

CAMILA ALEXANDRINA VIANA DE FIGUEIRÊDO

**Avaliação dos efeitos do extrato do Chá verde (*Camellia sinensis*
(*L.*) *Kuntze*) sobre a resposta imunohematopoética de camundongos
infectados com *Listeria monocytogenes***

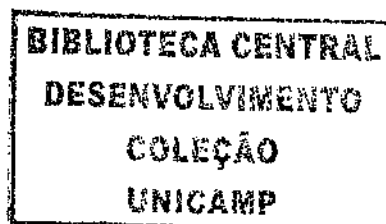
*Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado,
apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas -
UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Farmacologia da
Farmacêutica – Camila Alexandrina Viana de Figueiredo.*

Campinas, 30 de junho de 2005.

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



2005



CAMILA ALEXANDRINA VIANA DE FIGUEIRÊDO

Avaliação dos efeitos do extrato do Chá verde (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) sobre a resposta imunohematopoética de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz



Campinas, 2005

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	F469a
V	EX
TOMBO BC/	66565
PROC.	16-0-00086-05
C	☐
O	☒
PREÇO	11,00
DATA	14/12/05
Nº CPD	

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8º / 6044

BIB ID: 374352

F469a

Figueirêdo, Camila Alexandrina Viana de
Avaliação dos efeitos do extrato do chá verde (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) sobre a resposta imunoematopoética de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*. / Camila Alexandrina Viana de Figueirêdo. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Mary Luci de Souza Queiroz
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Camellia sinensis*. 2. Extratos vegetais. 3. *Listeria monocytogenes*. I. Queiroz, Mary Luci de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(Slp/fcm)

2005

Banca Examinadora de Tese de Doutorado

Orientadora:

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Membros:

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Prof. Dr. Helio dos Santos Dutra

Dr. Luiz Pianowski

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad

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

Data: 30/06/2005

200529164

Agradecimentos

À Deus por mais esta conquista e por sempre me iluminar em minha caminhada;

Aos meus queridos pais, Ana e Antônio, pelo incentivo, amor e apoio incondicional;

À razão da minha vida e eterno amor, Márcio Fontana, por todos os momentos ao seu lado, pelo amor, carinho, dedicação e apoio;

À querida professora Mary, pela amizade, por todas as oportunidades e pelo crescimento científico;

Às minhas irmãs, Gretha e Sarah, pelo carinho e amizade;

À minha vizinha Suzete por todo o amor e apoio;

À minha querida tia e madrinha Neide pelos conselhos e oração;

Aos meus segundos pais, Anélia e Mário, pela compreensão e carinho;

A toda a Família Viana Figueirêdo e Fontana;

Às grandes amigas, Aline e Samara, pela amizade, pelo apoio e ajuda incondicional;

A todos que compõem o laboratório de CFU e Imunotoxicologia;

À Dra. Rita Perlingeiro, pelos ensinamentos e oportunidades;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro;

Ao departamento de Farmacologia e Hemocentro;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*Dedico este trabalho aos meus pais e
esposo, pela realização de um sonho.*

<i>Lista de Figuras</i>	ix
<i>Lista de Tabelas</i>	x
<i>Lista de Tabelas</i>	xi
1. RESUMO	xvii
2. ABSTRACT	xix
3. INTRODUÇÃO	21
3.1. Chá Verde (<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze).....	21
3.2. Modelo experimental de infecção por <i>Listeria monocytogenes</i>	23
4. OBJETIVOS	29
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1. Animais e Tratamento	31
5.2. Extrato Padronizado da planta <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze (<i>Chá Verde</i>)	31
5.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	32
5.4. Cultura clonal de precursores hematopoéticos da medula óssea e baço de camundongos (CFU-C)	32
5.4.1. Remoção da medula óssea dos animais.....	32
5.4.2. Remoção do Baço dos animais.....	33
5.4.3. Preparo das placas de cultura da medula óssea e baço em meio semi-sólido	33
5.5. Preparo do meio condicionado de células esplênicas (SCM)	33
5.6. Obtenção do soro dos animais para detecção de atividade estimuladora de colônias hematopoéticas (CSA)	34
5.7. Avaliação das células “Natural Killer” (NK)	34
5.7.1. Manutenção e preparo das células alvos	34
5.7.2. Células efetoras esplênicas.....	34
5.7.3. Ensaio de liberação de ⁵¹ Cr.....	35
5.8. Capacidade Proliferativa de Linfócitos	35
5.9. Cultura líquida de longa duração (LTBMC):	36
5.10. Dosagem de citocinas	37

5.11. Realização da curva de sobrevida	38
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
7. RESULTADOS.....	41
7.1. Produção e titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM)	41
7.2. Avaliação da sobrevida de animais infectados com dose letal de <i>L. monocytogenes</i> e tratados com diferentes doses de GTE.....	43
7.3. Avaliação dos efeitos de diferentes doses de GTE sobre o crescimento e a diferenciação dos precursores hematopoéticos (CFU-GM) da medula óssea de animais normais e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i>	45
7.4 Avaliação dos efeitos de diferentes doses de GTE (50,100 e 250mg/Kg) sobre o crescimento e a diferenciação dos precursores hematopoéticos (CFU-GM) do baço de animais normais e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i>	47
7.5. Avaliação dos efeitos de diferentes doses de GTE sobre o peso do baço em animais normais e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i>	49
7.6. Avaliação dos efeitos de diferentes doses de GTE sobre a atividade estimuladora de colônias hematopoéticas do soro (CSA) de animais normais e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i>	51
7.7. Efeitos do tratamento com GTE sobre a atividade de células “Natural Killer” (NK)	53
Em relação ao grupo controle.....	54
7.8. Avaliação dos efeitos de diferentes doses de GTE (50,100 e 250mg/Kg) sobre proliferação de linfócitos de animais normais e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i>	56
7.9. Efeitos do GTE sobre a produção de IFN- γ em culturas de células esplênicas.....	58
7.10. Efeitos do GTE sobre a produção de IL-10 em culturas de células esplênicas	60
7.11. Avaliação dos efeitos de diferentes doses de GTE (50,100 e 250mg/Kg) sobre cultura de longa duração de células de medula óssea (LTBMC) de animais normais e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i>	62
8. DISCUSSÃO	68
9. CONCLUSÕES.....	77
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

Lista de Figuras

Figura 1: <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze.....	21
Figura 2: <i>Listeria monocytogenes</i> , coloração de Gram, demonstrando bacilo Gram positivo.....	24
Figura 3: Mecanismo de disseminação da <i>L. monocytogenes</i>	25
Figura 4: Aspecto morfológico das colônias de <i>L. monocytogenes</i>	32
Figura 5: Titulação do meio condicionado de células esplênicas.	41
Figura 6: Avaliação dos efeitos do tratamento com 50, 100, 250, 500 e 1000 mg/Kg de GTE, administrado por sete dias consecutivos, anteriores à inoculação de 1×10^5 bac/animal na sobrevivência de camundongos infectados com dose letal de <i>L. monocytogenes</i> . Curva de Kaplan-Maier, Log Rank, $P < 0,05$ em relação ao grupo infectado ($n=20$ /por grupo).....	44
Figura 7: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250 mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c. A bactéria foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e a avaliação hematopoética foi realizada 24, 48 e 72 horas após infecção. $n=6$. $P < 0,05$ ANOVA-Tukey (Média $\pm$ SD).....	46
Figura 8: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250 mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de camundongos BALB/c. A bactéria foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e a avaliação hematopoética foi realizada 24, 48 e 72 horas após infecção. $n=6$. $P < 0,05$ ANOVA-Tukey (Média $\pm$ SD).....	48
Figura 9: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250 mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o peso do baço de camundongos BALB/c. A bactéria foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o peso do baço foi mensurado 24, 48 e 72 horas após infecção. $n=6$. $P < 0,05$ ANOVA-Tukey (Média $\pm$ SD).....	50
Figura 10: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250 mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a produção de fatores estimuladores de colônias hematopoéticas (CSF) no soro de camundongos BALB/c. A bactéria foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o soro foi obtido 24, 48 e 72 horas após infecção. $n=6$. $P < 0,05$ ANOVA-Tukey (Média $\pm$ SD).	52

Figura 11: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250 mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a atividade lítica de células NK em camundongos BALB/c. A bactéria foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio de citotoxicidade foi realizado 48 horas após infecção. $n=6$. $P<0,05$ ANOVA-Tukey (Média $\pm$ SD).	55
Figura 12: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/ animal, sobre a proliferação de linfócitos de camundongos BALB/c. A bactéria foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio de proliferação foi realizado 24 horas de incubação. $N=6$. $P<0,05$ ANOVA-Tukey.	57
Figura 13: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a produção de IFN- γ em sobrenadante de culturas esplênicas (ConA 24h) de camundongos BALB/c. A bactéria foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio foi realizado 24, 48 e 72 horas após infecção. $n=5$. $P<0,05$, Kruskal-Wallis não paramétrico ANOVA.	59
Figura 14: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a produção de IL-10 em sobrenadante de culturas esplênicas (ConA 24h) de camundongos BALB/c. A bactéria foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio foi realizado 24, 48 e 72 horas após infecção. ($n=5$. $P<0,05$, Kruskal-Wallis não paramétrico ANOVA).	61
Figura 15: Efeitos de diferentes doses do GTE sobre o número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) em Cultura Líquida de Longa Duração (LTBMC) de animais normais e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> . Os animais foram previamente tratados durante sete dias anteriores à inoculação da bactéria e o ensaio realizado 48h após a infecção. Os animais controle receberam apenas o veículo da droga. O ensaio de CFU-GM foi realizado a partir da 1ª semana após o repovoamento (5ª semana) ($n=3$, $p<0,05$, ANOVA – Tukey)	65
Figura 16: Mecanismo imunohematopoético do GTE	78

Lista de Tabelas

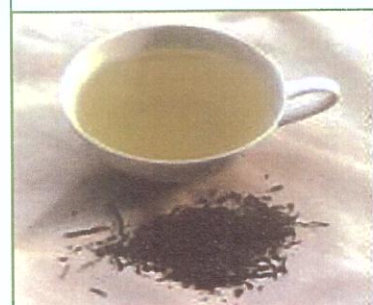
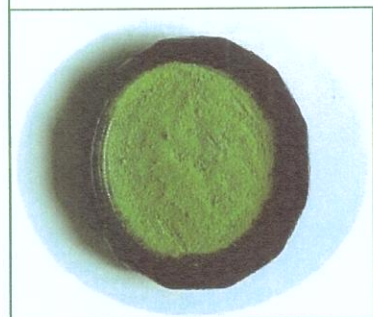
Tabela 1: Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) em presença de células de medula óssea de camundongos BALB/c.....	42
Tabela 2: Porcentagem de lise específica de células YAC-1 por células NK de camundongos tratados com GTE e infectados. Os animais foram tratados por sete dias consecutivos anteriores a inoculação da bactéria com diferentes doses de GTE (50, 100 e 250mg/Kg) e o ensaio foi realizado 48, 72 e 96h após a infecção.....	54
Tabela 3: Efeitos de diferentes doses do GTE sobre as células não-aderentes em Cultura Líquida de Longa Duração (LTBMC) de animais normais e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> . Os animais foram tratados previamente durante sete dias anteriores à inoculação da bactéria e o ensaio realizado 48h após a infecção. Resultados apresentados em Média $\pm$ SD.....	64
Tabela 4 Efeitos de diferentes doses do GTE sobre o número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) em Cultura Líquida de Longa Duração (LTBMC) de animais normais e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> . Os animais foram previamente tratados durante sete dias anteriores à inoculação da bactéria e o ensaio realizado 48h após a infecção. Os animais controle receberam apenas o veículo da droga. O ensaio de CFU-GM foi realizado a partir da 1ª semana após o repovoamento (5ª semana). Resultados apresentados em Média $\pm$ SD.....	64
Tabela 5: Efeitos de diferentes doses do GTE sobre as células aderentes (estroma medular) em Cultura Líquida de Longa Duração (LTBMC) de animais normais e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> . Os animais foram tratados previamente durante 7 dias anteriores à inoculação da bactéria e o ensaio realizado 48h após a infecção.....	66
Tabela 6: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c. <i>L. monocytogenes</i> foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e a avaliação hematopoética foi realizada 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.....	87
Tabela 7: Efeitos do tratamento com doses diárias de 100mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c. <i>L. monocytogenes</i> foi	

<i>inoculada 3 horas após o término do tratamento e a avaliação hematopoética foi realizada 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.</i>	<i>87</i>
<i>Tabela 8: Efeitos do tratamento com doses diárias de 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c. L. monocytogenes foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e a avaliação hematopoética foi realizada 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.</i>	<i>88</i>
<i>Tabela 9: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de camundongos BALB/c. L. monocytogenes foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e a avaliação hematopoética foi realizada 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.</i>	<i>88</i>
<i>Tabela 10: Efeitos do tratamento com doses diárias de 100mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de camundongos BALB/c. L. monocytogenes foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e a avaliação hematopoética foi realizada 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.</i>	<i>89</i>
<i>Tabela 11: Efeitos do tratamento com doses diárias de 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de camundongos BALB/c. L. monocytogenes foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e a avaliação hematopoética foi realizada 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.</i>	<i>89</i>
<i>Tabela 12: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o peso do baço de camundongos BALB/c. L. monocytogenes foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o peso do baço foi mensurado 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.</i>	<i>90</i>
<i>Tabela 13: Efeitos do tratamento com doses diárias de 100mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o peso do baço de camundongos BALB/c. L. monocytogenes foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o peso do baço foi mensurado 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.</i>	<i>90</i>

Tabela 14: Efeitos do tratamento com doses diárias de 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o peso do baço de camundongos BALB/c. <i>L. monocytogenes</i> foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o peso do baço foi mensurado 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. $P<0,05$ ANOVA-Tukey.	91
Tabela 15: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a produção de fatores estimuladores de colônias hematopoéticas (CSF) no soro de camundongos BALB/c. <i>L. monocytogenes</i> foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o soro foi obtido 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. $P<0,05$ ANOVA-Tukey.	91
Tabela 16: Efeitos do tratamento com doses diárias de 100mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a produção de fatores estimuladores de colônias hematopoéticas (CSF) no soro de camundongos BALB/c. <i>L. monocytogenes</i> foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o soro foi obtido 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. $P<0,05$ ANOVA-Tukey.	92
Tabela 17: Efeitos do tratamento com doses diárias de 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a produção de fatores estimuladores de colônias hematopoéticas (CSF) no soro de camundongos BALB/c. <i>L. monocytogenes</i> foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o soro foi obtido 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. $P<0,05$ ANOVA-Tukey.	92
Tabela 18: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a atividade lítica de células NK em camundongos BALB/c. <i>L. monocytogenes</i> foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio de citotoxicidade foi realizado 48 horas após infecção. n=6. $P<0,05$ ANOVA-Tukey.	93
Tabela 19: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a atividade lítica de células NK em camundongos BALB/c. <i>L. monocytogenes</i> foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio de citotoxicidade foi realizado 72 horas após infecção. n=6. $P<0,05$ ANOVA-Tukey.	93
Tabela 20: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a atividade lítica de células NK em camundongos BALB/c. <i>L. monocytogenes</i> foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio de citotoxicidade foi realizado 96 horas após infecção. n=6. $P<0,05$ ANOVA-Tukey.	94

Tabela 21: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/ animal, sobre a proliferação de linfócitos de camundongos BALB/c. <i>L. monocytogenes</i> foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio de proliferação foi realizado 24 horas após infecção. N=6. $P<0,05$ ANOVA-Tukey.....	94
Tabela 22: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/ animal, sobre a proliferação de linfócitos de camundongos BALB/c. <i>L. monocytogenes</i> foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio de proliferação foi realizado 48 horas após infecção. N=6. $P<0,05$ ANOVA-Tukey.....	95
Tabela 23: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/ animal, sobre a proliferação de linfócitos de camundongos BALB/c. <i>L. monocytogenes</i> foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio de proliferação foi realizado 72 horas após infecção. N=6. $P<0,05$ ANOVA-Tukey.....	95
Tabela 24: Efeitos do tratamento com doses diárias de 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a produção de IFN- γ em sobrenadante de culturas esplênicas (ConA 48h) de camundongos BALB/c. A <i>Listeria monocytogenes</i> foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio foi realizado 24, 48 e 72 horas após infecção. n=5. $P<0,05$, Kruskal-Wallis não paramétrico ANOVA.....	96
Tabela 25: Efeitos do tratamento com doses diárias de 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a produção de IL-10 em sobrenadante de culturas esplênicas (ConA 24h) de camundongos BALB/c. A <i>Listeria monocytogenes</i> foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio foi realizado 24, 48 e 72 horas após infecção. n=5. $P<0,05$, Kruskal-Wallis não paramétrico ANOVA.....	96
Tabela 26: Efeitos de diferentes doses do GTE sobre o número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) em Cultura Líquida de Longa Duração (LTBMC) de animais normais e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> . Os animais foram previamente tratados durante sete dias anteriores à inoculação da bactéria e o ensaio realizado 48h após a infecção. Os animais controle receberam apenas o veículo da droga. O ensaio de CFU-GM foi realizado a partir da 1ª semana após o repovoamento (5ª semana). (n=3, $p<0,05$, ANOVA – Tukey)	97
Tabela 27: Avaliação dos efeitos do tratamento com 50, 100, 250, 500 e 1000mg/Kg de GTE, administrado por sete dias consecutivos, anteriores à inoculação de 1×10^5 bac/animal na sobrevida	

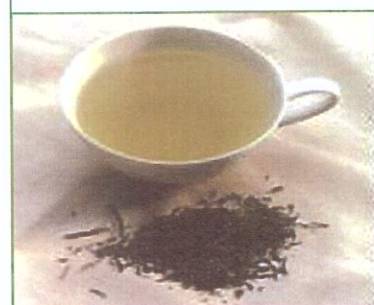
<i>de camundongos infectados com dose letal de L. monocytogenes. Curva de Kaplan-Maier, Log Rank, $P < 0,05$ em relação ao grupo infectado – (n=20/ por grupo).....</i>	<i>98</i>
---	-----------



Resumo

1. RESUMO

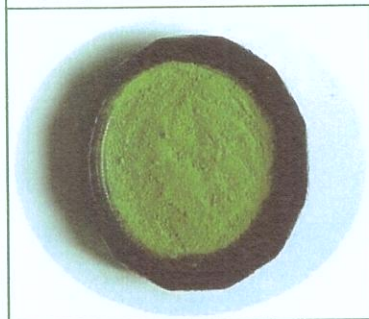
Esse trabalho investiga o efeito protetor do tratamento com diferentes doses (50, 100 e 250 mg/Kg) do extrato padronizado de Chá Verde (GTE) em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* (LM). A eficácia terapêutica foi avaliada para uma dose letal de LM por sete dias consecutivos com diferentes doses de GTE. A proteção significativa do extrato foi verificada durante a fase aguda da infecção e um mecanismo de ação foi proposto a partir da análise dos efeitos do GTE sobre o crescimento e a diferenciação de progenitores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea e do baço, sobre a atividade estimuladora de colônias (CSA) do soro, sobre a atividade lítica de células NK, sobre a proliferação de linfócitos e sobre a produção de citocinas de padrão Th1 (IFN- γ) / Th2 (IL-10) em animais normais e infectados com LM. Os resultados demonstraram que a resistência dos animais infectados com uma dose letal de LM tratados com GTE está relacionada com a modulação da mielossupressão e diminuição da hematopoese extramedular produzidas pela infecção. Também foi verificado um aumento da atividade lítica de células NK, da capacidade proliferativa de linfócitos e da polarização da resposta imunológica para Th1. O GTE não apresentou toxicidade sobre o estroma medular e estimulou a geração de progenitores para granulócitos-macrófagos em sistema de cultura líquida de longa duração (LTBMC). O mecanismo de ação da atividade imunomoduladora do GTE ainda não está completamente definido. No entanto, os mecanismos de ação apresentados neste trabalho são de fundamental importância para a atividade antibacteriana *in vivo* do GTE.



