. Incubou-se essa mistura final por 7 dias a 37°C em estufa úmida contendo CO₂ a 5%. Centrifugou-se o sobrenadante e filtrou-se em filtros milipore. A atividade funcional do CSF foi determinada através dos estímulos produzidos sobre o crescimento clonal de células progenitoras hematopoiéticas em meio semi-sólido. A titulação deste lote de SCM demonstrou que uma diluição de até 1:4 fornece resultados que estão dentro dos níveis de resposta supramáxima. Os resultados em duplicata da titulação realizada em cultura de 7 dias estão apresentados na Tabela 1. O estudo morfológico das colônias após coloração indicou o predomínio de colônias de granulócitos e macrófagos.

Tabela 1 - Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) em presença de células de medula óssea de camundongos BALB/c*

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

*Número de células da medula óssea utilizado= 1×10^5 células/mL.

^a Resultados obtidos em duplicata por diluição.

Ao meio acima descrito foi adicionado o volume apropriado de células da medula (1×10^5 células/mL), de cuja mistura 2mL foram distribuídos em cada placa de Petri (35mm) contendo 0,1mL do estímulo apropriado (SCM). Após geleificar, as placas foram incubadas por 7 dias a 37°C em presença de CO₂ a 5%. Após este período, o número de colônias foi contado em microscópio de dissecação com aumento de 40x.

3 - PESO DO BAÇO DOS ANIMAIS SUBMETIDOS AOS TRATAMENTOS

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, foi realizada uma incisão na região lateral esquerda da cavidade peritoneal para a remoção do baço. O órgão foi lavado com solução salina e transferido para um tubo contendo 9ml de meio RPMI 1640. Em seguida, o órgão foi pesado e divulgado.

4 - OBTENÇÃO DO SORO DOS ANIMAIS PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE DOS FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS

O sangue dos animais dos grupos experimentais foi obtido por punção cardíaca. Realizou-se “pools” dos grupos de animais, que foram centrifugados para obtenção dos respectivos soros. A presença de fatores estimuladores de colônias no soro dos animais em questão foi determinada pela sua capacidade promotora do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de animais normais.

A atividade estimuladora de colônias foi expressa em unidades por mililitro (Unidades/mL) e determinada a partir da curva de titulação do meio condicionado de células esplênicas. De acordo com Van Den Engh e Bol (1975), a menor concentração capaz de estimular o crescimento de clones deve ser considerada como 1 unidade de CSF (vide figura 1 na próxima página).

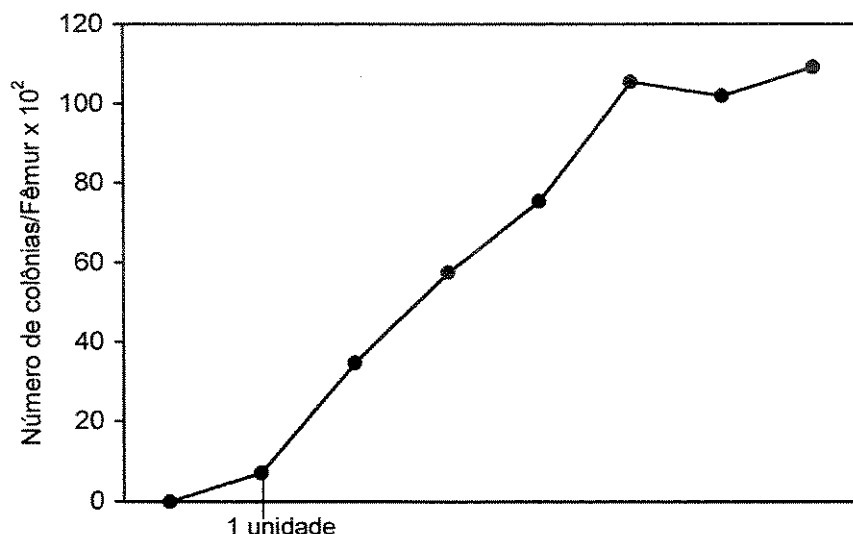


Figura 1 - Curva de capacidade estimuladora do crescimento de colônias expressa em unidades.

5 - OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO BAÇO E CULTURA DAS CÉLULAS ESPLÊNICAS

A capacidade proliferativa de linfócitos é uma prova que avalia as propriedades funcionais dos linfócitos de acordo com a sua resposta a mitógenos *in vitro*, como a concanavalina A (Con A; Sigma Chemical Co, USA). Nesta prova, a competência funcional dos linfócitos foi avaliada, mas não o seu número, o que permite determinar, desta forma, a resposta imunológica através do método de redução do tetrazolium. Para tanto, os baços dos camundongos foram coletados assepticamente e homogeneizados com o auxílio de um macerador, utilizando-se meio RPMI-1640 (Cultilab). As células mononucleares foram obtidas adicionando-se tampão de lise (NH_4Cl 0,85% - Tris 15 mM, pH7,2) ao botão celular previamente concentrado. Após 3 lavagens com meio RPMI, as células foram ajustadas a uma concentração de 1×10^6 células/mL em meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co, USA) suplementado com 5% de soro bovino fetal, penicilina (100 μg), hepes 25 mM, 2-mercaptoetanol (1:100) e glutamina (216 mg/mL).

Duzentos microlitros da suspensão celular (item 3.8.1) enriquecida com 5% de SBF e 10 µl de solução de Con A (concentração final de 2,5 µg/mL) foram adicionados aos orifícios de uma placa de microcultura com 96 orifícios. Logo depois, as células de cada amostra foram adicionadas. O ensaio foi realizado em triplicata para cada animal. As placas foram mantidas 72 horas em estufa úmida a 37°C com CO₂ a 5%. Após este período, a solução de MTT (Kit Boehringer Mannheim) foi adicionada em cada well e a placa de cultura foi incubada por mais 4 horas. Ao final deste período, adicionou-se a solução solubilizante do MTT e efetuou-se a leitura em ELISA a 570 nm.

6 - DOSAGEM DE Interferon-γ PELO MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO

Para a dosagem do INF-γ foi utilizado o sobrenadante de culturas de células T esplênicas. As suspensões celulares utilizadas nestas culturas foram preparadas conforme descrito no item 5.

Nos orifícios da placa de cultura com 24 wells contendo 800 µL de meio RPMI-1640 enriquecido com 5% de soro bovino fetal, penicilina (100 µg), hepes 25 mM, 2-mercaptoetanol (1:100) e glutamina (216 mg/mL) foram adicionados 200 µL da suspensão celular (1x10⁶ células/mL) e 50 µL de Con A (concentração final: 2,5 µg/mL). A placa foi incubada em estufa úmida à temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Após 24 e 48 horas, os sobrenadantes correspondentes a cada amostra foram coletados e armazenados a -20°C para a dosagem da citocina em questão. Com o objetivo de verificar a possível ocorrência de estimulação espontânea, foram incubadas células de cada amostra na ausência de estímulo (Con A).

A dosagem do INF-γ foi realizada pelo método imunoenzimático-ELISA de captura (Pharmingen, USA), utilizando-se os seguintes Kits (BD OptEIA™ ELISA Set):

- BD OptEIA™ ELISA Set Mouse IL-1α (Catálogo número 550347)
- BD OptEIA™ ELISA Set Mouse IL-6 (Catálogo número 555240)

- BD OptEIA™ ELISA Set Mouse TNF- α (Mono/Mono) (Catálogo número 555268)
- BD OptEIA™ ELISA Set Mouse IFN- γ (Catálogo número 555138)
- BD OptEIA™ ELISA Set Mouse IL-10 (Catálogo número 555252)

Os sobrenadantes obtidos nas culturas foram colocados em microplacas de 96 orifícios (NUNC- Maxisorp, DM), previamente sensibilizadas por 100 μ L dos anticorpos de captura diluídos em tampão PBS (pH 7,0) dos respectivos kits e incubados “overnight” à temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/Tween), e as reações inespecíficas bloqueadas com 200 μ L de PBS contendo 10% de SBF (PBS/SBF) por 1 hora à temperatura ambiente. Os sobrenadantes das outras culturas das células esplênicas e os padrões (anticorpos recombinantes diluídos em PBS/SBF) foram adicionados em duplicata e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS/Tween e os anticorpos monoclonais anti-citocina de camundongos marcados com biotina diluídos em PBS/SBF foram adicionados. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS/Tween. Adicionou-se 100 μ L de uma solução de avidina-peroxidase (Sigma Chemical Co,USA) diluída em PBS/SBF (1:400 de uma solução 1 mg/mL) em seguida. Após 30 minutos de incubação, adicionou-se 100 μ L do substrato (10 μ L H₂O₂ 30% e 5 mg de dihidrocloreto de o-fenilenodiamina (Sigma) em 10 mL de tampão citrato (pH 4,35). Dihidrocloreto de o-fenilenodiamina é um cromógeno apropriado para o uso em protocolos de ELISA que utilizam conjugados com peroxidases. Assim, a enzima avidina-peroxidase atua sobre este substrato havendo formação de um produto final solúvel e de cor castanha.