Abstract

2. ABSTRACT

In the present study we investigated the protective effects of the oral administration of Green tea (GTE) (50, 100 and 250mg/Kg) in mice infected with *Listeria monocytogenes* (LM). We demonstrated that GTE protects mice from a lethal dose of LM when administered prophylactically for seven consecutive days. To determine the mechanism of action of GTE, we examined the effect of GTE on the number of granulocyte and macrophage colony-forming units (CFU-GM) from bone marrow and spleen, on the colony-stimulating activity (CSA) of serum, on natural killer (NK) cell activity, on lymphocyte proliferation and on Th1/Th2-based cytokine production in normal and LM-infected mice. Myelosuppression and extramedular hematopoiesis/splenomegaly were the major features of LM infection, in association with NK cell activation and alteration of lymphocyte proliferation. The resistance of mice infected with a lethal dose of LM but treated prophylactically with 100 and 250mg/Kg of GTE could be related to the modulation of myelosuppression and extramedular hematopoiesis induced by the infection, and to an increase in NK cell activity, lymphocyte proliferation and polarization of the Th1-based immune response. The GTE extract was not toxic to either the stromal cell layer or to GM progenitors generated from long-term bone marrow culture (LTBMC). In this way, the mechanism of action through GTE exerts its pharmacological effect is not completely elucidated, although the parameters mentioned here are essential for its antibacterial effect *in vivo*.



Introdução

3. INTRODUÇÃO

3.1. Chá Verde (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze)

Estudos sobre fitoterápicos estão em franca expansão no Brasil e no mundo. Neste contexto, vários trabalhos têm sido publicados confirmando atividades farmacológicas de ervas de uso secular e empírico pela população. Além disso, muitos destes estudos fornecem evidências de que os fatores culturais, incluindo substâncias presentes na dieta, desempenham papel fundamental na prevenção de patologias (DUFRESNE e FARNWORTH, 2001).

A *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Figura 1) é uma planta da família das Theaceae que tem sido consumida como bebida há milhares de anos na China e Japão e cujas propriedades terapêuticas foram constatadas ao longo do tempo pela população. Tradicionalmente, a *C. sinensis* é utilizada na medicina oriental devido às suas propriedades “estimulantes, desintoxicantes, de ativação da circulação sangüínea e aumento de resistência às doenças” (DUFRESNE e FARNWORTH, 2001; YANG e WANG, 1993).



Figura 1: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze

De acordo com o tipo de tratamento que as folhas de *C. sinensis* passam durante o processo de fabricação podem ser obtidos vários tipos de chás, dentre os quais, os mais conhecidos são o *Chá Verde* (GTE) e o *Chá Preto* (KURODA e HARA, 1999). Ao contrário do *Chá Preto*, a produção do GTE não envolve oxidação das folhas de *C. sinensis*. Neste caso, ocorre um processo de inativação que impede a oxidação dos polifenóis, garantindo, dessa forma, que o GTE possua atividades biológicas mais pronunciadas do que o *Chá Preto* (DUFRESNE e FARNWORTH, 2000). Os polifenóis são os principais constituintes químicos da *C. sinensis*, dentre eles podemos destacar a catequina, epicatequina, epicatequina-galato e epigallocatequina-galato (ECG) (MIN e PEIGEN, 1991). Estudos recentes demonstram que os polifenóis apresentam atividade antibacteriana (DUFRESNE e FARNWORTH, 2000; SAKANAKA *et al.* 2000; YAM *et al.* 1997; HOBIRA *et al.* 1991; TODA *et al.* 1999; AMAROWICZ, PEGG e BAUTISTA, 2000; PILLAI *et al.* 2001), anti-tumoral (YANG e WANG, 1993; KENNEDY *et al.* 1999; KATIIYAR *et al.* 1999; GUPTA *et al.* 2000), antiviral (MITSCHER *et al.* 1997), antimutagênica (YANG e WANG, 1993; YEN e CHEN, 1995) e imunomoduladora (KATIIYAR *et al.* 1999; MATSUNAGA *et al.* 2001; MATSUNAGA *et al.* 2002; KAMATH *et al.* 2003; ZVETKOVA *et al.* 2001).

A atividade antimicrobiana *in vitro* do GTE é encontrada para bactérias Gram-positivas, Gram-negativas (DUFRESNE e FARNWORTH, 2001; DUFRESNE e FARNWORTH, 2000; SAKANAKA *et al.* 2000) e esporos bacterianos (PILLAI *et al.* 2001). É interessante ressaltar a habilidade do GTE de prevenir a resistência a antibióticos de certos patógenos (YAM *et al.* 1997). Segundo SATO e MIYATA (2000), o mecanismo bactericida do GTE ocorre pela interação direta das moléculas polifenólicas com a membrana bacteriana. A atividade antimutagênica do GTE é atribuída à propriedade dos polifenóis em interceptar agentes carcinogênicos e de reduzir espécies oxidantes antes que as mesmas provoquem danos ao DNA celular (YANG e WANG, 1993; YEN e CHEN, 1995). Em relação à atividade anti-tumoral, foi demonstrado que os polifenóis interferem no processo de tumorigênese diminuindo o número de grupos sulfidrilas em células tumorais¹³ ou pela indução do processo de apoptose (GUPTA *et al.* 2000).

MATSUNAGA *et al.* (2001), demonstraram que a epigallocatequina-galato (ECG) possui atividade imunomoduladora *in vitro* em modelo de infecção de macrófagos por *Legionella pneumophila*. Foi verificada uma inibição do crescimento desta bactéria no interior de macrófagos tratados com ECG. Os níveis de TNF- α , IFN- γ e IL-12 estavam aumentados nessas culturas, enquanto

que os de IL-10 diminuídos. O tratamento de macrófagos com ECG em presença de anti-TNF- α e anti-IFN- γ não inibiu o crescimento da bactéria. No entanto, na presença de anti-IL-10 e anti-IL-12, foi mantida a inibição do crescimento bacteriano pela ECG. Também foi observado um aumento de RNAm para IFN- γ nas culturas de macrófagos tratados com ECG. Dessa forma, a atividade imunomoduladora *in vitro* da ECG está relacionada com o aumento da produção de TNF- α e IFN- γ (MATSUNAGA *et al.* 2001). Adicionalmente, foi demonstrado que a ECG reverte a imunossupressão induzida pelo tabaco em culturas de macrófagos humanos infectados por *L. pneumophila* através de um aumento na atividade dessas células frente à bactéria, além de estimular a secreção de certas citocinas de padrão Th1, tais com TNF- α , IL-12 e diminuição de IL-10 (MATSUNAGA *et al.* 2002).

KAMATH *et al.* (2003) demonstraram que a presença do antígeno L-teanina nas preparações com *C. sinensis* ativa LT $\gamma\delta$ *in vitro* e *in vivo*. Dessa forma, foi verificado que o consumo de GTE pode gerar memória nestas células e induzir uma maior avidez desses linfócitos frente a algumas bactérias com a *M. morgani*, *E. coli*, *S. typhi*, dentre outras. Além disso, foi detectado um aumento da produção de citocinas, tais como, IFN- γ e IL-12.

ZVETKOVA *et al.* (2001), demonstraram que o GTE possui papel imunomodulador através de um aumento na secreção de neopterina em cultura de células mononucleares, indicando uma ativação de imunidade celular mediada por células.

KATTIYAR *et al.* (1999), utilizaram o modelo de fotocarcinogênese para demonstrar que o tratamento prévio de camundongos com ECG inibe a imunossupressão induzida pelo tumor através da redução do número de células CD11b⁺ nas lesões inflamatórias, dos níveis de IL-10 na pele e linfonodo drenante e do aumento de IL-12 no linfonodo drenante dos animais.

3.2. Modelo experimental de infecção por *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* (Figura 2) é um cocobacilo gram-positivo, pertencente a um grupo de microorganismos de ação intracitoplasmática, anaeróbia facultativa, comumente, encontrada no meio ambiente e algumas vezes de forma assintomática no intestino humano (McLAUHLIN, 1993). Em indivíduos imunocomprometidos, a *Listeria* pode causar septicemia, meningite, encefalite e infecções em mulheres grávidas que pode resultar em aborto. A contaminação de indivíduos normais geralmente ocorre pela ingestão de alimentos e produz efeitos gastrintestinais brandos, tais como, náuseas, vômitos e diarreia (McLAUHLIN, 1993).

A listeriose murina é um modelo experimental bastante utilizado para o estudo da resposta imunológica de tipo celular permitindo o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas que visam reduzir as imunopatologias mediadas por células T, sem interferir com a resistência inata, prevenção e cura por estas mesmas células.

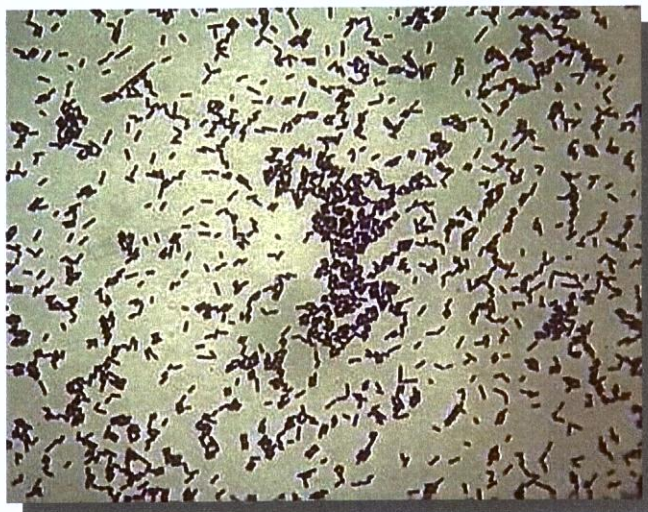


Figura 2: *Listeria monocytogenes*, coloração de Gram, demonstrando bacilo Gram positivo

O processo de resistência do hospedeiro à *L. monocytogenes* envolve diferentes mecanismos. A resposta inespecífica de fagócitos que se alojam rapidamente no sítio de proliferação da bactéria é essencial para o controle inicial do crescimento bacteriano (McLAUCHLIN, 1996; BRAUN e COSSART, 2000). Os macrófagos infectados nos momentos iniciais da infecção liberam algumas citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, TNF- α e IL-12 que estimulam as células NK a secretarem IFN- γ (ROGERS *et al.* 1992; CHEERS *et al.* 1988) e desenvolverem sua atividade citotóxica (COSSART e BIERNE, 2001). Altas concentrações de IFN- γ promovem a ativação do macrófago aumentando suas propriedades antimicrobianas (BECKERMAN, K. P., *et al.* 1993; BUCHMEIER e SCHEREIBER, 1985) e conduzindo a uma maior expressão das moléculas da classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC classe II). A destruição intracelular da *Listeria* pelo macrófago ativado (*Figura 3*), associada ao aumento de expressão da MHC-II, facilita a apresentação deste complexo a um segundo sistema de defesa do organismo, que atuará na erradicação da infecção, através da indução de células T CD4⁺ e CD8⁺ (MIELKE, EHLERS e HAHN, 1993; ROGERS *et al.* 1994; TRINCHIERI, 1993) específicas para o microorganismo (MOMBAERTS *et al.* 1993).

Recentemente foi demonstrado a participação dos neutrófilos na fase aguda inespecífica da resistência à listeriose, assim como a capacidade dessas células de sintetizar e liberar citocinas (McLAUCHLIN, 1996; CONLAN e NORTH, 1991; CONLAN e NORTH, 1994; CZUPRYNSKI *et al.* 1994). A utilização de anticorpos específicos contra neutrófilos *in vivo* reduz de forma significativa a sobrevivência de camundongos infectados (CZUPRYNSKI *et al.* 1994). As células fagocitárias são originadas das células primitivas pluripotenciais da medula óssea ou células-tronco hematopoéticas. Em animais resistentes à *Listeria monocytogenes*, o número de precursores hematopoéticos na medula óssea é geneticamente maior que em linhagens susceptíveis como o BALB/c. Esta característica parece ser determinante na resistência à listeriose. Nas linhagens resistentes é observado ainda um aumento de monócitos no sangue periférico associado a um menor crescimento bacteriano no baço e fígado. Estas características indicam que a pronta mobilização de granulócitos-macrófagos para estes locais de replicação da bactéria é importante para o controle da infecção em seus momentos iniciais.

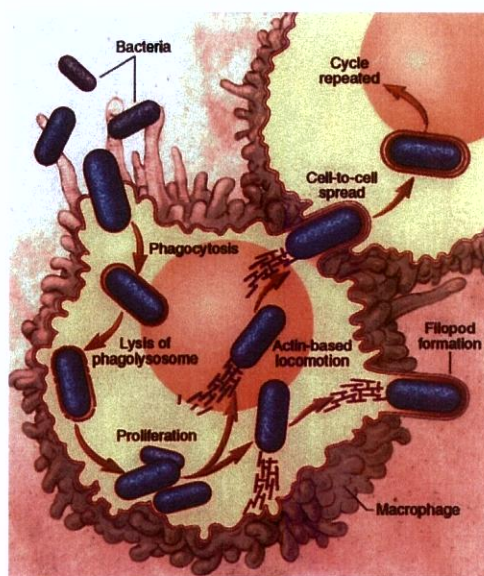


Figura 3: Mecanismo de disseminação da *L. monocytogenes*.

No entanto, a resposta inata que ocorre nos estágios iniciais da infecção envolvendo neutrófilos, macrófagos e células NK não é suficiente para erradicar a infecção no baço e na cavidade peritoneal de camundongos (CONLAN e NORTH, 1991). As células T ($CD4^{+}\alpha/\beta$, $CD8^{+}\alpha/\beta$ e células T γ/δ), são necessárias para a secreção de citocinas estimuladoras do macrófago, especialmente o IFN- γ (KAUFMANN, 1993). Os clones de linfócitos T $CD4^{+}\alpha/\beta$ reconhecem peptídeos da *Listeria* após

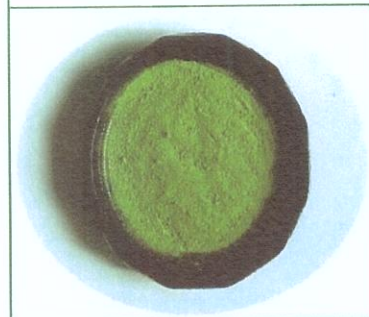
interação como uma célula apresentadora de antígeno (APC) apropriada. Quando esses clones são ativados, apresentam a característica de produzir grandes quantidades de IL-12 e IFN- γ , polarizando a resposta imune para Th1 (KAUFMANN *et al.* 1993). As células T CD8 $^{+}$ α/β , participam mais pronunciadamente em infecções secundárias por *Listeria*, entretanto, sabemos que essas células secretam IFN- γ *in vitro* na presença de *L. monocytogenes* (KAUFMANN e DELIBERO, 1986; EDELSON e UNANUE, 2000) e são responsáveis pela lise dos hepatócitos infectados pela ação de grânulos citotóxicos ou por desencadear apoptose por mecanismo de Fas-L/Fas (WING e GREGORY, 2000). Os linfócitos T γ/δ podem induzir polarização para Th1 e Th2 dependendo do organismo infectante, no caso da *Listeria* estimulam a produção de IFN- γ (FERRICK *et al.* 1995).