A formação do produto final foi lida espectrofotometricamente a 492nm em um leitor de ELISA (Labsystem). Visto que a relação entre os valores de absorbância a 492nm e as concentrações padrões da citocina presente na solução descreve uma função linear, pode-se calcular a concentração de INF- γ presente na amostra. Os resultados foram expressos em pg/mL.

7 - REALIZAÇÃO DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

Com o intuito de observar uma possível proteção dos animais tratados com o WS, realizou-se uma curva de sobrevivência. Foram considerados quatro grupos experimentais: animais controles e portadores da *Listeria monocytogenes*, animais tratados com WS nas doses de 100, 250 e 500mg/Kg por 10 dias consecutivos, sendo inoculados com 2×10^5 células/animal da bactéria duas horas após o último tratamento com a planta.

8 - MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Para a avaliação das variáveis CFU-GM utilizou-se análise de variância. Quando detectado diferenças estatísticas entre os grupos utilizou-se o teste de contraste de Tukey. As variáveis com IFN- γ foram verificadas utilizando-se ANOVA de Kruskal-Wallis e teste a *posteriori* de Wilcoxon. Para a curva de sobrevivência dos grupos portadores da listéria, bem como aqueles inoculados e tratados, utilizou-se o teste Log-rank. Para todos os grupos, os resultados somente foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.



RESULTADOS

1 - EFEITOS DO EXTRATO DA WS SOBRE O CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO DE PRECURSORES HEMATOPOIÉTICOS DA MEDULA ÓSSEA (CFU-GM)

Conforme era esperado, os animais portadores da *Listeria monocytogenes* que não foram tratados com a WS apresentaram uma redução significativa no número de precursores hematopoéticos da medula óssea (CFU-GM) quando comparados com o grupo controle. Este efeito foi induzido pela inoculação de uma dose subletal da bactéria nos intervalos de 48 e 72 horas seguintes à infecção (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 2 e tabelas 3 e 4 do apêndice). Já os animais normais que foram somente tratados com 250mg/Kg da planta apresentaram aumento significativo no CFU-GM quando comparados com o controle (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 2 e tabelas 2, 3 e 4 do apêndice).

O tratamento profilático dos camundongos com todas as doses da WS por 10 dias consecutivos produziu um aumento significativo no número de colônias nos intervalos de 48 e 72 horas após a infecção, quando cada um destes grupos foi comparado com seus respectivos grupos infectados e não tratados (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 2 e tabela 3 do apêndice). As doses de 250, 500 e 900mg/Kg da WS administradas ao grupo sacrificado nas 72 horas seguintes à inoculação ainda promoveram um aumento significativo no número de CFU-GM em relação ao grupo controle (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 2 e tabela 4 do apêndice).

Os camundongos tratados, infectados e sacrificados após 24 horas não apresentaram qualquer aumento estatisticamente significativo do CFU-GM com as doses propostas, a saber 100, 250, 500 e 900mg/Kg (figura 2 e tabela 2 do apêndice).

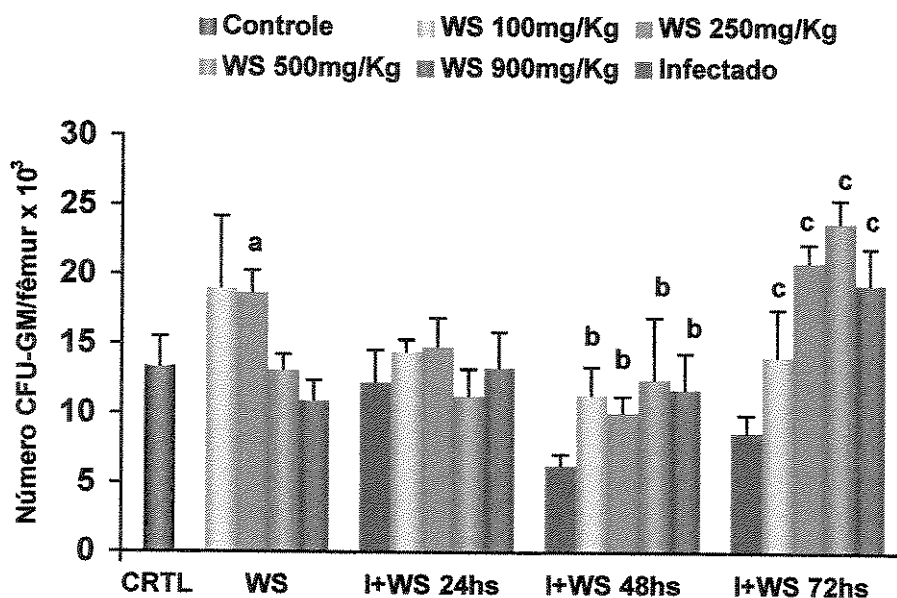


Figura 2 - Avaliação dos efeitos da WS sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. Os grupos controles receberam somente diluente da droga (n=6, ANOVA, Tukey).

a	significativo em relação ao CTRL	P<0,01
b	significativo em relação ao infectado 48hs	P<0,01
c	significativo em relação ao infectado 72hs e ao CTRL	P<0,001

2 - EFEITOS DO EXTRATO DA WS SOBRE O CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO DE PRECURSORES HEMATOPOIÉTICOS DO BAÇO (CFU-GM)

As análises dos resultados relativos à hematopoese extramedular revelaram que o grupo inoculado com *Listeria monocytogenes* produziu um aumento esperado no número de colônias na cultura clonal de células esplênicas em relação aos animais normais nos períodos de 48 e 72 horas após a inoculação (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 3 e tabelas 6 e 7 do apêndice). Já os grupos que foram somente tratados com o

extrato da WS não tiveram alterações significativas no número de precursores hematopoéticos do baço em relação ao grupo controle (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 3 e tabelas 5, 6 e 7 do apêndice).

Quando os animais foram tratados previamente à infecção, os grupos sacrificados 48 e 72 horas após a injeção da bactéria tiveram os números de CFU-GM do baço restaurados com todas as doses do extrato (100, 250, 500 e 900mg/Kg) em relação aos seus respectivos grupos infectados (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 3 e tabelas 6 e 7 do apêndice).

Os animais que foram tratados profilaticamente com a WS e sacrificados 24 horas depois da administração da bactéria não exibiram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo infectado (figura 3 e tabela 5).

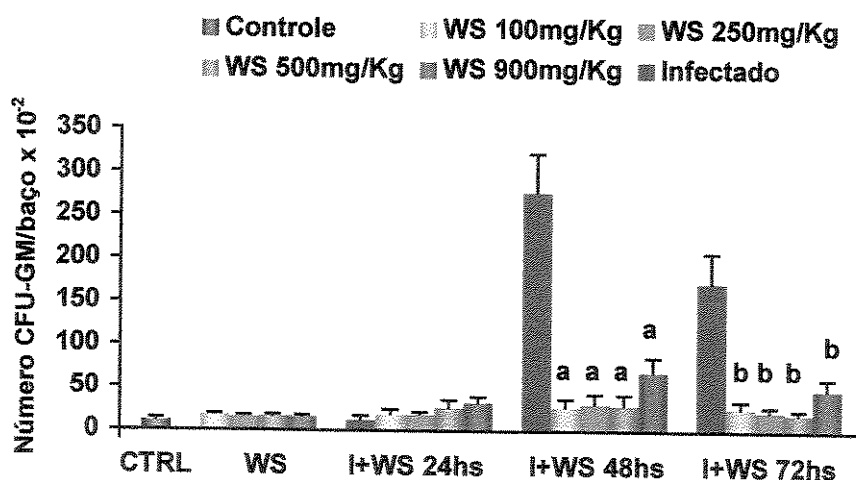


Figura 3 - Avaliação dos efeitos da WS sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. Os grupos controles receberam somente diluente da droga (n=6, ANOVA, Tukey).

a significativo em relação ao infectado 48 hs $P < 0,001$

b significativo em relação ao infectado 72 hs $P < 0,001$

3 - EFEITOS DO EXTRATO DA WS SOBRE O PESO DO BAÇO DOS ANIMAIS

Os resultados obtidos nesta avaliação corroboram com aqueles apresentados no estudo da hematopoese extramedular. Os grupos somente inoculados com a listéria apresentaram um aumento drástico no peso do baço quando comparados com o grupo controle (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 4 e tabela 8, 9 e 10 do apêndice). Já os grupos apenas tratados com o extrato da WS não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 4 e tabela 8, 9 e 10 do apêndice).