O IFN- γ possui papel fundamental na listeriose (BRAUN e COSSART, 2000; CHEERS *et al.* 1988; BECKERMAN, K. P., *et al.* 1993; BUCHMEIER e SCHEREIBER, 1985; MIELKE, EHLERS e HAHN, 1993; ROGERS *et al.* 1994; TRINCHIERI, 1993). Embora existam indícios que as células NK sejam as principais produtoras de IFN- γ , a produção de IFN- γ também está relacionada com os linfócitos T γ/δ . Dessa forma, o IFN- γ é secretado no mínimo por duas populações de células T (LT γ/δ e LTh1). Essa característica garante o desenvolvimento e a manutenção da resposta do tipo Th1 na listeriose (FARGEAS *et al.* 1992)

Outras citocinas como a IL-4 (IZAWA, BROWN e CZUPRYNSKI, 1992; WOOD, MAROUSHEK e CZUPRYNSKI, 1993) e IL-10 (FLESCHE e KAUFMANN, 1994) apresentam um papel supressor nos estágios iniciais da listeriose. ISAWA e CZUPRYNSKI, (1992) e ISAWA *et al.* (1993) demonstraram que a administração de anticorpo monoclonal anti-IL-4 antes da infecção produz um aumento da resistência dos animais tratados. No entanto, não existe nenhum efeito significativo nos níveis de bactérias no baço e fígado destes animais quando tratados com IL-4 recombinante no início da infecção. O tratamento com IL-10 provoca diminuição da função fagocítica que tem como consequência a disseminação da infecção e morte mesmo em presença de microabcesso. Dessa forma, o tratamento de animais com anticorpos monoclonais específicos para IL-10 nos primeiros 5 dias de infecção aumenta a resistência do animal. Entretanto, em estágios mais avançados da doença este tratamento parece reduzir o *clearance* da bactéria, sugerindo uma ação mais complexa da IL-10 sobre macrófagos (WOOD, MAROUSHEK e CZUPRYNSKI, 1993; FLESCHE e KAUFMANN, 1994).

O modelo de listeriose experimental envolve vários mecanismos imunohematopoéticos que constituem alvos atrativos para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, descrição e avaliação do mecanismo de ação do GTE.

Neste trabalho, investigamos o efeito modulador imunohematopoético *in vivo* do extrato padronizado de GTE no modelo de listeriose murina. Inicialmente, avaliamos a eficácia terapêutica do GTE frente à uma dose letal de *Listeria monocytogenes*. Verificamos proteção significativa do GTE durante a fase aguda da infecção e decidimos elucidar o mecanismo de ação responsável por esta proteção. Os efeitos do GTE sobre o crescimento e a diferenciação de progenitores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea e do baço, a atividade estimuladora de colônias (CSA) do soro, a atividade lítica de células NK, a proliferação de linfócitos e a produção de citocinas de padrão Th1 (IFN- γ) / Th2 (IL-10) em animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes* foram avaliados e discutidos.

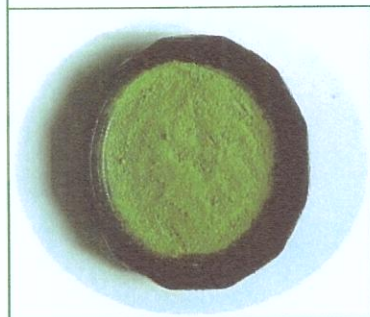


Objetivos

4. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar os efeitos do GTE sobre a resposta imunohematopoética de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*. Os parâmetros avaliados foram:

- ❧ Resistência de animais infectados com dose letal da bactéria e tratados com diferentes doses do extrato;
- ❧ Determinação das doses de eficácia terapêutica em camundongos;
- ❧ Crescimento e diferenciação dos precursores hematopoéticos da medula óssea e do baço de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes*;
- ❧ Produção de fatores estimuladores de colônias de células hematopoéticas;
- ❧ Atividade das células NK em camundongos normais e infectados com *L. monocytogenes*;
- ❧ Proliferação de linfócitos em camundongos normais e infectados com *L. monocytogenes*;
- ❧ Produção de citocinas de padrão Th1 (IFN- γ) e Th2 (IL-10);
- ❧ Efeito do GTE sobre o estroma medular e sobre a capacidade de diferenciação de progenitores para granulócitos e macrófagos gerados em sistema de cultura líquida de longa duração (LTBMC) de animais normais e infectados com *L. monocytogenes*.



Material e Métodos

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais e Tratamento

Para a realização dos experimentos utilizamos camundongos BALB/c machos, com idade entre 6 e 8 semanas, fornecidos pelo Biotério Central (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram divididos em grupos (n=6) e submetidos ao tratamento de acordo com o protocolo experimental, a saber:

- a) animais controle negativo, não infectados, sem tratamento;
- b) animais controle positivo, infectados com *L. monocytogenes*, sem tratamento;
- c) animais não infectados e tratados com GTE;
- d) animais infectados com *L. monocytogenes*, tratados com diferentes doses de GTE.

As doses utilizadas em todos os experimentos de avaliação imunohematopoética foram 50, 100 e 250mg/Kg determinadas pelo experimento para verificação dos efeitos do GTE sobre a resistência de animais a uma dose letal de bactéria descrita no item 5.11. A administração do GTE foi realizada por gavagem, utilizando-se água estéril como veículo de administração. O tratamento com GTE foi realizado por sete dias consecutivos, anteriores à inoculação da bactéria e os animais sacrificados 24h, 48h e 72h após a infecção. No entanto, considerando a aparência mais tardia da resposta NK, utilizamos os períodos de 48h, 72h e 96h após infecção para a avaliação desta resposta. Os animais controle, não infectados, receberam somente veículo.

5.2. Extrato Padronizado da planta *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Chá Verde)

O extrato padronizado da planta *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Chá Verde) (54,2% de polifenóis) foi fornecido pela Galena Química e Farmacêutica LTDA (Brasil).

Especificações do extrato: O produto foi preparado a partir das folhas secas de *Camellia sinensis*, utilizando-se uma mistura de etanol/água como solvente extrator. Trata-se de um pó marrom, de odor e sabor característico e higroscópico. O doseamento dos princípios ativos demonstrou a presença de 54,2% de polifenóis. Não há adição de excipientes.

5.3. *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é um cocobacilo gram-positivo, anaeróbio facultativo, móvel por flagelos peritríquios a temperatura ambiente, facilmente cultivável em ágar-sangue (Figura 4). Foi mantida em nosso laboratório através de repasses semanais em meio BHI. Para a manutenção da virulência desta bactéria, a mesma foi periodicamente repassada em camundongos, através da inoculação intraperitoneal em solução salina 0,85%.

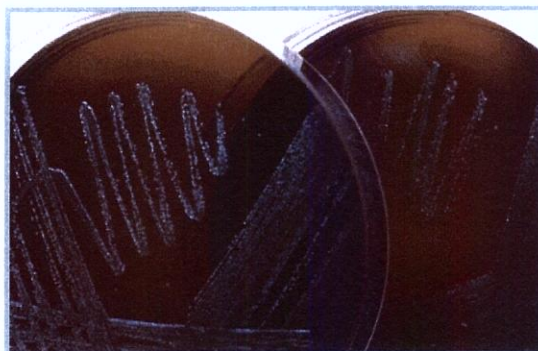


Figura 4: Aspecto morfológico das colônias de *L. monocytogenes*.

As doses da bactéria utilizadas nos experimentos foram previamente determinadas em nosso laboratório em estudos anteriores e confirmadas em nossos estudos. Dessa forma, utilizamos como dose subletal 1×10^3 bactérias/animal para avaliação dos parâmetros imunológicos e hematopoéticos e como dose letal 1×10^5 bactérias/animal para avaliação da sobrevivência, ambas inoculadas intraperitonealmente.

5.4. Cultura clonal de precursores hematopoéticos da medula óssea e baço de camundongos (CFU-C)

5.4.1. Remoção da medula óssea dos animais

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. A assepsia foi realizada com álcool a 70% e após incisão, expõe-se o fêmur do animal. Cortou-se a cartilagem sobre o orifício da extremidade distal e o osso na junção superior.

Transferiu-se a medula óssea, com auxílio de uma agulha contendo 1mL de meio RPMI-1640 (Cultilab) e seringa, para um tubo estéril contendo 4 mL de meio RPMI-1640 (Cultilab).

Contou-se o número de células da suspensão obtida com o auxílio de uma câmara hematocitométrica após diluição (1:10) das células em solução de azul de tripan 0,4%. Ajustou-se a concentração da suspensão celular para 1×10^5 células/mL.

5.4.2. Remoção do Baço dos animais

Realizou-se uma pequena incisão na região lateral esquerda da cavidade peritoneal e removeu-se o baço com auxílio de uma pinça, sendo em seguida lavado com meio RPMI-1640 (Cultilab). Posteriormente, transferiu-se o órgão para um tubo contendo 9 mL de meio RPMI-1640 (Cultilab). Em seguida, macerou-se o baço dos animais, contou-se o número das células em suspensão e ajustou-se a concentração para 2×10^5 células/mL.

5.4.3. Preparo das placas de cultura da medula óssea e baço em meio semi-sólido

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

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

Em seguida, adicionou-se ao meio descrito acima, o volume apropriado de células (1×10^5 células/mL para medula e 2×10^5 células/mL para o baço) e distribuiu-se volumes de 2 mL em cada placa de petri (35 mm), já contendo 100 μ L do estímulo apropriado (SCM). Incubou-se por sete dias a 37°C em presença de 5% de CO₂. Após este período, contou-se o número de colônias em microscópio de dissecação, usando-se aumento de 40 vezes. Para o estudo morfológico, as colônias foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (v/v) e coradas com Luxol Fast Blue/Leishman.

5.5. Preparo do meio condicionado de células esplênicas (SCM)

Baços de camundongos BALB/c foram removidos em condições assépticas e passados em peneira de aço inoxidável estéril. Preparou-se uma suspensão contendo 2×10^6 células/mL em meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co, USA) contendo 10% de soro fetal bovino inativado (30 minutos a 56°C). Adicionou-se ao meio 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol (concentração final) e 1,65 μ g/mL de "pokeweed mitogen". Incubou-se por sete dias a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO₂ no ar. Centrifugou-se o sobrenadante e filtrou-se em membrana de 0,45 μ m (MilliporeTM).

A atividade funcional do SCM foi determinada pelo estímulo produzido sobre o crescimento clonal de células progenitoras hematopoéticas normais em meio semi-sólido.

5.6. Obtenção do soro dos animais para detecção de atividade estimuladora de colônias hematopoéticas (CSA)

O sangue dos animais dos grupos experimentais foi obtido por punção cardíaca, sendo separado em “pools”, centrifugado para obtenção do soro e armazenado a -20°C . A presença de fatores estimuladores de colônias no soro dos animais 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 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 é considerada como 1 unidade de CSF.

5.7. Avaliação das células “Natural Killer” (NK)

5.7.1. Manutenção e preparo das células alvo

Para o ensaio de atividade das células Natural Killer (NK), as células alvo utilizadas pertencem a linhagem tumoral YAC-1, linfoma de célula T originário A/SN induzido pelo vírus *Maloney*. Esta linhagem celular cresce em suspensão e foi mantida em cultura contínua *in vitro* em meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), em estufa úmida a 37°C e 5% de CO_2 .

Em relação ao ensaio de citotoxicidade, 5×10^6 células alvo foram lavadas duas vezes com meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% SBF e ressuspensas em 0,2 mL de SBF. Em seguida, as mesmas foram marcadas com 100 μCi de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ por um período de 90 minutos a 37°C sob agitação periódica. Novamente, lavou-se e ressuspendeu-se as células em meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% de SBF e ajustou-se a concentração de 1×10^5 células por mL.

5.7.2. Células efectoras esplênicas

Quarenta e oito (48h), setenta e duas (72h) e noventa e seis horas (96h) após a inoculação de dose subletal de *L. monocytogenes*, baços de camundongos foram coletados assepticamente e homogeneizados utilizando-se meio RPMI-1640. As células mononucleares foram separadas em gradiente Ficoll-hypaque ($d=1,089$), lavadas e ressuspensas em 10mL de meio RPMI-1640 completo

suplementado com 10% de SBF e incubadas em placa de petri de plástico (100x20mm) por 2h em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, as células não aderentes (sobrenadante) foram cuidadosamente aspiradas da placa, lavadas e ressuspensas em 10 mL de meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% de SBF, ajustando-se posteriormente a concentração para 5 x 10⁶ células/mL. A atividade citotóxica das células NK foi avaliada contra as células alvo YAC-1 em ensaio de liberação de Cr⁵¹.

5.7.3. Ensaio de liberação de ⁵¹Cr

Em microplacas de cultura (Corning – 96 wells) foram adicionados 100 µL da suspensão de células efectoras, efetuando-se diluições seriadas em triplicatas, com reserva de três orifícios para a lise espontânea (100 µL de SBF ou meio de cultura) e três orifícios para lise máxima (100 µL de Extran). Na sequência, a placa foi incubada por 4h em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após este período a placa foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm e 100 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos plásticos. A leitura foi realizada em contador gama e os resultados expressos em porcentagem de lise específica.

$$\text{Porcentagem de lise específica} = \text{lise teste} - \text{lise espontânea} / \text{lise máxima} - \text{lise espontânea} \times 100$$

5.8. Capacidade Proliferativa de Linfócitos

A capacidade proliferativa de linfócitos avalia as propriedades funcionais dos linfócitos de acordo com a sua resposta *in vitro* a mitógenos, como a Concanavalina A (Con A) (Sigma Chemical Co, USA) através do método de redução do tetrazolium.

Obtenção das células mononucleares do baço: Os baços dos animais foram coletados assepticamente e colocados em tubos do tipo Falcon (15 mL) contendo meio RPMI 1640 (Cultilab). As células foram liberadas cuidadosamente com auxílio de um macerador, e as hemácias foram lisadas adicionando-se tampão de lise (NH₄Cl 0,85% - Tris 15mM, pH 7,2) ao botão celular previamente concentrado. Após 3 lavagens com meio RPMI, as células foram ajustadas a uma concentração de 1x10⁶ 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).

Transformação blástica de linfócitos: Nos orifícios da placa de microcultura de 96 orifícios foram adicionados 200 μ L da suspensão celular enriquecida com 5% de SBF e 10 μ L de solução de Con A (concentração final de 2,5 μ g/mL). Concomitantemente, foram incubadas células de cada amostra sem a presença de Con A. O ensaio foi realizado em triplicata para cada animal. As placas foram mantidas 72 horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, a solução de MTT (Kit – Boehringer Mannheim) foi adicionada e a placa de cultura incubada por mais 4 horas. Logo após, adicionou-se DMSO para a solubilização dos cristais de *formazam* precipitados e efetuou-se a leitura em ELISA a 570 nm.

5.9. Cultura líquida de longa duração (LTBMC):

O objetivo deste experimento foi avaliar os efeitos do GTE sobre o estroma medular e sobre a diferenciação de progenitores para granulócitos e macrófagos gerados em sistema de cultura líquida de longa duração (LTBMC). Para isto, camundongos BALB/c foram tratados com as doses de 50, 100 e 250 mg/Kg por sete dias consecutivos, anteriores à inoculação da bactéria e sacrificados 48h após a infecção. As células hematopoéticas e estromais (aproximadamente 10⁷ células/mL) foram removidas e transferidas com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo 10 mL de RPMI-1640 (Sigma) completo, o qual continha: 20% de soro equino (Sigma) e 1% de uma solução de hidrocortisona (10⁻⁴ M) (concentração final de células 10⁶ células/mL). Esta suspensão de células foi transferida para garrafas de cultura (9 garrafas de 10 mL/grupo) por 3 semanas a 37 °C na presença de 5% de CO₂. Uma vez por semana estas células foram alimentadas através da remoção de 50% do meio saturado e adição do mesmo volume de meio RPMI completo. Como grupo controle tivemos culturas com animais normais sem tratamento, animais normais apenas tratados e animais apenas infectados com dose subletal de *L. monocytogenes*.

Na quarta semana (tempo necessário para confluência das células do estroma), ao fazer a troca do meio, as culturas foram repovoadas com células de medula óssea de animais que passaram pelo mesmo tratamento da carga inicial (aproximadamente 10⁷ células por mL). Este repovoamento celular é necessário para que as células hematopoéticas mais imaturas possam agora se alojar na capa de células aderentes e iniciar a hematopoese *in vitro*.

A partir da quinta semana foram iniciados os ensaios de CFU-C e a contagem da celularidade do sobrenadante destas culturas. A cada sete dias, foram coletados 5mL do meio de

cultura. Este volume foi centrifugado (10 minutos/1500 rpm), e o “pellet” ressuspensão em 2mL de meio RPMI. Após a contagem do número de células viáveis em câmara hemocitométrica, estas foram então submetidas ao mesmo protocolo de cultura clonal de precursores hematopoéticos descrito anteriormente (CFU-C).

Adicionalmente, no final do experimento (9ª semana) as células aderentes das culturas foram tratadas com tripsina 0,25% e analisadas em câmara hemocitométrica.

5.10. Dosagem de citocinas

As concentrações de IFN- γ e IL-10 foram dosadas no sobrenadante de culturas de células esplênicas através do método imunoenzimático (ELISA) utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para cada citocina.