Quando os animais foram previamente tratados com as diferentes doses da WS, inoculados e sacrificados nas 24 e 48 horas seguintes, os pesos dos órgãos em questão foram reduzidos para valores próximos aos normais (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 4 e tabela 8 e 9 do apêndice). Contudo, embora o peso do baço dos animais tratados e inoculados após 72 horas tenha diminuído significativamente em relação ao grupo infectado, os valores apresentados para este grupo foram estatisticamente maiores quando comparados com o grupo controle (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 4 e tabela 10 do apêndice).

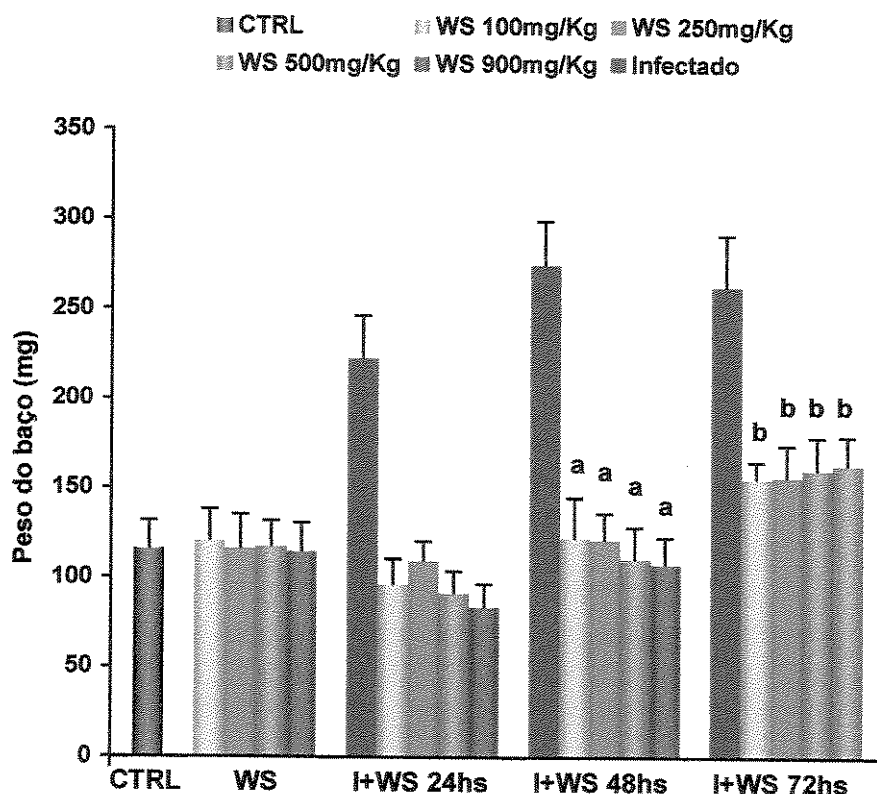


Figura 4 - Avaliação dos efeitos da WS sobre o peso do baço de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção (n=6, ANOVA, Tukey).

a	significativo em relação ao infectado 24hs	P<0,001
b	significativo em relação ao infectado 48hs	P<0,001

4 - EFEITOS DO EXTRATO DA WS SOBRE A PRODUÇÃO DE FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS

Conforme observado na figura 5 e tabela 8 do apêndice, o soro dos animais normais apresentou apenas 1 unidade/mL de fator estimulador de colônias (CSFs). Contudo, quando os animais foram somente tratados com 100, 250, 500 e 900mg/Kg do extrato da WS, estes valores subiram para 3,8, 3,8, 3,7 e 3,6, respectivamente. Esta diferença foi significativa em relação ao controle (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 5 e tabela 11, 12 e 13 do apêndice).

Os grupos infectados e não tratados apresentaram um aumento esperado na produção dos fatores estimuladores de colônias nos três tempos em relação ao grupo controle. O pico máximo da estimulação foi observado nas 48 horas seguintes à inoculação da bactéria (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 5 e tabela 12 do apêndice).

O tratamento prévio dos animais inoculados por 10 dias consecutivos com o extrato da WS aumentou ainda mais a produção dos CSFs em relação ao grupo controle nas 24, 48 e 72 horas seguintes à injeção da bactéria (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 5 e tabela 11, 12 e 13 do apêndice).

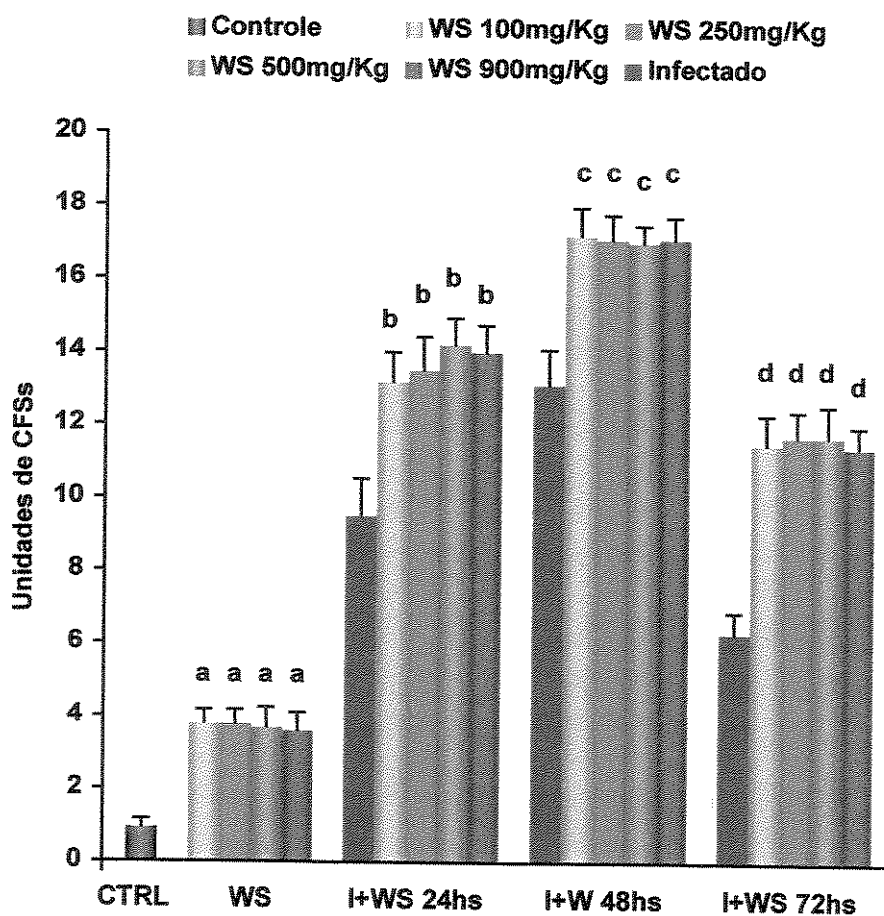


Figura 5 - Avaliação dos efeitos da WS sobre a produção de fatores estimuladores de colônias de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção (n=6, ANOVA, Tukey).

a	significativo em relação ao CTRL	P<0,001
b	significativo em relação ao infectado 24hs	P<0,001
c	significativo em relação ao infectado 48hs	P<0,001
d	significativo em relação ao infectado 72hs	P<0,001

5 - EFEITOS DO EXTRATO DA WS SOBRE A RESPOSTA PROLIFERATIVA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS

Houve uma inibição esperada na resposta proliferativa das células esplênicas à concanavalina A (5mcg/mL) nos animais inoculados e não tratados com a listéria em todos os tempos avaliados (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 6 e tabela 14, 15 e 16).

Somente o grupo não infectado que recebeu 250mg/Kg do extrato apresentou um aumento significativo na proliferação das células linfocitárias em relação ao controle (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 6 e tabela 14, 15 e 16).

Todas as doses da WS estimularam a transformação blástica de linfócitos do baço nos intervalos de 24, 48 e 72 horas seguintes à inoculação da bactéria, quando comparados com seus respectivos grupos infectados (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 6 e tabela 14, 15 e 16).

Quando os animais infectados e tratados com a planta foram comparados com o controle, todos os grupos tratados e sacrificados nas 24 e 48 horas seguintes à inoculação apresentaram aumento estatisticamente significativo da proliferação com todas as doses avaliadas (100, 250, 500mg/Kg) (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 6 e tabela 14 e 15 do apêndice). No grupo tratado e sacrificado 72 horas depois da injeção da listéria, somente a dose de 250mg/Kg do extrato promoveu aumento significativo na proliferação celular em relação ao grupo controle (n=6, ANOVA, Tukey) (figura 6 e tabela 16).

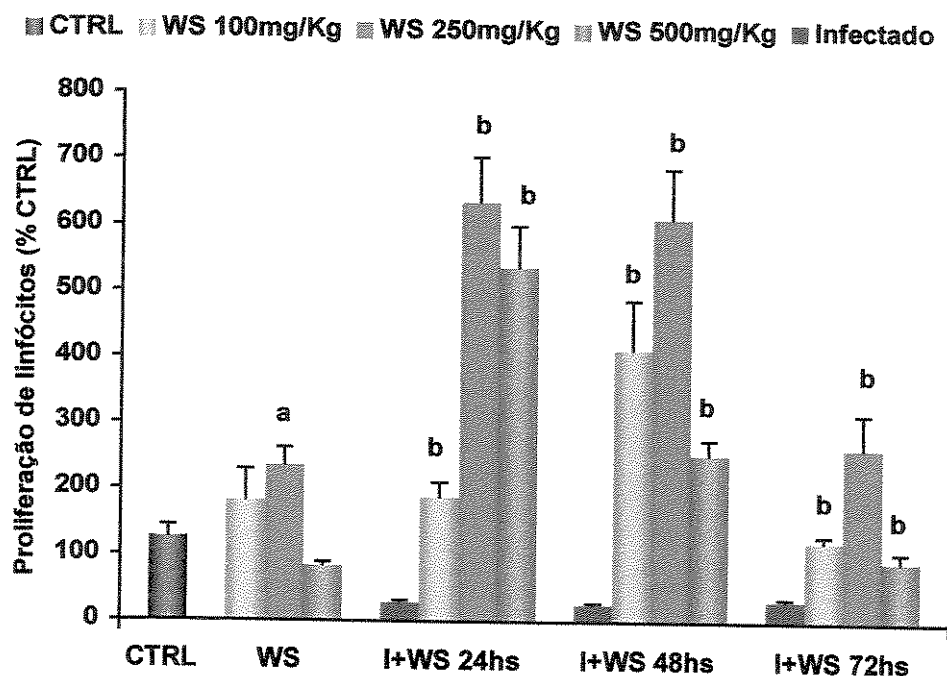


Figura 6 - Avaliação dos efeitos da WS sobre a proliferação de células esplênicas de animais inoculados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 células/animal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga (n=6, ANOVA, Tukey).

a	significativo em relação ao CTRL	P<0,01
b	significativo em relação aos respectivos grupos infectados	P<0,001

6 - EFEITOS DO EXTRATO DA WS NA SOBREVIDA DE ANIMAIS INFECTADOS COM DOSE LETAL DE *Listeria monocytogenes*

O grupo não tratado e inoculado com uma dose letal da *Listeria monocytogenes* apresentou um índice de mortalidade esperado de 100% até o sexto dia após a inoculação (figura 7). Não obstante, o tratamento profilático com a WS por 10 dias consecutivos aumentou a resistência dos animais à bactéria, resultando em 10% de sobrevida com as doses de 100 e 500mg/Kg (Curva de Kaplan-Maier, Log-Rank). Contudo, o maior índice de sobrevida (30%) foi observado com a dose de 250mg/Kg do extrato (Curva de Kaplan-Maier, Log-Rank).

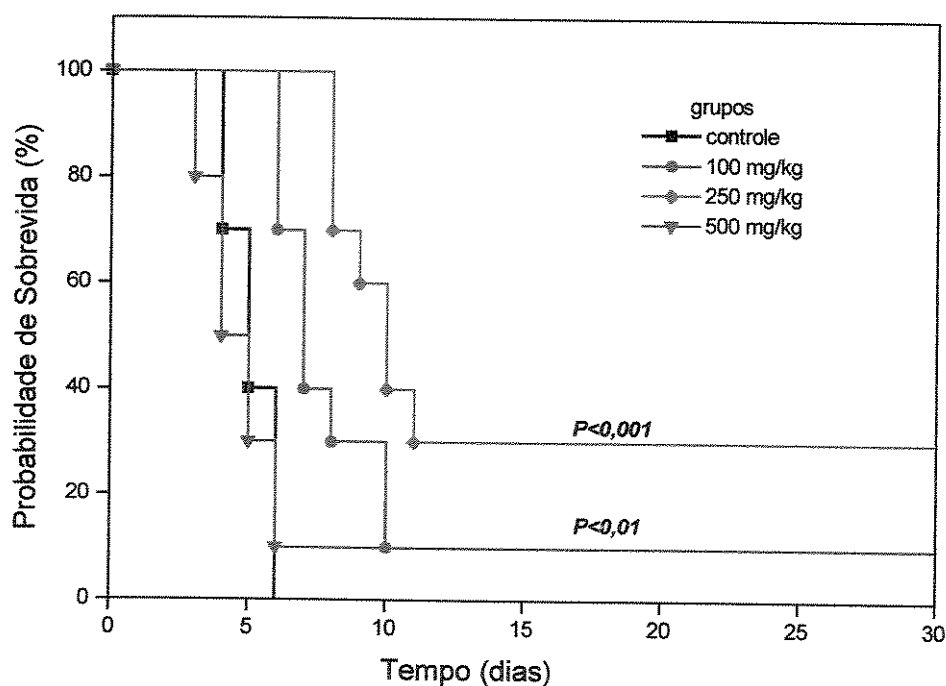


Figura 7 - Avaliação dos efeitos da WS na sobrevida de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (2×10^5 bactérias/animal) em relação ao grupo apenas infectado. Os grupos controles receberam somente diluente da droga (n=24, Curva de Kaplan-Maier, Long-rank).



DISCUSSÃO

De acordo com DIPIRO et al (1996), os avanços médicos modernos estão aumentando o número de hospedeiros imunocomprometidos jamais visto antes. Embora prolonguem a vida dos pacientes, os tratamentos terapêuticos agressivos usados atualmente freqüentemente tornam o sistema imunológico profundamente suprimido por períodos extensos, predispondo-os às infecções oportunistas (DIPIRO et al, 1996). Por isto, as conseqüências clínicas do tratamento com drogas imunodepressivas têm sido o assunto de um considerável número de casos relatados e de levantamentos bibliográficos (DESCOTES et al, 1988).

Independente da origem dos danos à imunocompetência, a queda na resistência às infecções é uma característica comum a todos os pacientes com imunodeficiência primária ou imunodepressão provocada por câncer e/ou quimioterapia ou síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Um estudo das imunodeficiências primárias mostrou claramente que a resistência reduzida às infecções pode assumir vários aspectos clínicos, de acordo com os componentes do sistema imunológico afetados. Deficiências na linhagem das células T, por exemplo, estão principalmente associadas às infecções viróticas severas (sarampo encefalopático, varicela maligna, vaccinia, etc.) e infecções oportunistas devido a patógenos intracelulares (tuberculose, listeriose e doenças legionárias) e fungos (aspergilose pulmonar, candidíase disseminada, criptococciose, etc.). Deficiências nas funções das células B são mais freqüentemente associadas com infecções severas causadas por bactérias (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella pneumoniae*, etc.) e alguns vírus (echovírus, adenovírus, etc.). Infecções recorrentes e piogênicas (*Streptococcus piogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, etc.) e doenças fúngicas crônicas da pele são complicações comumente resultantes da deficiência na fagocitose e na destruição intracelular de bactérias. Por fim, as deficiências do sistema do complemento são muitas vezes associadas às infecções recorrentes causadas por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, etc. (DESCOTES et al, 1999). Paradoxalmente, a eficácia clínica de quimioterápicos antimicrobianos nesses quadros geralmente requer um sistema imunológico funcional quase intacto para erradicar patógenos exógenos. Esta é a razão pela qual as infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos são normalmente muito difíceis de serem tratadas com sucesso. Em tais casos, a possível depressão adicional da

competência imunológico pelo próprio agente antimicrobiano pode dificultar ainda mais a recuperação dos pacientes (DESCOTES et al, 1999).

O velho conhecimento de que o estresse exacerba a progressão de doenças por meio dos efeitos imunossupressores dos corticosteróides e opióides endógenos, catecolaminas e hormônios da pituitária tampouco pode ser esquecido. Por isto, o contexto da *susceptibilidade às infecções* também se estende aos indivíduos aparentemente saudáveis da comunidade, mas expostos a situações que alteram o delicado equilíbrio de defesa orgânica (DANTZER et al, 1989).

Uma alternativa promissora para esse intrincado problema de perturbação da homeostasia imunológica vem ganhando força no reino vegetal, por meio de um grupo de drogas derivadas de plantas que têm revelado potencial para induzir um estado de resistência não específica do organismo, possibilitando sua adaptação a vários agentes que afetam adversamente o sistema imunológico (como microrganismos patogênicos, contaminantes inalados e ingeridos, certos medicamentos, etc.). Os alvos gerais da terapia adaptógena parecem repousar sobre a habilidade dessas plantas em reduzir as reações de estresse (incluindo as alterações imunológicas) durante a fase de alarme, prevenir ou retardar o estado de exaustão do organismo e, conseqüentemente, prover certo nível de proteção contra o estresse prolongado.