Baços de camundongos foram coletados assepticamente e homogeneizados em meio RPMI-1640 (Cultilab), 24, 48 e 72h após a inoculação da bactéria. Células mononucleares foram obtidas adicionando-se tampão de lise ao botão celular previamente concentrado. Após lavagem, ajustou-se a concentração para 1×10^6 células/mL em meio RPMI suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF).

Em placa de cultura de 24 poços (Corning) foi adicionado 800 μ L de meio RPMI enriquecido com 5% de SBF, 200 μ L de suspensão celular e 50 μ L de solução de Con A (15 μ g/mL) em cada poço. Simultaneamente, incubou-se células de cada amostra sem Con A. As placas foram incubadas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 h, foi coletado o sobrenadante do orifício correspondente a amostra sem Con A (controle). Após 48 h de incubação, foram coletados os sobrenadantes para a dosagem das citocinas (IFN- γ e IL10).

Nos orifícios de uma placa de microcultura para ELISA (“*maxi sorp*” 96 wells) foram adicionados 100 μ L do anticorpo monoclonal de captura anti-citocina (0,5-4 μ g/mL). A placa protegida adequadamente foi incubada por 12 horas a 4°C. Após este período os orifícios foram lavados duas vezes com solução PBS/ Tween (0,5 mL de Tween-20 em 1L de PBS). Na sequência, 200 μ L de PBS contendo 10% de SBF foram adicionados para cada orifício e a placa foi mantida a temperatura ambiente por 2h. Lavou-se novamente duas vezes com solução PBS/Tween.

As amostras (sobrenadantes provenientes da cultura) e os padrões (anticorpos monoclonais recombinantes diluídos em PBS suplementado com 10% de SBF) foram adicionados a um volume de 100 μ L por orifício e a placa foi incubada por 12 horas, a temperatura ambiente. Após este período, lavou-se a placa de cultura quatro vezes utilizando-se solução PBS/Tween.

O anticorpo monoclonal de detecção anti-citocinas (biotinilado) 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 a temperatura ambiente por 45 minutos e em seguida lavou-se seis vezes com solução PBS/Tween.

Adicionou-se 100 μ L 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 a temperatura ambiente e lavou-se oito vezes com solução PBS/Tween.

Nesta etapa o substrato foi preparado adicionando-se 10 μ L de H₂O₂ 30% e um comprimido de OPD (diidrocloreto de o-fenilenodiamina) a 10mL de tampão citrato, pH 5,6. Adicionou-se 100 μ L do substrato por orifício e deixou-se desenvolver a cor por um período de 10-80 minutos, a temperatura ambiente. A reação pôde ser interrompida adicionando-se 20 μ L de H₂SO₄ 4 N em cada orifício. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (λ = 492nm).

5.11. Realização da curva de sobrevida

Com a finalidade de avaliar os efeitos da administração do extrato de GTE na resistência dos animais infectados com dose letal de *Listeria monocytogenes*, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (n=20), a saber:

- a) animais controle infectados com *L. monocytogenes*, sem tratamento;
- b) animais infectados com *L. monocytogenes*, tratados com GTE 50 mg/Kg;
- c) animais infectados com *L. monocytogenes*, tratados com GTE 100 mg/Kg;
- d) animais infectados com *L. monocytogenes*, tratados com GTE 250 mg/Kg;
- e) animais infectados com *L. monocytogenes*, tratados com GTE 500 mg/Kg;
- f) animais infectados com *L. monocytogenes*, tratados com GTE 1000 mg/Kg.

Os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose letal (1×10^5 bactérias/animal) de *Listeria monocytogenes* e observados por 30 dias. A administração do GTE foi realizada por

gavagem nas doses de 50, 100, 250, 500 e 1000mg/Kg, utilizando-se água estéril como veículo de administração, por um período de sete dias consecutivos prévios à administração da bactéria. Os animais controle receberam somente água estéril durante os dias de tratamento.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A **Análise de Variância** foi utilizada para avaliar as seguintes variáveis:

- a) CFU-C do fêmur e baço;
- b) Fatores estimuladores de colônias;
- c) Peso do baço;
- d) Atividade de células "NK".

O **Teste de Tukey** foi utilizado caso a análise de variância detecte diferenças significativas entre os grupos.

A curva de sobrevida foi representada pelo método descrito por KAPLAN-MAIER, (1958) (COLLET, 1994). A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de **Log-rank** (procedimentos não paramétricos).

Com relação de dosagem de citocinas, foi utilizado o teste de **Kruskal-Wallis** não paramétrico-ANOVA para análise dos resultados.

Os gráficos apresentam as médias e desvio-padrões dos diferentes grupos. Consideramos estatisticamente significativos os valores de P que foram $\leq 0,05$.



Resultados

7. RESULTADOS

7.1. Produção e titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM)

A Figura 5 ilustra a titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM), produzido segundo técnica descrita no item 4.5. Podemos observar que a resposta supramáxima, ou seja, aquela que permite que todas as células multipotenciais presentes na cultura sejam induzidas à proliferar, foi obtida com diluições de até 1:4 do concentrado de SCM. Dessa forma, escolhemos a diluição de 1:4 para a utilização desse lote de SCM.

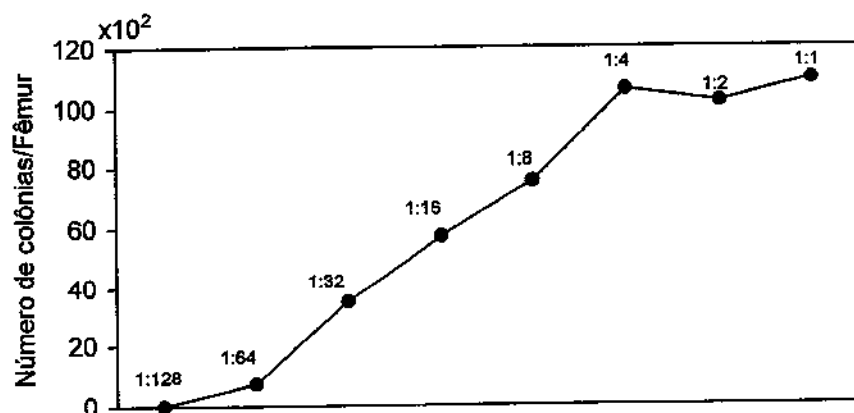


Figura 5: Titulação do meio condicionado de células esplênicas.

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

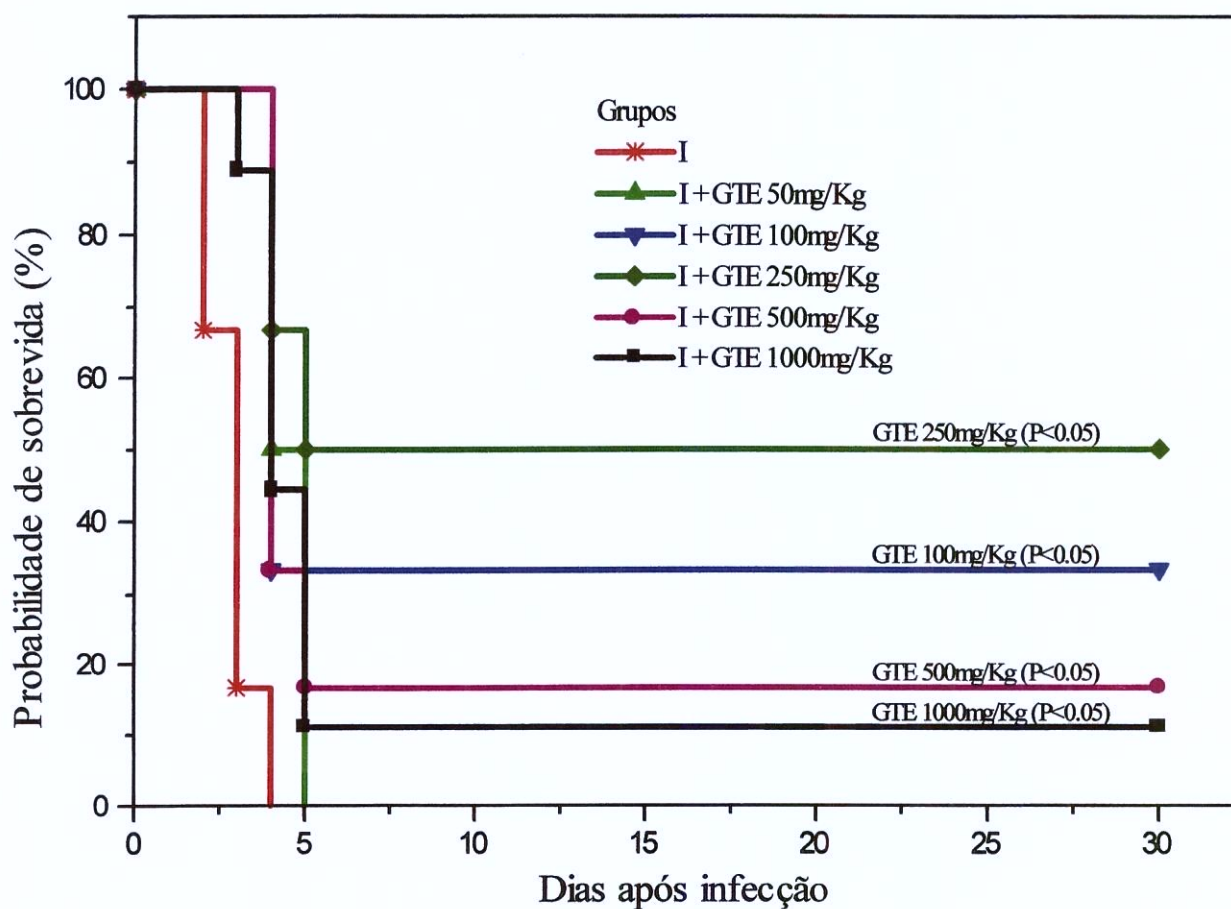
Diluição SCM	CFU-C x 10 ² *
1:1	108,2 ± 4,2
1:2	101 ± 3,5
1:4	103,6 ± 5,1
1:8	74,6 ± 4,2
1:16	54,6 ± 4,0
1:32	33,2 ± 3,0
1:64	7,62 ± 1,2
1:128	0

* Número total de colônias por fêmur
Resultados obtidos em duplicata por diluição (Média ± SD)

7.2. Avaliação da sobrevivência de animais infectados com dose letal de *L. monocytogenes* e tratados com diferentes doses de GTE

A figura 6 apresenta a atividade protetora das doses de 50, 100, 250, 500 e 1000mg/Kg de GTE em animais infectados com dose letal de *L. monocytogenes*. Podemos observar que todos os animais infectados morreram até o quarto dia de infecção. O tratamento prévio com as doses de 100 e 250 mg/Kg de GTE aumentou a resistência dos animais à *Listeria monocytogenes* em 33% e 50%, respectivamente ($P < 0,05$). Uma interessante relação dose-resposta foi observada com as doses de 500 e 1000 mg/Kg de GTE. Essas doses promoveram uma redução significativa na atividade antibacteriana do GTE quando comparadas com as doses de 100 e 250 mg/Kg. Esta redução ocorreu devido aos efeitos tóxicos evidenciados pela agitação motora e agressividade nos animais, típicos de drogas estimulantes como a cafeína cuja presença foi evidenciada no extrato de GTE utilizado. Por outro lado, com a dose de 50 mg/Kg não observamos nenhum efeito protetor do GTE. Dessa forma, escolhemos as doses de 50, 100 e 250mg/Kg para a realização do estudo dos parâmetros imunológicos e hematopoéticos propostos.

Figura 6: Avaliação dos efeitos do tratamento com 50, 100, 250, 500 e 1000 mg/Kg de GTE, administrado por sete dias consecutivos, anteriores à inoculação de 1×10^5 bac/animal na sobrevida de camundongos infectados com dose letal de *L. monocytogenes*. Curva de Kaplan-Maier, Log Rank, $P < 0,05$ em relação ao grupo infectado (n=20/por grupo).

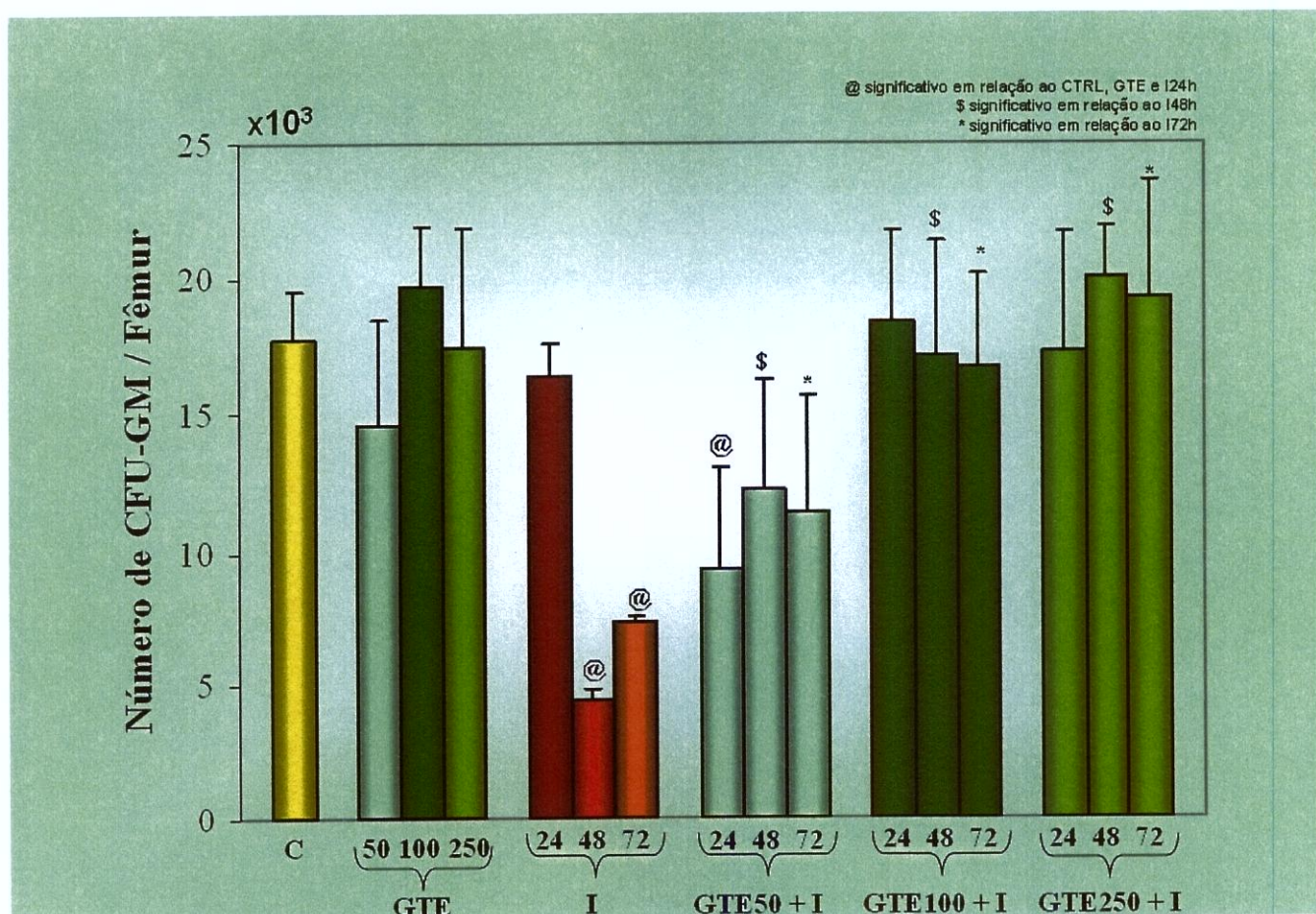


7.3. Avaliação dos efeitos de diferentes doses de GTE sobre o crescimento e a diferenciação dos precursores hematopoéticos (CFU-GM) da medula óssea de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes*

A Figura 7 ilustra os efeitos do tratamento com as doses de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE sobre o número de CFU-GM da medula óssea de animais normais e infectados com *L. monocytogenes*. Em animais normais, o tratamento com as três doses estudadas (50, 100 e 250mg/Kg) não provocou alteração significativa no número de CFU-GM na medula óssea.

De acordo com observações anteriores feitas em nosso laboratório (QUEIROZ *et al.* 2003; MIRANDOLA, JUSTO e QUEIROZ, 2002; VALADARES e QUEIROZ, 2002; QUEIROZ, JUSTO, VALADARES e PEREIRA-DA-SILVA, 2001; JUSTO, SILVA e QUEIROZ, 2003), verificamos que nos animais infectados ocorre uma profunda mielossupressão nas primeiras 48 e 72h após a administração da bactéria (em relação ao grupo controle, $n=6$, $p<0,05$ - ANOVA, Tukey). O tratamento prévio desses animais com as doses de 100 e 250mg/Kg de GTE manteve o número de CFU-GM na medula óssea nos patamares do grupo controle ($n=6$, $p<0,05$ - ANOVA, Tukey). Por outro lado, a dose de 50mg/Kg, embora tenha produzido recuperação do número de CFU-GM em relação ao grupo infectado, este aumento não atingiu os níveis apresentados pelos animais controle ($n=6$, $p<0,05$ - ANOVA, Tukey).

Figura 7: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250 mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c. A bactéria foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e a avaliação hematopoética foi realizada 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey (Média $\pm$ SD).