Embora os adaptógenos não sejam oficialmente aceitos pela medicina moderna, diversas plantas têm provado atividade adaptogênica em numerosos estudos científicos. Os efeitos imunopotencializador e mieloprotetor da WS, em especial, têm sido comprovados por meio do aumento da produção de citocinas e da proliferação e diferenciação de células hematopoéticas, tanto em camundongos imunocomprometidos quanto naqueles normais, em modelos laboratoriais de estresse e câncer (DAVIS et al, 1999).

Para provar a eficácia imunomoduladora da WS nas alterações imunológicas causadas por agentes infecciosos, nós utilizamos um modelo experimental da *Listeria monocytogenes* para a realização do estudo. A listéria é uma bactéria intracitoplasmática que altera significativamente a atividade hematopoética de camundongos BALB/c, criando, destarte, parâmetros seguros de avaliação do poder imunomodulador de diversas drogas.

No nosso trabalho, os camundongos BALB/c que foram inoculados com uma dose subletal da listéria apresentaram uma queda brusca na atividade hematopoética da medula óssea. Contudo, o tratamento profilático dos animais inoculados por 10 dias consecutivos com as doses pré-estabelecidas da WS (100, 250, 500 e 900mg/Kg) não somente tiveram essa atividade restaurada, como também elevada aos níveis acima do normal com a dose de 500mg/Kg. Nós observamos igualmente que a administração oral do extrato da WS (250mg/Kg) aos animais não inoculados com a listéria estimulou a proliferação e diferenciação de granulócitos e macrófagos quando comparados com os animais normais e não tratados. Estes resultados sustentam o poder mieloestimulante da planta observado em testes anteriores.

Além da mielossupressão, a inoculação murina da listéria também induz marcada migração das células fagocitárias da medula óssea em direção ao baço, visto que este é o local de replicação da bactéria e um componente essencial da resposta primária frente à listeriose. O nosso estudo confirmou esta hematopoese extramedular e ainda demonstrou que a WS foi capaz de restaurar o número de precursores hematopoéticos aos níveis normais no baço com todas as doses propostas. Nós também pudemos confirmar esta proteção através da reversão da esplenomegalia naturalmente provocada pela hematopoese extramedular. Esta redução no peso do baço dos camundongos infectados e tratados foi estatisticamente significativa em relação ao grupo infectado. Todas essas evidências reunidas suportam um grande potencial normalizador das funções imunológicas *in vivo* para o extrato da WS no modelo experimental de bactéria, alvo principal do nosso estudo.

Além de induzir o crescimento e a diferenciação de granulócitos e macrófagos, a literatura também revela que a WS apresenta efeito estimulador sobre a proliferação de linfócitos T citotóxicos em modelos experimentais de tumor *in vitro* e *in vivo* com camundongos BALB/c (DAVIS et al, 2002). O tratamento profilático dos camundongos no nosso estudo confirmou o mesmo potencial para a planta no modelo de infecção. A cultura clonal de células esplênicas de camundongos tratados por 10 dias consecutivos com WS e infectados com a bactéria apresentou acentuado aumento na transformação blástica dos linfócitos em todos os tempos analisados (24, 48 e 72 horas) em contraste com os reduzidos níveis de proliferação linfocitária na cultura dos animais infectados e não tratados com o extrato.

Todos estes benefícios imunomoduladores reunidos no extrato da WS culminaram na resistência do hospedeiro contra a listeriose, uma vez que os animais infectados e previamente tratados por 10 dias consecutivos com as doses de 100 e 500mg/Kg apresentaram 10% de sobrevida contra 100% de mortalidade entre aqueles somente inoculados com uma dose letal da *Listeria monocytogenes* na nossa curva de sobrevida. Embora as ditas doses tenham aumentado a resistência dos camundongos, o maior índice de sobrevivência foi notado com a administração de 250mg/Kg da WS, a qual protegeu 30% dos animais infectados com a bactéria.



CONCLUSÃO

O presente trabalho nos permitiu concluir que:

- O extrato de *Withania somnifera* possui propriedades hematomoduladoras em modelo experimental de infecção.
- O extrato aumenta a capacidade de proliferação dos linfócitos na presença de um agente infeccioso.
- O extrato da planta aumenta a sobrevivência dos animais inoculados com *Listeria monocytogenes*.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AM, Abou-Douh, New Withanolides and Other Constituents from the Fruit of *Withania somnifera*. **Archiv der Pharmazie**, 335 (6): 267-276, 2001.

BENNET, M. e BAKER, E. E. Marrow-dependent cell function in early stages of infection with *Listeria monocytogenes*. **Cell Immun**, 33: 203-210, 1977.

BHATTACHARYA, S. K.; MURUGANANDAM, A. V. Adaptogenic activity of *Withania somnifera*: an experimental study using a rat model of chronic stress. **Pharm Bio Behav**, 75 (3): 547-555, 2003.

DALRYMPLE, S. A.; LUCIAN, L. A.; SLATTERY, R.; McNEIL, T.; AUN, D. M.; FUCHINO, S.; LEE, F.; MURRAY, R. Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: correlation with inefficient neutrophilia. **Infect Immun** 63: 2262-2268, 1995.

DAVIS, L; KUTTAN, G. Suppressive effect of cyclophosphamide-induced toxicity by *Withania somnifera* extract in mice. **J Ethnopharmacol**, 62 (3): 209-214, 1998.

DAVIS, L; KUTTAN, G. Effect of *Withania somnifera* on cytokine production in normal and cyclophosphamide treated mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 21 (4): 695-703, 1999.

DEEPA, M.; VEERABASAPPA, T. G. Purification and characterization of a glycoprotein inhibitor of toxic phospholipase from *Withania somnifera*. **Arch Bio and Bioph**, 408 (1): 42-50, 2002.

DHULEY, J. N. Therapeutic efficacy of Ashwagandha against experimental aspergillosis in mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 20 (1): 191-198, 1998.

DIPIRO, J. T.; TALBERT, R. L.; YEE, G. C.; MATZKE, G. R.; WELLS, B. G.; POSEY, L. M. **Pharmacotherapy. A Pathophysiologic Approach**. 3ª edição. Estados Unidos: Appleton & Lange, 1996. p. 2281-2303.

DRAMSI, S.; LEVI, S.; TROLLER, A.; CROSSART, P. Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an *in vitro* study. **Infect Immun**, 66: 4461-4468, 1998.

HANH, H.; KAUFMANN, S. H. E. The role cell-mediated immunity in bacterial infections. **Rev Infect Dis**, 3: 1221-1250, 1981.

HUME, D. A.; PAVLI, P. DONAHUE, R. E.; FIDLER, I. J. The effect of human recombinant macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) on the murine mononuclear phagocyte *in vivo*. **J Immunol**, 141: 3405-3409, 1988.

HUNTER, C. A.; CHIZZONITE, R.; REMINGTON, J. S. IL-1 β is required for IL-12 to induce production of INF- γ by NK cells. **J Immunol**, 155: 4347-4354, 1995.

ILAYPERUMA, I.; RATNASOORIYA, W. D.; WEERASOORIYA, T. R. Effect of *Withania somnifera* root extract on the sexual behaviour of male rats. **Asian J Androl**, 4: 295-298, 2002.

IUVONE, T.; GIUSEPPE, E.; CAPASSO, F. and IZZO, A. A. Induction of nitric oxide synthase expression by *Withania somnifera* in macrophages. **Life Sci**, 72 (14): 1617-1625, 2002.

KAUFMANN, S. H. E. Immunity to intracellular bacteria. **Annu Rev Immunol**, 11: 129-163, 1993.

KOPF, M.; BAUMANN, H.; FREER, G.; FREUDENBERG, M.; LAMBERS, M.; KISHIMOTO, T.; ZINKERNAGEL, R.; BLUETHMANN, H.; KOHLER, G. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6 deficient mice. **Nature**, 368: 339-342, 1994.

LEEMOL, D.; GIRIJA, K. Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. **J Ethnopharm**, 71 (1-2): 193-200, 2000.

LEPAY, D. A., STEINMAN, R. M.; NATHAN, C. F.; MURRAY, H. W.; CHON, Z. A. Liver macrophages in murine listeriosis: cell-mediated immunity is correlated with an influx of macrophages capable of generating reactive oxygen intermediates. **J Exp Med**, 161: 1503-1512, 1985.

LIU, W.; KURLANDER, R. J. Analysis of the interrelationship between IL-12, TNF- α and INF- γ production during listeriosis. **Cell Immunol**, 163: 260-267, 1995.

LIU, Z.; CHEERS, C. The cellular source of interleukin-6 during *Listeria* infection. **Infect Immun**, 61: 2626-2631, 1993.

MACKANESS, G. B. Cellular resistance. **J Exp Med**, 116: 381-390, 1962.

METCALF, D. The bioassay of colony stimulating factors. In:_____. **The hemopoietic colony stimulating factors**. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier, 187-213, 1984.

MIELKE, M. E. A.; EHLERS, S. HAHN, H. The role of cytokines in experimental listeriosis. **Immunobiol**, 189: 285-315, 1993.

MOMBAERTS, P.; ARNOLDI, J.; RUSS, F.; TONEGAWA, S.; KAUFMANN, S. H. E. Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. **Natural**, 365: 53-56, 1993.

NISHIBORI, T.; XIONG, H.; KAWAMURA, I.; ARAKAWA, M.; MITSUYAMA, M. Induction of cytokine gene expression by Listeriolysin O and roles of macrophages and NK cells. **Infect Immun**, 64: 3188-3195, 1996.

NORTH, R. J. The relative importance of blood monocytes and fixed macrophages to the expression on cell-mediated immunity of infection. **J Exp Med**, 132:521-534, 1970.

PARIHAR, M. S.; HEMNANI, T. Phenolic antioxidants attenuate hippocampal neuronal cell damage against kainic acid induced excitotoxicity. **J Biosci**, 28 (1): 121-128, 2003.

QUEIROZ, M. L. S.; BINCOLETO, C.; VALADARES, M. C.; DANTAS, D. C. M. Células pluripotenciais em cultura: revisão bibliográfica. **Ciência e Cultura**, 40: 421-426, 1988.

RAHMAN, A et al. Withanolides from *Withania coagulans*. **Phytochemistry**, 63 (4): 387-390, 2003.

ROGERS, H. W; TRIPP, C. S.; SCHREIBER, R. D.; UNANUE, E. R. Interleukin-1 participates in the development of anti-*Listeria* responses in both normal and scid mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, 89: 1011-1015, 1992.

ROSEN, H.; GORDON, S.; NORTH, R. J. Exacerbation of murine listeriosis by a monoclonal antibody specific for type 3 complement receptor of myelomonocytic cells: absence of monocytes at ineffective foci allows listeria to multiply in non phagocytic cells. **J Exp Med**, 170: 27-37, 1989.

SINGH, B.; CHANDAN, B. K.; GUPTA, D. K. Adaptogenic activity of a novel withanolide-free aqueous fraction from the roots of *Withania somnifera* Dun. (Part II). **Phytother Res**, 17(5): 531-536, 2003.

SKEEN, M.; ZIEGLER, H. K. Activation of $\gamma\delta$ T cells for production of INF- γ is mediated by bacteria via macrophage-derived cytokines IL-1 and IL-12. **J Immunol**, 154: 5832-5841, 1995.

SOUTHWICK, F. S. e PURICH, D. L. Intracellular pathogenesis of listeriosis. **New Engl J Med**, 334: 770-776, 1996.

STEVENSON, M. M.; KONGSHAVN, P. A. L.; SHAMENE, E. Genetic linkage of resistance to *Listeria monocytogenes* with macrophage inflammatory responses. **J Immunol**, 127: 402-407, 1981.

TRIPP, C. S.; WOLF, S. F.; UNANUE, E. R. Interleukin-12 and tumor necrosis factor α are costimulators of interferon- γ production by Natural Killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin-10 is a physiologic antagonist. **Prod Natl Acad Sci USA**, 90: 3725-3729, 1993.

UNANUE, E. R. Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance. **Curr Opinion Immunol**, 9: 35-43, 1997.

WING, E. J.; MAGEE, D. M.; BARBCZYNSKI, L. K. Analysis of colony-stimulating factors and macrophage progenitor cells in mice immunized against *Listeria monocytogenes* by adoptive transfer. **Infect Immun**, 55: 1843-1847, 1987.

YOUNG, A. M.; CHEERS, C. Colony-forming cells and colony-stimulating activity during listeriosis in genetically resistant or susceptible mice. **Cell Immunol**, 97: 227-237, 1986.

ZIAUDDIN, M.; PHANSALKAR, N; PATKI, P.; DIWANAY, S.; PATWARDHAN, B. Studies on the immunomodulatory effects of Ashwagandha. **J Ethnopharmacol**, 50 (2): 69-76, 1996.



APÊNDICE

Tabela 2 - Avaliação dos efeitos da WS sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.

CFU-GM (Fêmur)							Parâmetros $\times 10^3$			
N	CTRL	WS100	WS250	WS500	WS900	I	WS100 +I	WS250 +I	WS500 +I	WS900 +I
1	16,17	12,90	19,04	12,75	11,50	16,12	15,50	15,30	11,31	11,25
2	11,31	20,12	19,60	13,86	10,29	12,00	14,14	14,85	9,60	10,39
3	14,93	15,48	18,43	13,90	13,44	12,24	14,28	17,50	9,94	14,44
4	12,25	24,75	19,50	11,52	9,12	9,00	13,64	11,39	10,23	15,25
5	11,15	25,08	20,00	14,31	10,75	12,00	14,00	15,30	14,40	16,75
6	14,57	15,93	15,89	12,58	10,62	12,37	15,56	14,87	12,58	12,00
X	13,40	19,04	18,74	13,15	10,95	12,29	14,52	14,87	11,34	13,35
DP	2,10	5,11	1,498	1,05	1,45	2,27	0,81	1,97	1,85	2,50

CTRL: controle

WS100: tratados com WS 100mg/Kg

WS250: tratados com WS 250mg/Kg

WS500: tratados com WS 500mg/Kg

WS900: tratados com WS 900mg/Kg

I: infectado

WS100+I: tratados com WS 100mg/Kg e infectados com LM

WS250+I: tratados com WS 250mg/Kg e infectados com LM

WS500+I: tratados com WS 500mg/Kg e infectados com LM

WS900+I: tratados com WS 900mg/Kg e infectados com LM

Tabela 3 - Avaliação dos efeitos da WS sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.

CFU-GM (Fêmur)							Parâmetros $\times 10^3$			
N	CTRL	WS100	WS250	WS500	WS900	I	WS100 +I	WS250 +I	WS500 +I	WS900 +I
1	16,17	12,90	19,04	12,75	11,50	6,12	9,12	11,04	12,61	10,50
2	11,31	20,12	13,15	13,86	10,29	7,75	11,88	11,11	20,96	9,25
3	14,93	15,48	18,54	13,90	13,44	6,12	10,80	9,96	9,88	10,75
4	12,25	24,75	17,00	11,52	9,12	5,87	10,20	10,70	8,58	12,47
5	11,15	25,08	14,28	14,31	10,75	5,75	11,88	8,10	11,05	11,25
6	14,57	15,93	20,43	12,58	10,62	6,25	14,75	9,90	12,00	16,50
X	13,40	19,04	17,07	13,15	10,95	6,31	11,43	10,14	12,51	11,79
DP	2,10	5,11	2,85	1,05	1,45	0,73	1,93	1,12	4,39	2,54

CRTL: controle

WS100+I: tratados com WS 100mg/Kg e infectados com LM

WS100: tratados com WS 100mg/Kg

WS250+I: tratados com WS 250mg/Kg e infectados com LM

WS250: tratados com WS 250mg/Kg

WS500: tratados com WS 500mg/Kg

WS500+I: tratados com WS 500mg/Kg e infectados com LM

WS900: tratados com WS 900mg/Kg

I: Infectado

WS900+I: tratados com WS 900mg/Kg e infectados com LM

Tabela 4 - Avaliação dos efeitos da WS sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.

CFU-GM (Fêmur)							Parâmetros $\times 10^3$			
N	CTRL	WS100	WS250	WS500	WS900	I	WS100 +I	WS250 +I	WS500 +I	WS900 +I
1	16,17	11,50	14,38	12,75	11,50	9,00	10,50	19,23	22,15	21,50
2	11,31	10,29	12,04	13,86	10,29	6,62	16,00	20,58	22,00	21,25
3	14,93	13,44	14,36	13,90	13,44	9,25	12,00	21,30	23,68	21,00
4	12,25	9,12	13,68	11,52	9,2	8,12	19,50	22,45	25,74	15,50
5	11,15	10,75	12,98	14,31	10,75	9,37	12,25	22,15	25,41	17,10
6	14,57	10,62	13,62	12,58	10,62	10,00	14,87	20,13	24,09	20,00
X	13,40	10,95	13,51	13,15	10,95	8,73	14,19	20,97	23,84	19,39
DP	2,10	1,15	0,89	1,05	1,45	1,20	3,29	1,23	1,58	2,50

CRTL: controle

WS100: tratados com WS 100mg/Kg

WS250: tratados com WS 250mg/Kg

WS500: tratados com WS 500mg/Kg

WS900: tratados com WS 900mg/Kg

I: infectado

WS100+I: tratados com WS 100mg/Kg e infectados com LM

WS250+I: tratados com WS 250mg/Kg e infectados com LM

WS500+I: tratados com WS 500mg/Kg e infectados com LM

WS900+I: tratados com WS 900mg/Kg e infectados com LM

Tabela 5 - Avaliação dos efeitos da WS sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.