C: controle

GTE: tratados com GTE (50, 100 e 250mg/Kg) durante 07 dias

I: infectados

GTE50 + I: tratados com GTE (50mg/Kg) e infectados

GTE100 + I: tratados com GTE (100mg/Kg) e infectados

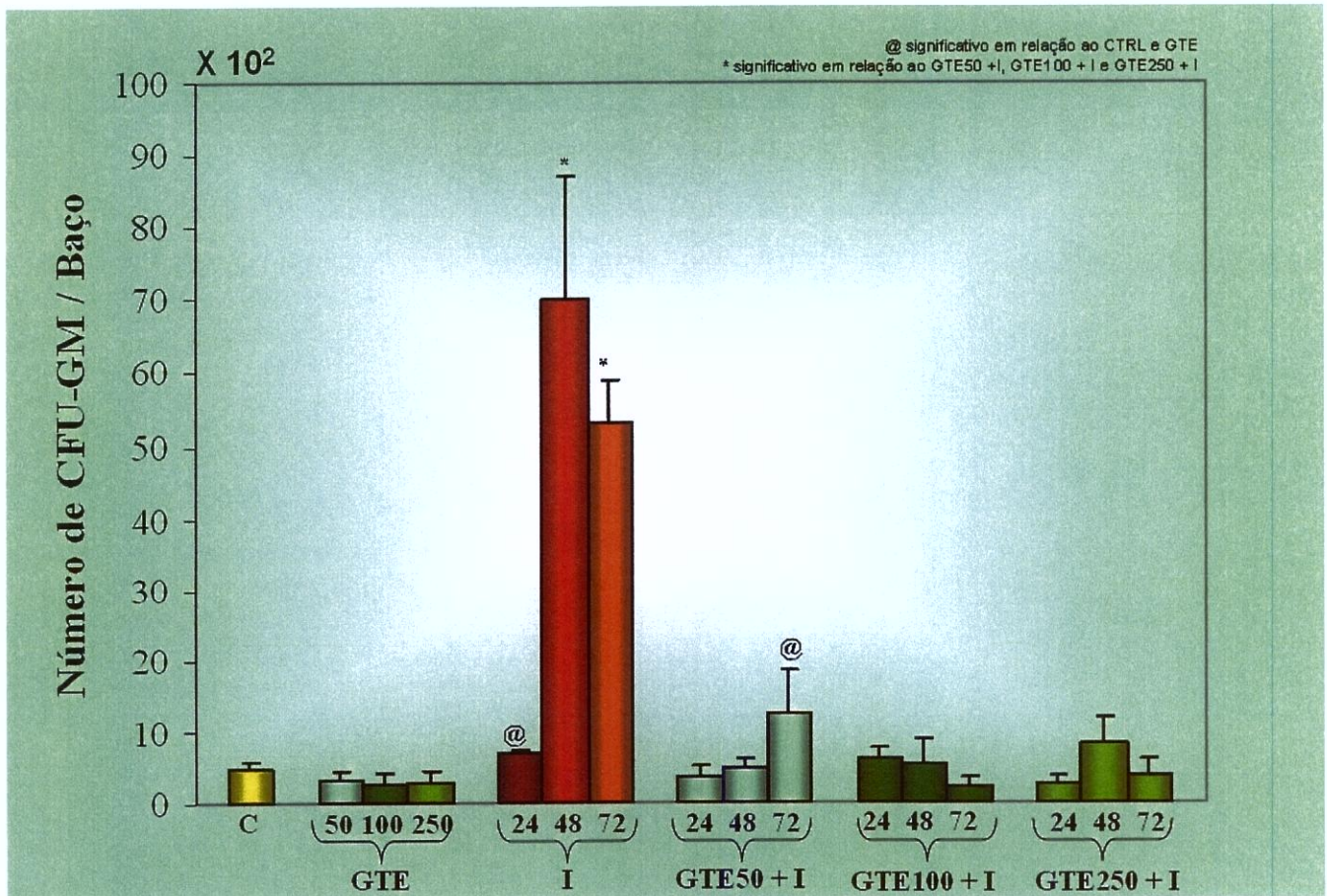
GTE250 + I: tratados com GTE (250mg/Kg) e infectados

7.4 Avaliação dos efeitos de diferentes doses de GTE (50,100 e 250mg/Kg) sobre o crescimento e a diferenciação dos precursores hematopoéticos (CFU-GM) do baço de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes*

A Figura 8 ilustra os efeitos das doses de 50,100 e 250mg/Kg de GTE sobre o crescimento e a diferenciação dos precursores hematopoéticos (CFU-GM) do baço de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes*. Podemos observar que o tratamento de animais normais com as três doses não alterou o número de CFU-GM do baço dos animais.

Além da mielossupressão, nos animais infectados observamos um aumento acentuado na hematopoese esplênica às 48 e 72h após infecção. O tratamento com as três doses de GTE evitou o aumento dramático da hematopoese extramedular observado nos animais apenas infectados (n=6, $p<0,05$ - ANOVA, Tukey).

Figura 8: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250 mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de camundongos BALB/c. A bactéria foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e a avaliação hematopoética foi realizada 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey (Média $\pm$ SD).



C: controle

GTE: tratados com GTE (50, 100 e 250mg/Kg) durante 07 dias

I: infectados

GTE50 + I: tratados com GTE (50mg/Kg) e infectados

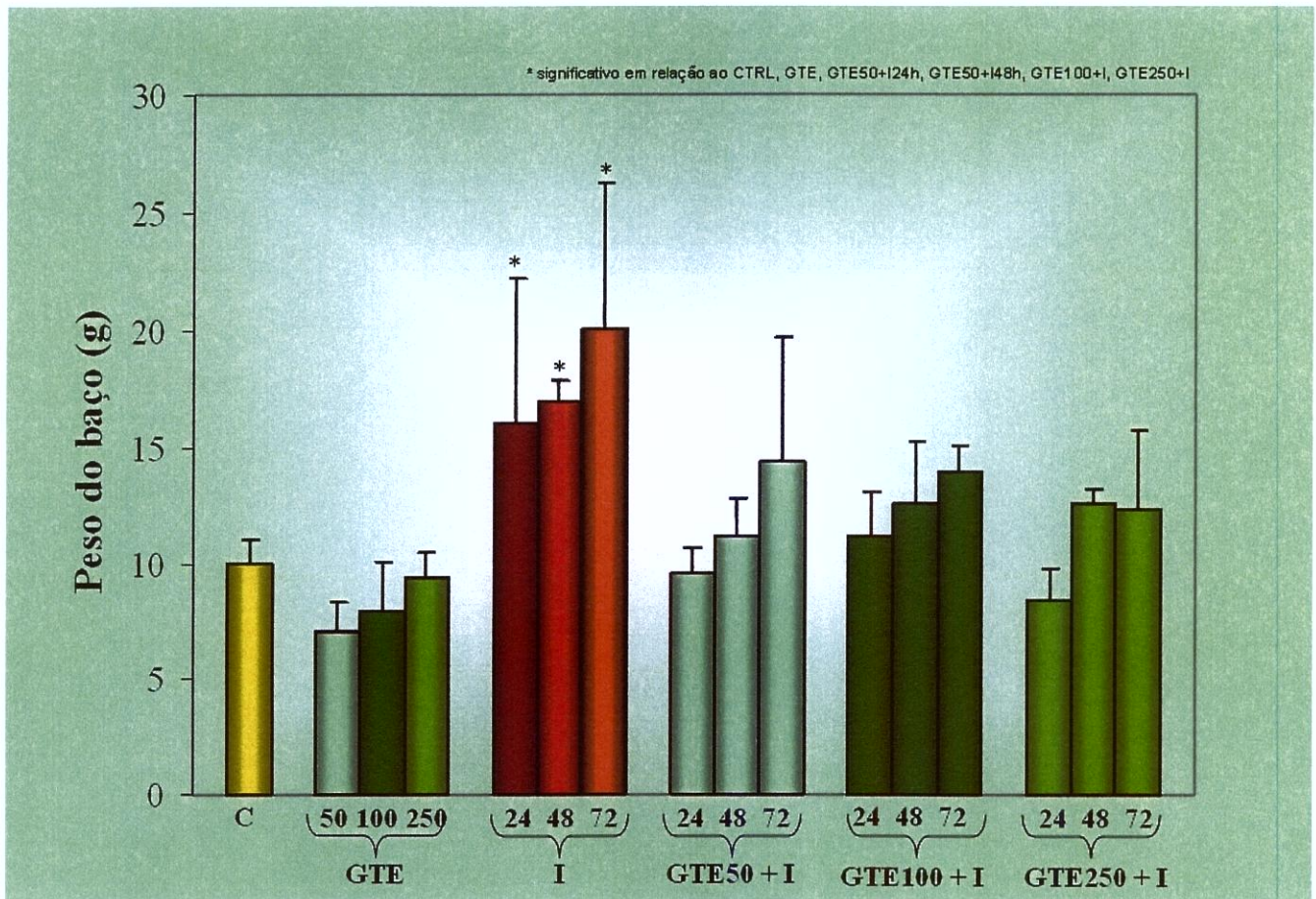
GTE100 + I: tratados com GTE (100mg/Kg) e infectados

GTE250 + I: tratados com GTE (250mg/Kg) e infectados

7.5. Avaliação dos efeitos de diferentes doses de GTE sobre o peso do baço em animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes*

A Figura 9 apresenta os efeitos do tratamento com as doses de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE sobre o peso do baço de animais normais e infectados com *L. monocytogenes*. A presença da infecção gerou um aumento significativo no peso do baço, em relação ao grupo controle, nos três períodos estudados (24, 48 e 72h) ($n=6$, $p<0,05$ - ANOVA, Tukey). O tratamento prévio com as três doses do extrato (50, 100 e 250mg/Kg) impediu a esplenomegalia induzida pela bactéria ($n=6$, $p<0,05$ - ANOVA, Tukey), atingindo valores similares ao grupo controle, exceto para a dose de 50mg/Kg, 72h pós-infecção.

Figura 9: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250 mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o peso do baço de camundongos BALB/c. A bactéria foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o peso do baço foi mensurado 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey (Média $\pm$ SD).



C: controle

GTE: tratados com GTE (50, 100 e 250mg/Kg) durante 07 dias

I: infectados

GTE50 + I: tratados com GTE (50mg/Kg) e infectados

GTE100 + I: tratados com GTE (100mg/Kg) e infectados

GTE250 + I: tratados com GTE (250mg/Kg) e infectados

7.6. Avaliação dos efeitos de diferentes doses de GTE sobre a atividade estimuladora de colônias hematopoéticas do soro (CSA) de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes*

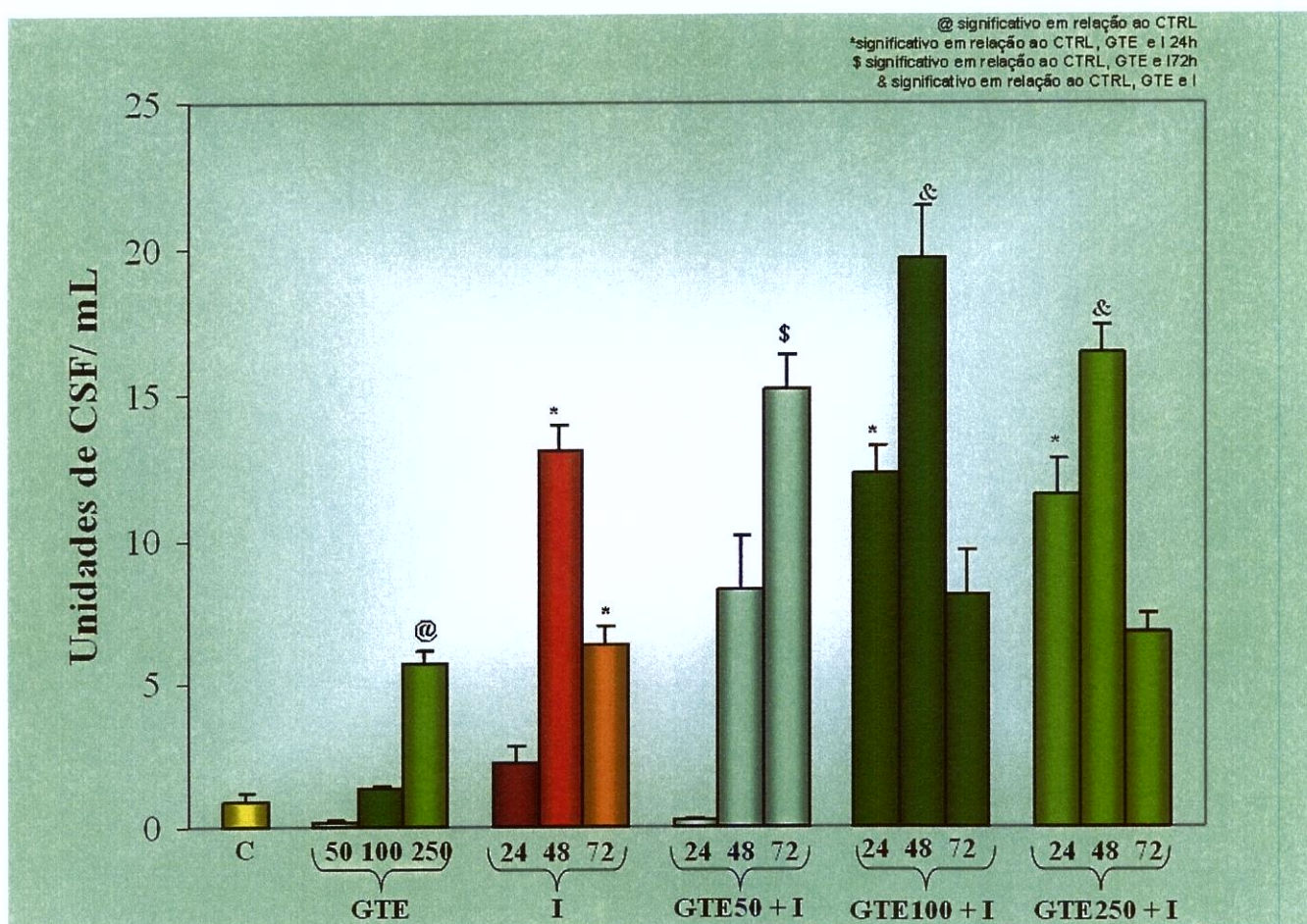
Os efeitos do tratamento com as doses de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE sobre a capacidade estimuladora de colônias hematopoéticas do soro (CSA) de animais normais e infectados com *L. monocytogenes* estão apresentados na Figura 10.

Podemos observar que o tratamento de animais normais com 250mg/Kg de GTE produz um aumento da CSA em relação ao grupo controle ($n=6$, $p<0,05$ - ANOVA, Tukey).

A presença da infecção induz um aumento significativo da CSA de animais infectados 48 e 72h após infecção comparando ao grupo controle ($n=6$, $p<0,05$ - ANOVA, Tukey).

O tratamento prévio de animais infectados com as doses de 100 e 250mg/Kg do extrato, aumentou significativamente a CSA nas primeiras 24h e 48h após infecção, em relação ao grupo infectado ($n=6$, $p<0,05$ - ANOVA, Tukey). No entanto, o tratamento com a dose de 50mg/Kg não produziu nenhum efeito nos momentos iniciais da infecção, produzindo apenas aumento significativo 72h após infecção ($n=6$, $p<0,05$ - ANOVA, Tukey).

Figura 10: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250 mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a produção de fatores estimuladores de colônias hematopoéticas (CSF) no soro de camundongos BALB/c. A bactéria foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o soro foi obtido 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey (Média $\pm$ SD).



C: controle

GTE: tratados com GTE (50, 100 e 250mg/Kg) durante 07 dias

I: infectados

GTE50 + I: tratados com GTE (50mg/Kg) e infectados

GTE100 + I: tratados com GTE (100mg/Kg) e infectados

GTE250 + I: tratados com GTE (250mg/Kg) e infectados

7.7. Efeitos do tratamento com GTE sobre a atividade de células “Natural Killer” (NK)

Os efeitos do tratamento com as doses de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE sobre a atividade lítica de células NK de animais normais e infectados com *L. monocytogenes* estão apresentados na Tabela 02 e Figura 11.

Podemos observar que nos animais normais a atividade lítica das células NK foi de aproximadamente 22% (Figura 11). No entanto, os animais tratados com as doses de 100 e 250mg/Kg do extrato apresentaram um aumento de 13,8 e 11,7% na atividade das células NK, em relação ao grupo controle ($n=6$, $p < 0,05$ – ANOVA- Tukey). Foi verificado que não existem diferenças significativas entre as doses. É importante ressaltar que a dose de 50mg/Kg não produziu nenhum efeito na atividade lítica de células de animais normais.