CFU-GM (Baço)							Parâmetros $\times 10^{-2}$			
N	CTRL	WS100	WS250	WS500	WS900	I	WS100 +I	WS250 +I	WS500 +I	WS900 +I
1	16,92	18,72	15,12	15,12	14,63	17,64	21,32	17,25	29,85	31,65
2	10,08	19,00	18,25	18,72	15,32	12,24	22,25	18,25	13,65	30,00
3	12,60	19,06	14,56	15,50	16,80	15,12	20,12	19,36	33,86	34,44
4	10,44	17,48	16,52	18,64	17,60	7,20	12,90	20,00	33,90	25,85
5	9,00	19,60	17,50	17,56	16,90	8,64	15,56	21,03	31,25	36,75
6	7,92	18,80	15,30	15,63	17,20	17,00	25,93	22,00	22,58	42,00
X	11,16	18,78	16,21	16,86	16,41	12,97	19,68	19,65	27,52	33,45
DP	3,23	0,71	1,46	1,64	1,17	4,37	4,72	1,75	7,96	5,62

CTRL: controle

WS100: tratados com WS 100mg/Kg

WS250: tratados com WS 250mg/Kg

WS500: tratados com WS 500mg/Kg

WS900: tratados com WS 900mg/Kg

I: infectado

WS100+I: tratados com WS 100mg/Kg e infectados com LM

WS250+I: tratados com WS 250mg/Kg e infectados com LM

WS500+I: tratados com WS 500mg/Kg e infectados com LM

WS900+I: tratados com WS 900mg/Kg e infectados com LM

Tabela 6 - Avaliação dos efeitos da WS sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.

CFU-GM (Baço)							Parâmetros $\times 10^{-2}$			
N	CTRL	WS100	WS250	WS500	WS900	I	WS100 +I	WS250 +I	WS500 +I	WS900 +I
1	16,92	18,72	15,12	15,12	14,63	345,60	37,44	19,16	24,84	45,00
2	10,08	19,00	18,25	18,72	15,32	277,65	36,72	31,24	28,80	63,00
3	12,60	19,06	14,56	15,50	16,80	270,00	18,00	20,01	16,20	90,72
4	10,44	17,48	16,52	18,64	17,60	207,00	27,00	41,52	27,00	72,00
5	9,00	19,60	17,50	17,56	16,90	288,00	18,72	42,36	42,12	59,40
6	7,92	18,80	15,30	15,63	17,20	276,52	33,14	35,62	44,64	81,00
X	11,16	18,78	16,21	16,86	16,41	277,46	28,50	31,65	30,60	68,52
DP	3,22	0,71	1,46	1,64	1,17	44,21	8,68	10,19	10,83	16,29

CTRL: controle

WS100: tratados com WS 100mg/Kg

WS250: tratados com WS 250mg/Kg

WS500: tratados com WS 500mg/Kg

WS900: tratados com WS 900mg/Kg

I: infectado

WS100+I: tratados com WS 100mg/Kg e infectados com LM

WS250+I: tratados com WS 250mg/Kg e infectados com LM

WS500+I: tratados com WS 500mg/Kg e infectados com LM

WS900+I: tratados com WS 900mg/Kg e infectados com LM

Tabela 7 - Avaliação dos efeitos da WS sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal pela via). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.

CFU-GM (Baço)							Parâmetros $\times 10^{-2}$			
N	CTRL	WS100	WS250	WS500	WS900	I	WS100 +I	WS250 +I	WS500 +I	WS900 +I
1	16,92	18,72	15,12	15,12	14,63	170,00	19,00	22,39	19,00	36,00
2	10,08	19,00	18,25	18,72	15,32	190,44	27,00	18,45	18,00	63,00
3	12,60	19,06	14,56	15,50	16,80	175,00	33,70	25,00	17,44	44,50
4	10,44	17,48	16,52	18,64	17,60	198,00	24,50	31,02	20,37	64,00
5	9,00	19,60	17,50	17,56	16,90	108,00	23,75	23,61	24,35	37,00
6	7,92	18,80	15,30	15,63	17,20	195,04	37,80	21,21	27,00	47,08
X	11,16	18,78	16,21	16,86	16,41	172,75	27,63	23,61	21,03	48,60
DP	3,23	0,71	1,46	1,64	1,17	33,62	6,93	4,26	3,83	12,30

CTRL: controle

WS100+I: tratados com WS 100mg/Kg e infectados com LM

WS100: tratados com WS 100mg/Kg

WS250+I: tratados com WS 250mg/Kg e infectados com LM

WS250: tratados com WS 250mg/Kg

WS500: tratados com WS 500mg/Kg

WS500+I: tratados com WS 500mg/Kg e infectados com LM

WS900: tratados com WS 900mg/Kg

I: infectado

WS900+I: tratados com WS 900mg/Kg e infectados com LM

Tabela 8 - Avaliação dos efeitos da WS sobre o peso do baço de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.

PESO DO BAÇO										miligramas
N	CTRL	WS100	WS250	WS500	WS900	I	WS100 +I	WS250 +I	WS500 +I	WS900 +I
1	127	98	137	100	138	215	119	101	91	82
2	134	114	98	125	119	209	79	108	94	69
3	100	107	130	100	109	232	103	120	109	73
4	110	137	129	124	120	220	94	126	73	103
5	129	141	96	130	111	238	86	105	95	88
6	98	129	132	127	90	223	99	102	90	91
X	116	121	120	118	115	223	97	110	92	84
DP	15,68	17,29	18,29	13,84	15,78	23	13,96	10,29	11,56	12,45

CRTL: controle

WS100+I: tratados com WS 100mg/Kg e infectados com LM

WS100: tratados com WS 100mg/Kg

WS250+I: tratados com WS 250mg/Kg e infectados com LM

WS250: tratados com WS 250mg/Kg

WS500: tratados com WS 500mg/Kg

WS500+I: tratados com WS 500mg/Kg e infectados com LM

WS900: tratados com WS 900mg/Kg

I: infectado

WS900+I: tratados com WS 900mg/Kg e infectados com LM

Tabela 9 - Avaliação dos efeitos da WS sobre o peso do baço de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.

PESO DO BAÇO							miligramas			
N	CTRL	WS100	WS250	WS500	WS900	I	WS100 +I	WS250 +I	WS500 +I	WS900 +I
1	127	98	137	100	138	294	137	123	119	112
2	134	114	98	125	119	300	94	127	130	121
3	100	107	130	100	109	233	154	94	124	93
4	110	137	129	124	120	269	132	134	89	88
5	129	141	96	130	111	272	108	129	90	111
6	98	129	132	127	90	283	113	124	111	123
X	116	121	120	118	115	275	123	122	111	108
DP	15,68	17,29	18,29	13,84	15,78	23,91	21,93	14,19	17,42	14,45

CRTL: controle

WS100: tratados com WS 100mg/Kg

WS250: tratados com WS 250mg/Kg

WS500: tratados com WS 500mg/Kg

WS900: tratados com WS 900mg/Kg

I: infectado

WS100+I: tratados com WS 100mg/Kg e infectados com LM

WS250+I: tratados com WS 250mg/Kg e infectados com LM

WS500+I: tratados com WS 500mg/Kg e infectados com LM

WS900+I: tratados com WS 900mg/Kg e infectados com LM

Tabela 10 - Avaliação dos efeitos da WS sobre o peso do baço de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.

PESO DO BAÇO										miligramas
N	CTRL	WS100	WS250	WS500	WS900	I	WS100 +I	WS250 +I	WS500 +I	WS900 +I
1	127	98	137	100	138	229	160	133	167	190
2	134	114	98	125	119	267	149	166	152	161
3	100	107	130	100	109	311	150	148	146	165
4	110	137	129	124	120	243	172	183	193	143
5	129	141	96	130	111	267	150	155	146	158
6	98	129	132	127	90	263	154	150	160	167
X	116	121	120	118	115	263	156	156	161	164
DP	15,68	17,29	18,29	13,84	15,78	27,90	8,91	17,08	17,84	15,31

CRTL: controle

WS100: tratados com WS 100mg/Kg

WS250: tratados com WS 250mg/Kg

WS500: tratados com WS 500mg/Kg

WS900: tratados com WS 900mg/Kg

I: infectado

WS100+I: tratados com WS 100mg/Kg e infectados com LM

WS250+I: tratados com WS 250mg/Kg e infectados com LM

WS500+I: tratados com WS 500mg/Kg e infectados com LM

WS900+I: tratados com WS 900mg/Kg e infectados com LM

Tabela 11 - Avaliação dos efeitos da WS sobre a produção de fatores estimuladores de colônias de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.

FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS										Unidades/mL
N	CTRL	WS100	WS250	WS500	WS900	I	WS100 +I	WS250 +I	WS500 +I	WS900 +I
1	0,6	3,2	4,3	3,0	3,0	10,9	12,8	14,6	13,0	13,6
2	1,1	3,5	4,0	4,5	3,8	8,9	14,2	12,9	14,5	14,9
3	0,8	4,0	3,3	3,5	3,5	10,6	12,9	12,0	15,1	14,1
4	1,2	4,1	4,2	3,2	4,0	8,5	14,0	13,6	14,6	14,6
5	1,1	3,7	3,8	3,8	3,2	8,8	12,1	13,8	13,9	13,7
6	0,8	3,9	3,5	4,2	4,2	9,1	13,1	14,1	14,1	12,9
X	0,9	3,8	3,8	3,7	3,6	9,5	13,2	13,5	14,2	14,0
DP	0,234	0,362	0,360	0,535	0,501	1,017	0,789	0,925	0,721	0,726

CRTL: controle

WS100: tratados com WS 100mg/Kg

WS250: tratados com WS 250mg/Kg

WS500: tratados com WS 500mg/Kg

WS900: tratados com WS 900mg/Kg

I: infectado

WS100+I: tratados com WS 100mg/Kg e infectados com LM

WS250+I: tratados com WS 250mg/Kg e infectados com LM

WS500+I: tratados com WS 500mg/Kg e infectados com LM

WS900+I: tratados com WS 900mg/Kg e infectados com LM

Tabela 12 - Avaliação dos efeitos da WS sobre a produção de fatores estimuladores de colônias de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.

FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS										Unidades/mL
N	CTRL	WS100	WS250	WS500	WS900	I	WS100 +I	WS250 +I	WS500 +I	WS900 +I
1	0,6	3,1	4,2	3,1	3,0	13,0	16,9	16,1	16,9	18,0
2	1,1	3,6	4,0	4,5	3,8	12,1	17,0	18,0	17,6	17,1
3	0,8	4,0	3,2	3,6	3,6	14,0	18,1	17,1	17,0	16,9
4	1,2	4,1	4,0	3,2	4,1	14,2	17,1	17,6	17,1	16,4
5	1,1	3,8	3,9	3,8	3,1	13,5	16,0	16,9	17,2	17,5
6	0,8	3,9	3,6	4,1	4,2	11,9	17,9	17,0	16,2	16,6
X	0,9	3,8	3,8	3,7	3,6	13,1	17,2	17,1	17,0	17,1
DP	0,234	0,362	0,360	0,535	0,501	0,962	0,758	0,649	0,460	0,591

CTRL: controle

WS100+I: tratados com WS 100mg/Kg e infectados com LM

WS100: tratados com WS 100mg/Kg

WS250+I: tratados com WS 250mg/Kg e infectados com LM

WS250: tratados com WS 250mg/Kg

WS500: tratados com WS 500mg/Kg

WS500+I: tratados com WS 500mg/Kg e infectados com LM

WS900: tratados com WS 900mg/Kg

I: infectado

WS900+I: tratados com WS 900mg/Kg e infectados com LM

Tabela 13 - Avaliação dos efeitos da WS sobre a produção de fatores estimuladores de colônias de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.

FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS										Unidades/mL
N	CTRL	WS100	WS250	WS500	WS900	I	WS100 +I	WS250 +I	WS500 +I	WS900 +I
1	0,6	3,1	4,2	3,1	3,0	6,9	11,8	11,6	10,6	11,9
2	1,1	3,6	4,0	4,5	3,8	6,3	11,2	10,6	10,9	11,6
3	0,8	4,0	3,2	3,6	3,6	7,0	11,8	11,5	11,5	10,5
4	1,2	4,1	4,0	3,2	4,1	5,6	10,0	11,8	12,8	10,8
5	1,1	3,8	3,9	3,8	3,1	5,8	12,0	12,2	12,4	11,6
6	0,8	3,9	3,6	4,1	4,2	6,1	12,1	12,6	11,9	11,7
X	0,9	3,8	3,8	3,7	3,6	6,3	11,5	11,7	11,7	11,4
DP	0,234	0,362	0,360	0,535	0,501	0,571	0,791	0,682	0,852	0,560

CTRL: controle

WS100: tratados com WS 100mg/Kg

WS250: tratados com WS 250mg/Kg

WS500: tratados com WS 500mg/Kg

WS900: tratados com WS 900mg/Kg

I: infectado

WS100+I: tratados com WS 100mg/Kg e infectados com LM

WS250+I: tratados com WS 250mg/Kg e infectados com LM

WS500+I: tratados com WS 500mg/Kg e infectados com LM

WS900+I: tratados com WS 900mg/Kg e infectados com LM

Tabela 14 - Avaliação dos efeitos da WS sobre a proliferação de células esplênicas de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.

LINFÓCITOS								% CTRL
N	CTRL	WS100	WS250	WS500	I	WS100 +I	WS250 +I	WS500 +I
1	139,00	162,00	236,00	82,00	27,27	218,18	690,91	645,46
2	147,00	232,00	225,00	77,00	30,20	163,64	554,55	554,55
3	106,00	161,00	192,00	83,00	29,65	200,00	636,36	527,27
4	133,00	121,00	255,00	87,00	32,50	163,64	569,23	475,76
5	131,00	244,00	270,00	89,00	28,90	199,56	690,91	486,36
6	104,00	178,00	237,00	87,00	27,26	186,03	554,08	538,62
X	126,67	183,00	235,83	83,60	29,30	188,51	636,27	538,00
DP	17,69	46,73	26,74	4,40	1,98	21,81	66,90	60,79

CTRL: controle

WS100+I: tratados com WS 100mg/Kg e infectados com LM

WS100: tratados com WS 100mg/Kg

WS250+I: tratados com WS 250mg/Kg e infectados com LM

WS250: tratados com WS 250mg/Kg

WS500: tratados com WS 500mg/Kg

WS500+I: tratados com WS 500mg/Kg e infectados com LM

I: infectado

Tabela 15 - Avaliação dos efeitos da WS sobre a proliferação de células esplênicas de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.

LINFÓCITOS						% CTRL		
N	CTRL	WS100	WS250	WS500	I	WS100 +I	WS250 +I	WS500 +I
1	139,00	162,00	236,00	82,00	25,63	334,56	573,59	290,57
2	147,00	232,00	225,00	77,00	23,62	383,02	754,72	250,94
3	106,00	161,00	192,00	83,00	24,65	441,51	549,06	230,19
4	133,00	121,00	255,00	87,00	29,56	359,65	562,63	239,62
5	131,00	244,00	270,00	89,00	27,85	541,51	615,29	258,63
6	104,00	178,00	237,00	87,00	25,56	416,97	611,88	254,04
X	126,67	183,00	235,83	83,60	26,15	412,87	611,19	253,99
DP	17,69	46,73	26,74	4,40	2,18	73,81	75,17	20,70

CTRL: controle

WS100+I: tratados com WS 100mg/Kg e infectados com LM

WS100: tratados com WS 100mg/Kg

WS250+I: tratados com WS 250mg/Kg e infectados com LM

WS250: tratados com WS 250mg/Kg

WS500: tratados com WS 500mg/Kg

WS500+I: tratados com WS 500mg/Kg e infectados com LM

I: infectado

Tabela 16 - Avaliação dos efeitos da WS sobre a proliferação de células esplênicas de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.

LINFÓCITOS						% CTRL		
N	CTRL	WS100	WS250	WS500	I	WS100 +I	WS250 +I	WS500 +I
1	139,00	162,00	236,00	82,00	32,00	132,50	314,29	105,26
2	147,00	232,00	225,00	77,00	34,00	114,29	171,43	71,43
3	106,00	161,00	192,00	83,00	32,00	112,63	285,15	101,20
4	133,00	121,00	255,00	87,00	36,00	125,50	257,14	85,71
5	131,00	244,00	270,00	89,00	28,00	127,80	296,12	97,85
6	104,00	178,00	237,00	87,00	33,00	121,62	260,74	94,23
X	126,67	183,00	235,83	83,60	32,50	122,39	264,15	92,61
DP	17,69	46,73	26,74	4,40	2,67	7,78	50,27	12,33

CTRL: controle

WS100+I: tratados com WS 100mg/Kg e infectados com LM

WS100: tratados com WS 100mg/Kg

WS250+I: tratados com WS 250mg/Kg e infectados com LM

WS250: tratados com WS 250mg/Kg

WS500: tratados com WS 500mg/Kg

WS500+I: tratados com WS 500mg/Kg e infectados com LM

I: infectado