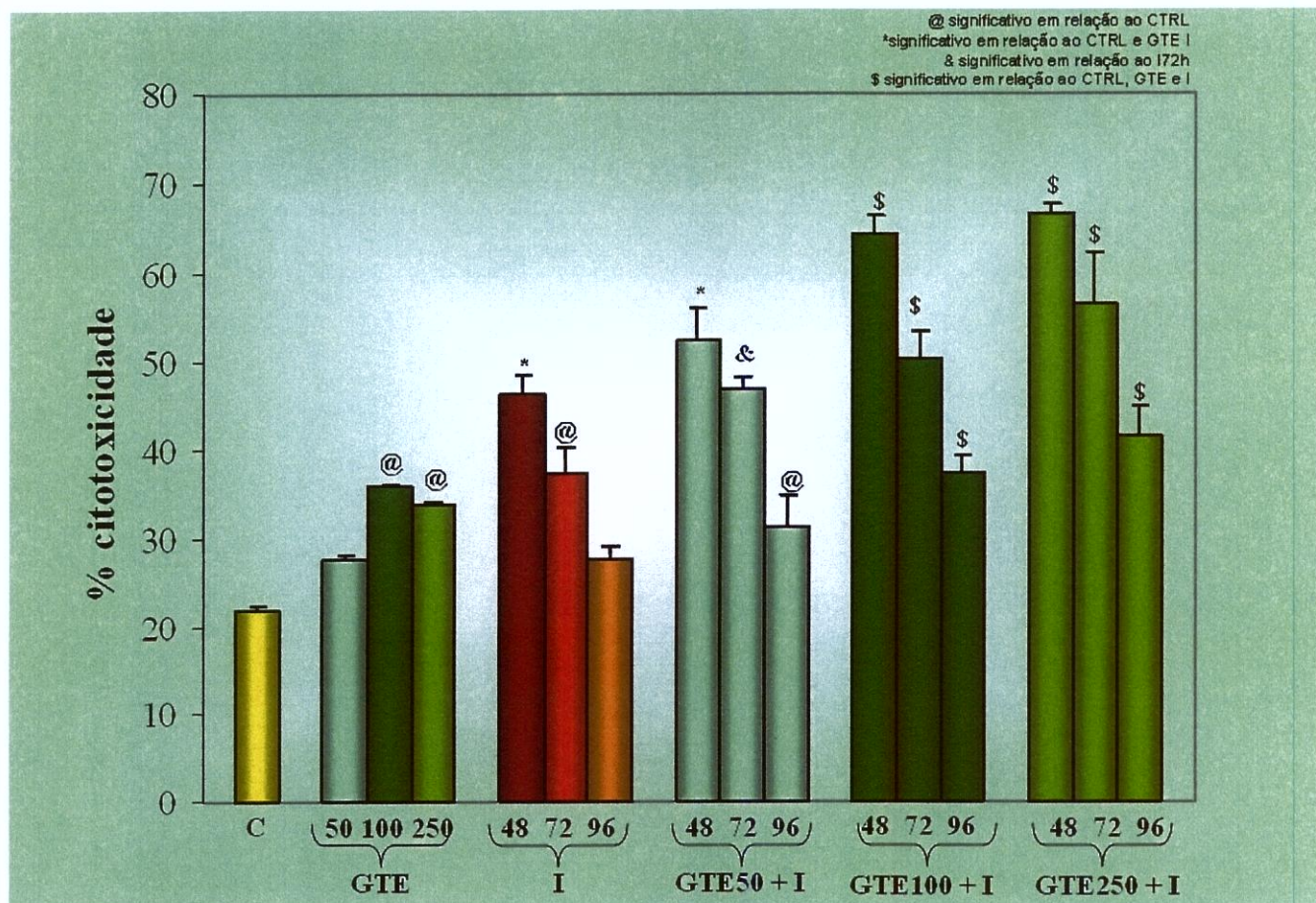
A presença da infecção promove um aumento significativo em relação ao grupo controle de 24,5% e 15,5% na atividade das células NK, nos tempos de 48h e 72h após infecção, respectivamente ($n=6$, $p < 0,05$ – ANOVA- Tukey). Por outro lado, nas 96h de infecção não encontramos diferenças significativas em relação ao grupo controle.

Quando animais infectados foram pré-tratados com as doses de 100 e 250mg/Kg, observamos que ocorre um aumento significativo na atividade das células NK em relação ao grupo controle normal e infectado nos três períodos analisados ($n=6$, $p < 0,05$ – ANOVA- Tukey) (Tabela 02). Embora o pré-tratamento de animais infectados com a dose de 50mg/Kg tenha produzido aumento significativo da atividade lítica de células NK em relação ao grupo controle, este aumento não foi significativo em relação ao grupo infectado. No entanto, nas 72h após infecção foi observado um efeito tardio que foi significativo em relação ao grupo infectado ($n=6$, $p < 0,05$ – ANOVA- Tukey) (Tabela 02).

Tabela 2: Porcentagem de lise específica de células YAC-1 por células NK de camundongos tratados com GTE e infectados. Os animais foram tratados por sete dias consecutivos anteriores a inoculação da bactéria com diferentes doses de GTE (50, 100 e 250mg/Kg) e o ensaio foi realizado 48, 72 e 96h após a infecção.

Grupos	Em relação ao grupo controle			Em relação ao grupo infectado		
	48h	72h	96h	48h	72h	96h
50 + I	30,5%	25%	9,4%	6%	9,6%	3,9%
100 + I	42,2%	28,4%	13,5%	17,7%	12,9%	10%
250 + I	44,6%	34,4%	19,7%	20,1%	18,9%	14,2%

Figura 11: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250 mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a atividade lítica de células NK em camundongos BALB/c. A bactéria foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio de citotoxicidade foi realizado 48 horas após infecção. $n=6$. $P<0,05$ ANOVA-Tukey (Média $\pm$ SD).



C: controle

GTE: tratados com GTE (50, 100 e 250mg/Kg) durante 07 dias

I: infectados

GTE50 + I: tratados com GTE (50mg/Kg) e infectados

GTE100 + I: tratados com GTE (100mg/Kg) e infectados

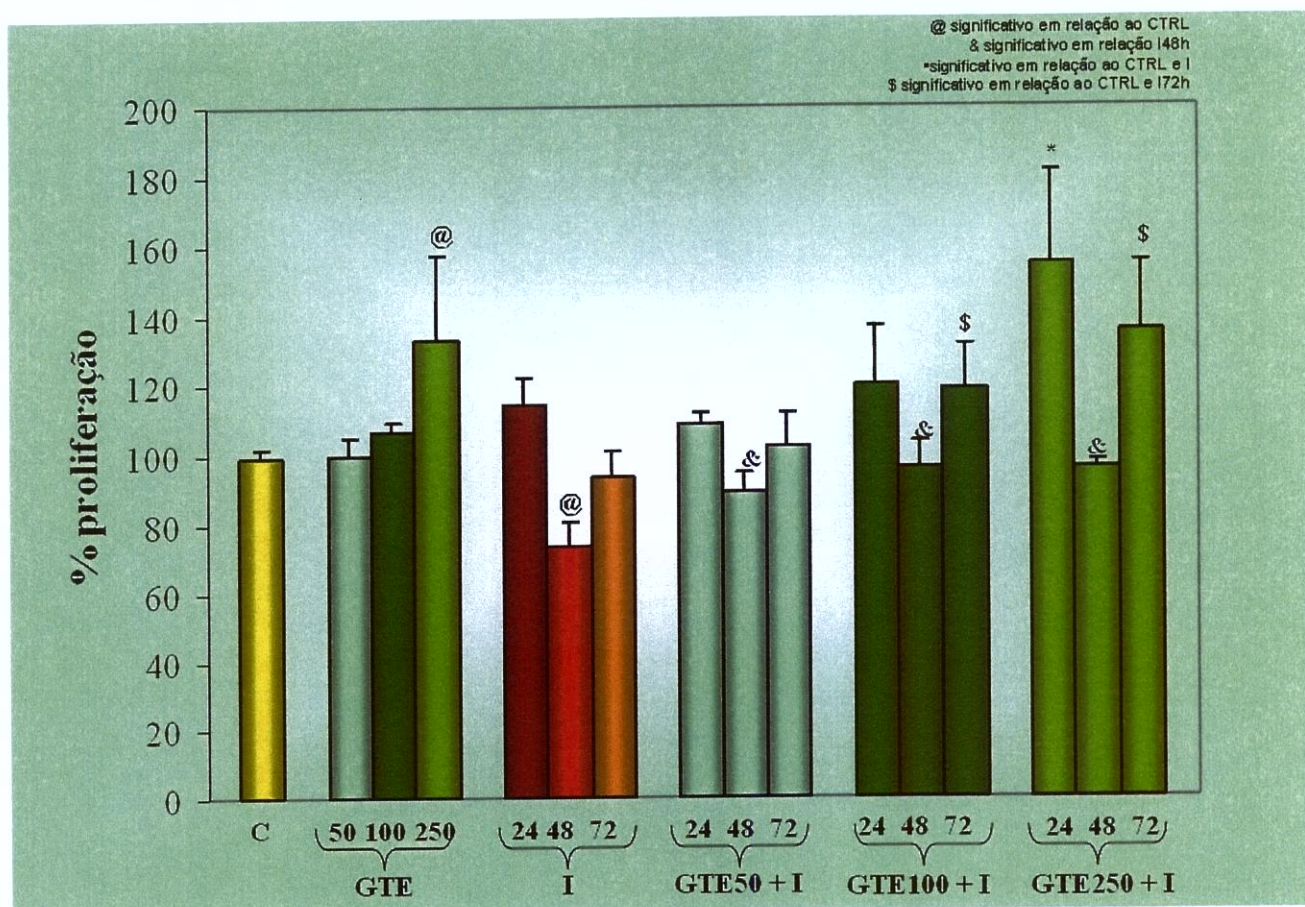
GTE250 + I: tratados com GTE (250mg/Kg) e infectados

7.8. Avaliação dos efeitos de diferentes doses de GTE (50,100 e 250mg/Kg) sobre proliferação de linfócitos de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes*

A Figura 12 apresenta os efeitos do tratamento com as doses de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE sobre a proliferação de linfócitos de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes*.

Podemos observar que nas primeiras 24h após a inoculação da bactéria não ocorre alteração significativa na proliferação de linfócitos. No pico da infecção que ocorre nas 48h após a inoculação da bactéria, observamos uma diminuição significativa da proliferação dos linfócitos em relação ao grupo controle ($n=6$, $p<0,05$, ANOVA – Tukey). Nas 72h após a infecção ocorre uma recuperação da proliferação linfocitária aos patamares do grupo controle. Os animais normais tratados com a dose de 250mg/Kg de GTE apresentaram um aumento da proliferação de linfócitos na cultura em relação ao grupo controle ($n=6$, $p<0,05$, ANOVA – Tukey). No entanto, o tratamento de animais normais com as doses de 50 e 100mg/Kg não produziu o mesmo efeito. O pré-tratamento de animais infectados com a dose de 250mg/Kg aumenta precocemente a proliferação de linfócitos nas primeiras 24h de infecção em relação ao grupo controle ($n=6$, $p<0,05$, ANOVA – Tukey). Adicionalmente, verificamos que no ápice da infecção (48h) as doses de 100 e 250mg/Kg mantêm a proliferação linfocitária nos níveis dos animais controle, impedido a supressão dessas células observada neste período em animais apenas infectados ($n=6$, $p<0,05$, ANOVA – Tukey). Esta estimulação da proliferação dos linfócitos com as doses de 100 e 250mg/Kg de GTE em animais infectados também foi observada 72h após infecção ($n=6$, $p<0,05$, ANOVA – Tukey). Embora tenha sido observado uma leve interferência da dose de 50mg/Kg sobre a proliferação de linfócitos de animais infectados com *Listeria monocytogenes* nas 48h de infecção, esse aumento não foi estatisticamente significativo.

Figura 12: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/ animal, sobre a proliferação de linfócitos de camundongos BALB/c. A bactéria foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio de proliferação foi realizado 24 horas de incubação. N=6. $P < 0,05$ ANOVA-Tukey.



C: controle

GTE: tratados com GTE (50, 100 e 250mg/Kg) durante 07 dias

I: infectados

GTE50 + I: tratados com GTE (50mg/Kg) e infectados

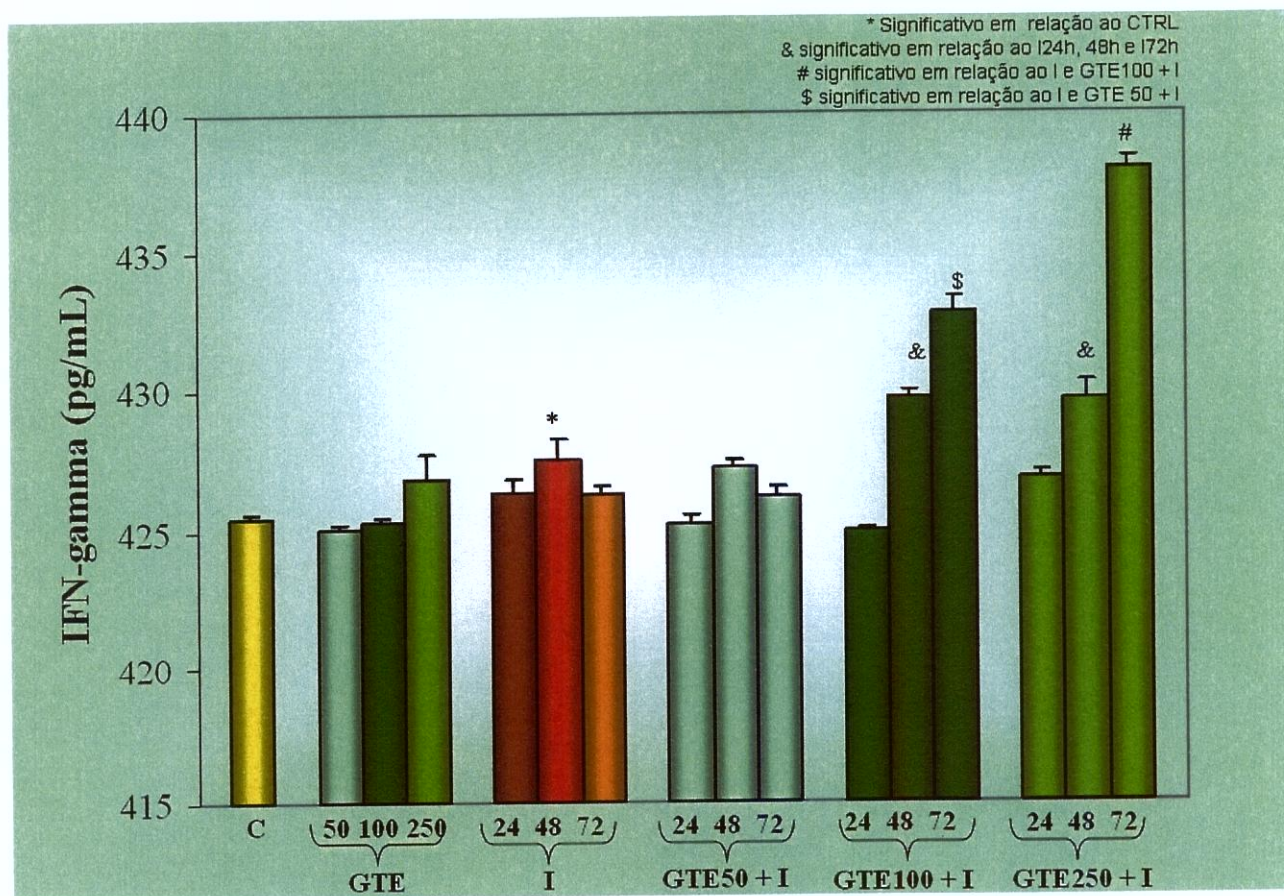
GTE100 + I: tratados com GTE (100mg/Kg) e infectados

GTE250 + I: tratados com GTE (250mg/Kg) e infectados

7.9. Efeitos do GTE sobre a produção de IFN- γ em culturas de células esplênicas

Os efeitos do GTE sobre a produção de citocina de padrão Th1 (IFN- γ) estão apresentados na Figura 13. Podemos observar que o tratamento de animais normais com GTE não alterou a produção de IFN- γ nas culturas analisadas. A presença da infecção induz um aumento significativo em relação ao grupo controle da produção de IFN- γ nas culturas às 48h após inoculação. Por outro lado, nós observamos um aumento progressivo da liberação de IFN- γ em relação ao grupo infectado cujo pico ocorre nas 72h após infecção para os animais que foram pré-tratados com 100 e 250mg/Kg de GTE e infectados com a *Listeria monocytogenes*.

Figura 13: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a produção de IFN- γ em sobrenadante de culturas esplênicas (ConA 24h) de camundongos BALB/c. A bactéria foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio foi realizado 24, 48 e 72 horas após infecção. n=5. P<0,05, Kruskal-Wallis não paramétrico ANOVA.



C: controle

GTE: tratados com GTE (50, 100 e 250mg/Kg) durante 07 dias

I: infectados

GTE50 + I: tratados com GTE (50mg/Kg) e infectados

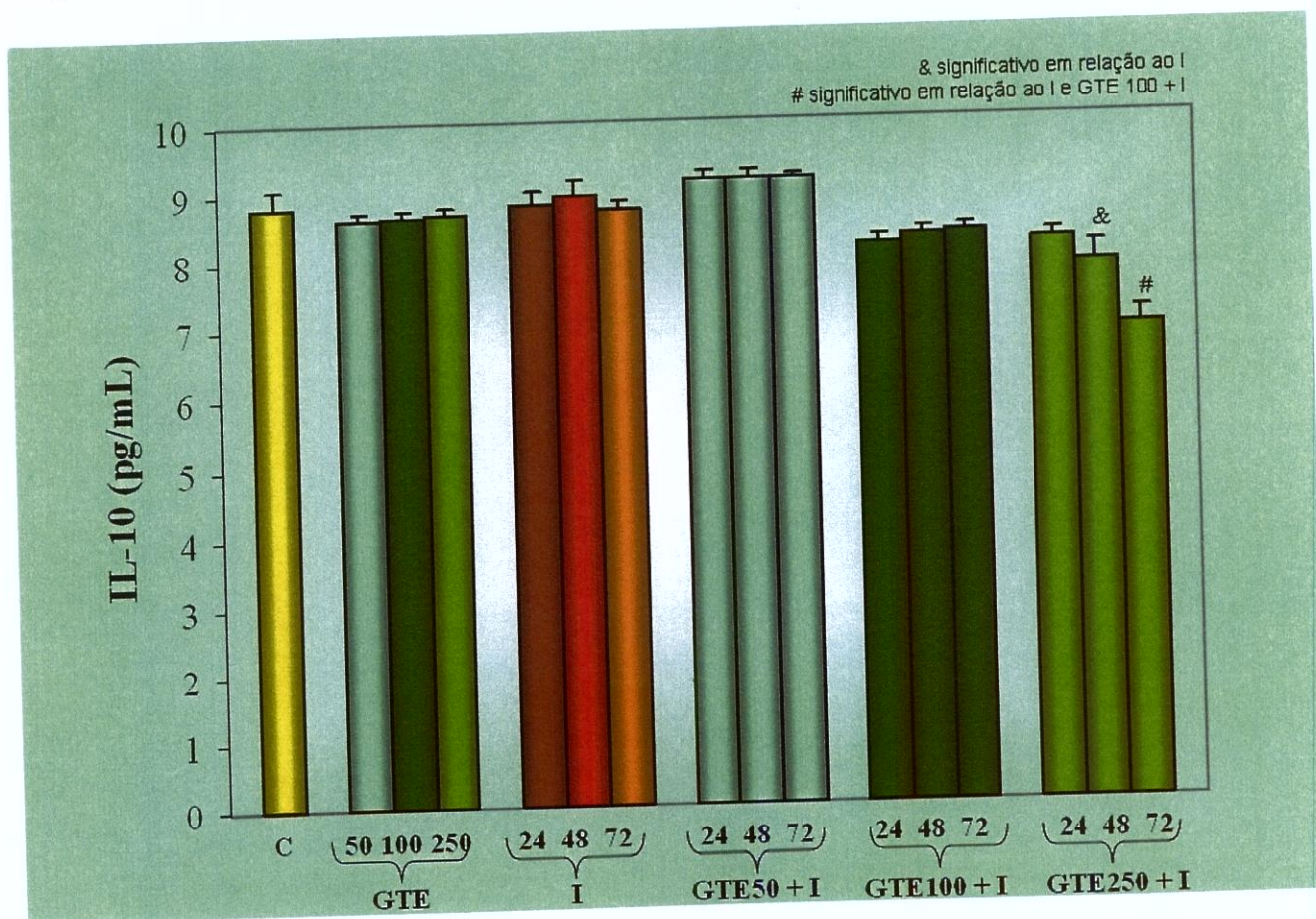
GTE100 + I: tratados com GTE (100mg/Kg) e infectados

GTE250 + I: tratados com GTE (250mg/Kg) e infectados

7.10. Efeitos do GTE sobre a produção de IL-10 em culturas de células esplênicas

A Figura 14 ilustra os efeitos do GTE sobre a produção de citocina de padrão Th2 (IL-10). Podemos observar que o tratamento de animais normais com GTE não alterou a produção de IL-10 nas culturas analisadas. Confirmando resultados anteriores descritos pelo nosso grupo, foi verificado que a presença da infecção não induziu alteração significativa na produção de IL-10 nas culturas. Por outro lado, observamos que os animais pré-tratados com 250mg/Kg de GTE e infectados com a *Listeria monocytogenes* apresentaram uma diminuição progressiva da liberação de IL-10 em relação ao apenas infectado às 48 e 72h após infecção.

Figura 14: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a produção de IL-10 em sobrenadante de culturas esplênicas (ConA 24h) de camundongos BALB/c. A bactéria foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio foi realizado 24, 48 e 72 horas após infecção. (n=5. $P < 0,05$, Kruskal-Wallis não paramétrico ANOVA).



C: controle

GTE: tratados com GTE (50, 100 e 250mg/Kg) durante 07 dias

I: infectados

GTE50 + I: tratados com GTE (50mg/Kg) e infectados

GTE100 + I: tratados com GTE (100mg/Kg) e infectados

GTE250 + I: tratados com GTE (250mg/Kg) e infectados

7.11. Avaliação dos efeitos de diferentes doses de GTE (50,100 e 250mg/Kg) sobre cultura de longa duração de células de medula óssea (LTBMC) de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes*

A Figura 15 (a, b, c ,d, e) e as Tabelas 3, 4 e 5 apresentam os resultados do tratamento com as doses de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE sobre sobre cultura líquida de longa duração de células de medula óssea (LTBMC) de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes*.

A Tabela 3 refere-se à contagem das células não aderentes do sobrenadante das culturas avaliadas semanalmente durante todo o experimento (9 semanas). Podemos observar que o número de células não aderentes em cultura de animais infectados diminui em relação aos animais normais. Além disso, o tratamento de animais normais com as doses de 50mg/Kg não produziu nenhum efeito neste parâmetro. No entanto com as doses de 100 e 250mg/Kg foi verificado um aumento do número de células em suspensão. Quando animais infectados foram pré-tratados com as doses de 100 e 250mg/Kg ocorre aumento da celularidade do sobrenadante da 5ª a 9ª semana de cultura quando comparamos com os animais normais e apenas infectados.

A Figura 15 (a, b, c ,d, e) e a Tabela 4 apresentam os efeitos do GTE sobre o número de CFU-GM realizado com as células não aderentes da cultura. A partir da 5ª semana de cultura realizamos ensaios clonogênicos para granulócitos e macrófagos (GM) até o final do experimento (9ª semana). Podemos observar que o tratamento de animais normais com as doses de 50 e 100mg/Kg não produziu nenhum efeito no número de CFU-GM. Por outro lado, para a dose de 250mg/Kg observamos uma estimulação destes precursores em relação ao grupo controle ($n=3$, $p<0,05$, ANOVA – Tukey). A presença da infecção promove uma diminuição drástica do número de CFU-GM em relação ao grupo controle ($n=3$, $p<0,05$, ANOVA – Tukey). Entretanto, não foi observado uma diminuição do número de CFU-GM para os animais que foram tratados profilaticamente com as doses de 100 e 250mg/Kg do extrato ($n=3$, $p<0,05$, ANOVA – Tukey). Adicionalmente, um efeito dose dependente foi observado devido ao aumento significativo do número de CFU-GM dos animais pré-tratados com a dose de 250mg/Kg em relação aos animais infectados pré-tratados com as doses de 50 e 100mg/Kg ($n=3$, $p<0,05$, ANOVA – Tukey). Embora os animais tratados com a dose de 50mg/Kg não tenham permanecido com valores de CFU-GM normais foi demonstrado que esta dosagem é capaz de interferir neste parâmetro.

Os efeitos do GTE sobre número de CFU-GM permaneceram proporcionalmente os mesmos entre a 6ª e 9ª semanas seguindo, no entanto, o decréscimo normal da coalescência da cultura.

A Tabela 5 apresenta os resultados do tratamento com diferentes doses de GTE sobre as aderentes da cultura (estroma medular). Podemos observar que nenhum dos grupos estudados apresentaram alterações significativas na celularidade das células aderentes em cultura. Adicionalmente, a análise em câmara hematocitométrica demonstrou que o tratamento com as diferentes doses de GTE não provoca alterações na viabilidade dessas células (dados não apresentados).

Tabela 3: Efeitos de diferentes doses do GTE sobre as células não-aderentes em Cultura Líquida de Longa Duração (LTBMC) de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes*. Os animais foram tratados previamente durante sete dias anteriores à inoculação da bactéria e o ensaio realizado 48h após a infecção. Os animais controle receberam apenas o veículo da droga. A Contagem foi realizada em duplicata durante todas as semanas do ensaio. Resultados apresentados em Média $\pm$ SD.

Parâmetro: $\times 10^5$ células / mL.

Grupos Semana	CTL	I	GTE 50	GTE 100	GTE 250	GTE50 +I	GTE100+I	GTE250+I
1ª Semana	45 $\pm$ 2	40 $\pm$ 4	40 $\pm$ 5	50 $\pm$ 3	58 $\pm$ 4*	34 $\pm$ 2	44 $\pm$ 3	50 $\pm$ 2
2ª Semana	33 $\pm$ 5	30 $\pm$ 2	38 $\pm$ 3	34 $\pm$ 4	43 $\pm$ 3*	24 $\pm$ 1	38 $\pm$ 1	40 $\pm$ 2
3ª Semana	15 $\pm$ 3	11 $\pm$ 3*	28 $\pm$ 2	19 $\pm$ 3	35 $\pm$ 2*	18 $\pm$ 2	24 $\pm$ 2	24 $\pm$ 1
4ª Semana	9 $\pm$ 2	7,5 $\pm$ 2	15 $\pm$ 3	13 $\pm$ 2	18 $\pm$ 3*	9 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	9 $\pm$ 2
5ª Semana	44 $\pm$ 4	45 $\pm$ 3	46 $\pm$ 4	49 $\pm$ 3	45 $\pm$ 4	41 $\pm$ 3	61 $\pm$ 3#	60 $\pm$ 2#
6ª Semana	15 $\pm$ 2	11 $\pm$ 2*	15 $\pm$ 2	30 $\pm$ 4*	32 $\pm$ 2*	16 $\pm$ 3	30 $\pm$ 2#	30 $\pm$ 3#
7ª Semana	11 $\pm$ 3	6 $\pm$ 2*	13 $\pm$ 3	15 $\pm$ 2*	27 $\pm$ 1*	8 $\pm$ 1	21 $\pm$ 3#	18 $\pm$ 2#
8ª Semana	9 $\pm$ 1	3 $\pm$ 2*	9 $\pm$ 2	16 $\pm$ 3*	19 $\pm$ 2*	6 $\pm$ 1	16 $\pm$ 2#	14 $\pm$ 1#
9ª Semana	8 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2*	8 $\pm$ 2	12 $\pm$ 2*	14 $\pm$ 2*	5 $\pm$ 2	11 $\pm$ 2#	15 $\pm$ 2#

** significativo em relação ao grupo controle; # significativo em relação ao grupo controle e infectado.

Tabela 4 Efeitos de diferentes doses do GTE sobre o número de precursores hematopoiéticos (CFU-GM) em Cultura Líquida de Longa Duração (LTBMC) de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes*. Os animais foram previamente tratados durante sete dias anteriores à inoculação da bactéria e o ensaio realizado 48h após a infecção. Os animais controle receberam apenas o veículo da droga. O ensaio de CFU-GM foi realizado a partir da 1ª semana após o repovoamento (5ª semana). Resultados apresentados em Média $\pm$ SD.

Grupos Semana	CTL	I	GTE 50	GTE 100	GTE 250	GTE50 +I	GTE100+I	GTE250+I
5ª Semana	308 $\pm$ 31,8	180 $\pm$ 21	254,6 $\pm$ 23	336,6 $\pm$ 11	433,3 $\pm$ 31	246 $\pm$ 46	305 $\pm$ 55	360 $\pm$ 40
6ª Semana	90 $\pm$ 27,8	22 $\pm$ 12	110 $\pm$ 10	163,3 $\pm$ 15	192 $\pm$ 8	96 $\pm$ 4	120 $\pm$ 30	120 $\pm$ 23,1
7ª Semana	66 $\pm$ 16,52	12 $\pm$ 9,17	65 $\pm$ 20	90 $\pm$ 12	135 $\pm$ 7	40 $\pm$ 8	63 $\pm$ 6	80 $\pm$ 16,7
8ª Semana	45 $\pm$ 15,39	3 $\pm$ 1	40 $\pm$ 5	48,3 $\pm$ 14,5	71,3 $\pm$ 12,2	25 $\pm$ 7	56 $\pm$ 11,53	70 $\pm$ 7
9ª Semana	32 $\pm$ 11	3 $\pm$ 1,73	27 $\pm$ 12	36 $\pm$ 4	72 $\pm$ 6,25	18 $\pm$ 2,5	33 $\pm$ 3,46	41,33 $\pm$ 2,5

Figura 15: Efeitos de diferentes doses do GTE sobre o número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) em Cultura Líquida de Longa Duração (LTBMC) de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes*. Os animais foram previamente tratados durante sete dias anteriores à inoculação da bactéria e o ensaio realizado 48h após a infecção. Os animais controle receberam apenas o veículo da droga. O ensaio de CFU-GM foi realizado a partir da 1ª semana após o repovoamento (5ª semana) (n=3, p<0,05, ANOVA – Tukey) * significativo em relação ao controle; # significativo em relação ao GTE 50 + I e GTE 100 + I; † significativo em relação ao GTE 50 + I, GTE 100 + I e GTE250 + I; & significativo em relação ao GTE 250 + I; @ significativo em relação ao GTE 100 + I e GTE250 + I.

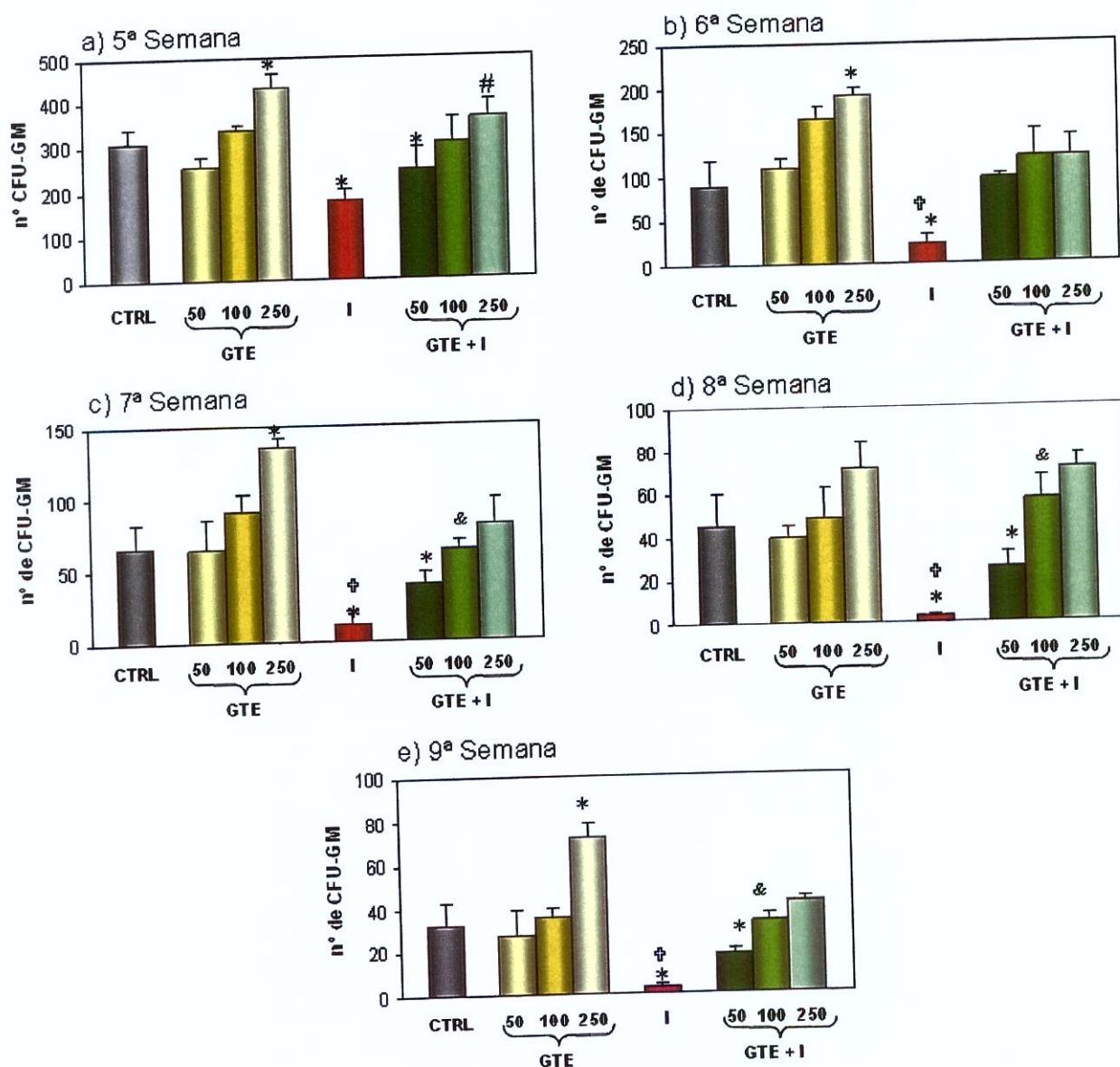


Tabela 5: Efeitos de diferentes doses do GTE sobre as células aderentes (estroma medular) em Cultura Líquida de Longa Duração (LTBMC) de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes*. Os animais foram tratados previamente durante 7 dias anteriores à inoculação da bactéria e o ensaio realizado 48h após a infecção. Os animais controle receberam apenas o veículo da droga. Na última semana do experimento utilizamos tripsina para contabilizarmos as células aderentes da cultura (5 garrafas/grupo).

Parâmetro: $\times 10^5$ células / mL.

Grupos Garrafa	CTL	I	GTE 50	GTE 100	GTE 250	GTE50+I	GTE100+I	GTE250+I
Garrafa 1	5	5	3	2	2	3	2	2
Garrafa 2	4	2	3	4	3	3	2	2
Garrafa 3	4	2	2	3	2	3	1	1
Garrafa 4	2	4	4	4	5	4	2	1
Garrafa 5	2	2	3	2	3	2	3	4
Media	3,4	3	3	3	3	3	2	2
Desvio padrão	1,342	1,414	0,707	1	1,225	0,707	0,707	1,225



Discussão

8. DISCUSSÃO

Em nosso trabalho investigamos os efeitos do Chá Verde (GTE) sobre a resposta imunohematopoética de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*.

A avaliação da eficácia terapêutica do GTE realizada através da curva de sobrevivência (Figura 6) demonstrou que o tratamento com diferentes doses do extrato aumentou de forma dose-dependente a resistência dos animais à administração de uma dose letal de *Listeria monocytogenes*, resultando em 33 e 50% de sobrevivência para as doses de 100 e 250mg/Kg, respectivamente. Embora a dose de 50mg/Kg não tenha sido capaz de proteger os animais, observamos uma interferência discreta e tardia do tratamento com esta dose na cinética da infecção que foi confirmada nos experimentos de avaliação hematopoética.

Com o objetivo de verificar os mecanismos subjacentes à eficácia terapêutica do GTE, investigamos os efeitos do tratamento sobre o número de CFU-GM na medula óssea de animais normais e infectados com *L. monocytogenes* (Figura 7). Nestes experimentos, observamos que o tratamento de animais normais com as doses de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE não produziu nenhum efeito no número de CFU-GM da medula óssea dos camundongos. Nos animais infectados ocorreu uma intensa mielossupressão, representada pela redução no número de CFU-GM, cujo nadir ocorre nas 48h após infecção. Entretanto, o pré-tratamento de animais infectados com as doses de 100 e 250mg/Kg manteve o número de CFU-GM na medula óssea nos patamares do grupo controle. Embora a dose de 50mg/Kg do extrato tenha aumentado o número de CFU-GM na medula óssea dos animais quando comparados ao grupo infectado, este aumento não atingiu os níveis dos controles.

Um conjunto de trabalhos realizados em nosso laboratório tem demonstrado que a hematopoese extramedular é um mau prognóstico na recuperação do animal imunossuprimido (QUEIROZ *et al.* 2003; MIRANDOLA, JUSTO e QUEIROZ, 2002; VALADARES e QUEIROZ, 2002; QUEIROZ, JUSTO, VALADARES e PEREIRA-DA-SILVA, 2001; JUSTO, SILVA e QUEIROZ, 2003). Um dos reflexos deste fenômeno é o drástico aumento de CFU-GM no baço dos animais infectados nas primeiras 48 e 72h de infecção que ocorre devido à migração hematopoética da medula óssea para os sítios de proliferação bacteriana. O tratamento de animais infectados com todas as doses (50, 100 e 250mg/Kg) diminuiu o número de CFU-GM no baço dos animais (Figura 8).

A esplenomegalia é uma outra característica da infecção por *L. monocytogenes* que ocorre nos três períodos de infecção analisados (24, 48 e 72h). O tratamento com as doses de 50, 100 e 250mg/Kg preveniu o aumento do volume do baço dos animais infectados, em todos os períodos analisados (Figura 9).

Adicionalmente, avaliamos os efeitos do tratamento com GTE sobre a atividade estimuladora de colônias hematopoéticas do soro (CSA) de animais normais e infectados com *L. monocytogenes* (Figura 10). Nós verificamos que o tratamento de animais normais com as doses de 50 e 100mg/Kg não produziu nenhum efeito na CSA dos animais. No entanto, a dose de 250mg/Kg aumentou significativamente a CSA dos animais. Para os animais infectados, observamos um aumento significativo destes fatores às 48 e 72h após a inoculação da bactéria. No entanto, o pré-tratamento dos animais infectados com as doses de 100 e 250mg/Kg do extrato provocou um aumento da CSA nas primeiras 24h de infecção. Essa característica é muito interessante pois o aumento de fatores estimuladores de colônias (CSFs) no soro nas primeiras horas de infecção é um padrão observado nas linhagens resistentes de camundongos, como o C57BL (CHEERS *et al.* 1988). Os CSFs modulam a resposta hematopoética provocando a pronta mobilização de monócitos-macrófagos (GM) circulantes e teciduais e aumentando a diferenciação de precursores hematopoéticos para GM na medula óssea (CHEERS e STANLEY, 1988). Dessa forma, a resposta hematopoética de animais resistentes é mais rápida e resolutiva do que em animais susceptíveis como o BALB/c cujo pico de CSFs ocorre nas 48h de infecção. O tratamento de animais infectados com a dose de 50mg/Kg de GTE provocou um efeito tardio no aumento da concentração de CSFs cujo pico ocorreu 72h após infecção. Esta característica está relacionada com a progressão da infecção e morte dos animais nos experimentos de sobrevivência.

A diminuição de precursores hematopoéticos na medula óssea em animais BALB/c infectados com *L. monocytogenes* está relacionada com a migração destes progenitores da medula óssea para outros tecidos hematopoéticos secundários, como o baço onde ocorre a geração de células supressoras (QUEIROZ *et al.* 2003; MIRANDOLA, JUSTO e QUEIROZ, 2002; VALADARES e QUEIROZ, 2002; QUEIROZ, JUSTO, VALADARES e PEREIRA-DA-SILVA, 2001; JUSTO, SILVA e QUEIROZ, 2003). Estes fenômenos juntos concorrem para a falência do hospedeiro. O tratamento com GTE provoca a reversão desses efeitos modulados por aumento da atividade estimuladora de colônias hematopoéticas no soro nos estágios iniciais da infecção.

Apesar dos macrófagos e neutrófilos serem células efectoras da resposta contra *L. monocytogenes*, vários estudos indicam que as células NK e as citocinas por elas produzidas desempenham papel

crucial na determinação da evolução da resposta do hospedeiro contra a bactéria (CZUPRINSKY e FRENDSCHO, 1997; MOCCI, DALRYMPLE, NISHINAKAMURA e MURRAY, 1997; YAN, 1992; DAUGELAT, LADEL, FLESCHE e KAUFMANN, 1996). Os efeitos do GTE sobre a atividade lítica de células NK nos períodos de 48, 72 e 96h após infecção foi avaliado (Figura 11). Essas células participam no combate direto às células infectadas no foco inflamatório e no processo inicial de polarização para Th1 logo após sofrerem estimulação por macrófagos ativados (ROGERS *et al.* 1992; CHEERS, HAIGH, KELSO, METCALF, STANLEY, e YOUNG, 1988; COSSART e BIERNE, 2001). Os animais normais tratados com as doses de 100 e 250mg/Kg do extrato de GTE apresentaram, respectivamente, um aumento de 13,8 e 11,7% na atividade de células NK em relação ao grupo controle. Nos animais infectados, a atividade destas células aumentou 24,6% e 15,5%, respectivamente, nos tempos de 48 e 72h após a infecção, comparado ao grupo controle. Entretanto para 96h após a inoculação da bactéria não observamos aumento da atividade das células NK. O pré-tratamento de animais infectados nos três períodos analisados com as doses de 100 e 250mg/Kg provocou um aumento na atividade lítica das células NK em relação ao grupo infectado e ao grupo controle (Tabela 2). A dose de 50mg/Kg não provocou um aumento significativo em relação aos animais infectados. No entanto, para 72h de infecção, observamos um aumento tardio da atividade das células NK com relação ao grupo controle.

Nos estágios iniciais da listeriose, está bem documentado na literatura, o importante papel das células NK (CZUPRINSKY e FRENDSCHO, 1997; MOCCI, DALRYMPLE, NISHINAKAMURA e MURRAY, 1997; YAN, 1992), entretanto a ativação dessas células ocorre entre as 24-48h após a inoculação da bactéria para a perfeita resolução da infecção (DAUGELAT, LADEL, FLESCHE e KAUFMANN, 1996). Dessa forma o efeito tardio provocado pela dose de 50mg/Kg não é capaz de debelar a infecção. Essa característica é um fator adicional para a progressão da infecção e morte dos animais no experimento de sobrevida. A resposta tardia pode estar relacionada com substâncias com efeito cumulativo no organismo do animal ou com biodisponibilidade de componentes químicos presentes no extrato.

Estudos anteriores demonstraram que o GTE promove um aumento da atividade das células NK em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich provocando um aumento da sobrevida desses animais (YAN, 1992). Dessa forma, os nossos resultados também indicam que o GTE apresenta um mecanismo de ação imunomodulador para animais infectados com dose letal da bactéria pois o

aumento da sobrevivência garantida pelo GTE pode estar relacionada, pelo menos em parte, com aumento da atividade de células NK.

A proliferação de linfócitos também foi analisada em nosso estudo (Figura 12). Nestes ensaios, podemos observar que no pico da infecção (48h) ocorre uma diminuição significativa na proliferação linfocitária comparado com o grupo controle. A presença da infecção induz um aumento da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos ativados que embora seja considerado um mecanismo de efeito antimicrobiano, apresenta como efeito secundário a diminuição da expansão de células T (CIFONE, ULISSE e SANTONI, 2001). Dessa forma, a redução observada em nossos experimentos pode estar relacionada, pelo menos em parte, com uma supressão de células T modulada pela produção de NO. Entretanto, o pré-tratamento de animais infectados com a dose de 250mg/Kg do GTE provocou um aumento na proliferação de linfócitos nas primeiras 24h de infecção. Este evento pode estar relacionado com o aumento da atividade de células NK pois a ativação destas células está estritamente relacionada com a proliferação de linfócitos (CIFONE, ULISSE e SANTONI, 2001). Recentemente foi descrita a cinética de ativação de células T provocada pela *Listeria*. Um aumento de linfócitos específicos ocorre aproximadamente 5-7 dias após a infecção, sendo ativado após este período um mecanismo de controle de proliferação via apoptose (MANNERIN, ZHONG e CHEERS, 2002).

As doses de 100 e 250mg/Kg também promoveram um aumento da proliferação de linfócitos em animais normais. Estudos anteriores envolvendo a atividade proliferativa de linfócitos demonstraram que a exposição a constituintes do GTE promove um forte aumento da atividade mitótica dos linfócitos, possivelmente relacionada com o radical galoil que estes componentes possuem em sua estrutura química (HU, TODA, OKUBO, HARA e SHIMAMURA, 1992).

O pré-tratamento de animais infectados com as doses de 100 e 250mg/Kg do extrato promoveu um aumento na atividade mitótica dos linfócitos nos tempos de 48 e 72h após a infecção, em relação aos animais infectados. A estimulação da proliferação de linfócitos associado à presença de estímulos lesivos também já foi documentado na literatura, onde doses diárias de 80mg/Kg i.p. do GTE demonstraram estimular atividade proliferativa de linfócitos de animais portadores de tumor S-180 (YAN, 1992).

Além da estimulação da proliferação de linfócitos, o GTE demonstrou alterar o perfil secretor de citocinas de padrão Th1 e Th2 em animais infectados com *Listeria monocytogenes* (Figuras 13 e 14). A produção de citocinas de padrão Th1 e Th2 têm sido extensamente estudada no modelo de listeriose murina (ROGERS *et al.* 1992; COSSART e BIERNE, 2001; BECKERMAN *et al.* 1993;

BUCHMEIER e SCHEREIBER, 1985; MIELKE, EHLERS e HAHN, 1993; TRINCHIERI, 1992; MOMBAERTS *et al.* 1993; KAUFMANN, 1993; KAUFMANN, 1983; EDELSON e UNANUE; 2000; FERRICK *et al.* 1995; FARGEAS *et al.* 1992; IIZAWA, BROWN e CZUPRYNSKI, 1992; FLESCH e KAUFMANN, 1994). Está bem estabelecido a importância do IFN- γ (ROGERS *et al.* 1992; COSSART e BIERNE, 2001; CHEERS *et al.* 1988; BECKERMAN *et al.* 1993; BUCHMEIER e SCHEREIBER, 1985; MIELKE, EHLERS e HAHN, 1993; TRINCHIERI, 1992; ROGERS *et al.* 1994) e o caráter supressor da IL-10 e IL-4 nos estágios iniciais da listeriose (FLESCH e KAUFMANN, 1994). Estudos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo, demonstram que a presença da infecção aumenta a concentração de IFN- γ em cultura de linfócitos estimulados com Concanavalina A. Adicionalmente, nenhuma alteração na secreção de IL-4 e IL-10 pôde ser detectada em animais infectados, nos estágios iniciais de infecção (QUEIROZ; QUADROS e SANTOS, 2000b).

Recentemente, o efeito do GTE sobre a produção de citocinas *in vitro* foi alvo de investigações. MATSUNAGA *et al.* (2001), demonstraram que a epigallocatequina-galato (ECG) possui atividade imunomoduladora *in vitro* em modelo de infecção de macrófagos por *Legionella pneumophila*. Foi verificada uma inibição do crescimento desta bactéria no interior de macrófagos tratados com ECG. Nessas culturas, os níveis de TNF- α , IFN- γ e IL-12 estavam aumentados, enquanto que os de IL-10 diminuídos. O tratamento de macrófagos com ECG em presença de anti-TNF- α e anti-IFN- γ não inibiu o crescimento da bactéria, enquanto que, em presença de anti-IL-10 e anti-IL-12, a inibição do crescimento bacteriano provocada pela ECG foi mantida. Ainda neste estudo, os autores observaram um aumento de RNAm para IFN- γ nas culturas de macrófagos tratados com ECG. Dessa forma, a atividade imunomoduladora *in vitro* da ECG está relacionada ao aumento da produção de TNF- α e IFN- γ (MATSUNAGA, KLEIN, FRIEDMAN e YAMAMOTO, 2001). Adicionalmente foi demonstrado que a ECG reverte a imunossupressão induzida pelo tabaco em culturas de macrófagos humanos infectados *L. pneumophila* através de um aumento na atividade dessas células frente à bactéria, além de estimular a secreção de certas citocinas de padrão Th1, tais com TNF- α , IL-12 e diminuição de IL-10 (MATSUNAGA, KLEIN, FRIEDMAN e YAMAMOTO, 2002).

Em nossos ensaios avaliamos o efeito do GTE sobre a produção de citocinas *in vivo* (Figuras 13 e 14). O pré-tratamento de animais infectados com a dose de 100 e 250mg/Kg de GTE provocou aumento da produção de IFN- γ 72h após infecção bacteriana. Adicionalmente, a dose de 250mg/Kg induziu uma diminuição de IL-10 nas culturas avaliadas. Dessa forma, nossos resultados apontam que

o tratamento com GTE induz polarização da resposta imunológica para Th1. Essa característica favorece o combate a microorganismos intracelulares e explica em parte o mecanismo de ação do GTE para a resistência do animal à dose letal de *Listeria monocytogenes*.

Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a proteção promovida pelo GTE nas doses de 100 e 250mg/Kg em animais infectados com dose letal de *L. monocytogenes* está relacionada com uma modulação da mielossupressão e diminuição da hematopoese extramedular, com o aumento da atividade lítica de células NK e da proliferação de linfócitos, além da polarização para resposta imunológica para Th1.

O sistema hematopoético é extremamente sensível a uma variedade de estímulos, modulando a hematopoese de acordo com a demanda e necessidade do organismo. Dessa forma, a avaliação funcional da medula óssea é de especial importância uma vez que ela reflete qualquer possível alteração celular que ocorre como consequência da evolução temporal da doença. Portanto, dando continuidade às investigações acerca dos efeitos do GTE no compartimento hematopoético, avaliamos os efeitos desta droga sobre o estroma medular e sobre a geração de progenitores para granulócitos e macrófagos em sistema de Cultura Líquida de Longa Duração (LTBMC) (Figura 15). A utilização da LTBMC permite que a maioria dos componentes hematopoéticos da medula óssea seja reproduzida *in vitro* (SPOONCER, ELIANSON e DEXTER, 1993). A hematopoese pode ser mantida nestas culturas por meses, sem a adição de fatores de crescimento, desde que a camada de estroma medular (células aderentes) tenha sido formada (DEXTER, 1990). No entanto, a manutenção da célula-tronco hematopoética (HSC) e de suas características requer um contato físico entre as células estromais e células hematopoéticas. Caso este contato não ocorra, a hematopoese rapidamente declina (DEXTER, 1990; SPOONCER, ELIANSON e DEXTER, 1993). Este fenômeno ocorre porque as células estromais suportam a hematopoese por proporcionar um microambiente adequado para a sobrevivência, autorenovação, proliferação e diferenciação das HSC. Isto sugere que a manutenção da hematopoese está predominantemente ligada à fatores de crescimento que estão ancorados na matriz extracelular do estroma medular e, secundariamente, à fatores solúveis. Essas citocinas podem ser produzidas pelas próprias células estromais ou seqüestradas do meio e lançadas em sua superfície (DEXTER, 1990) e podem por sua vez, ter caráter estimulatório ou inibitório (SPOONCER, ELIANSON e DEXTER, 1993).

A formação da camada estromal ocorre entre a 2ª e 4ª semana de cultura. Na sequência, as células mais primitivas migram para esta camada e em íntima associação com o microambiente,

estabelece a hematopoese *in vitro*. As células mais imaturas permanecem no estroma e a medida que as células sofrem divisão e maturação, sua progênie é lançada no meio de crescimento. A suspensão de células é predominantemente de neutrófilos maduros, além de células primitivas e progenitores comprometidos os quais podem ser identificados por ensaios de cultura clonal, como o CFU-C (SPOONCER, ELIANSON e DEXTER, 1993).

Dessa forma, o ensaio de LTBMCM nos permite estudar vários parâmetros hematopoéticos, tais como, fatores de crescimento, mecanismos de ação hematopoéticos e a interferência de drogas tóxicas para o estroma medular (GUEST e UETRECH, 2000).

Os efeitos da infecção por *Listeria monocytogenes* em sistema de cultura líquida de longa duração utilizando medula óssea de camundongos (LTBMCM) foram avaliados. Poucos estudos na literatura tratam dos efeitos de agentes infecciosos sobre o compartimento hematopoético. LAGNEAUX *et al.* 1994, demonstraram que a infecção por *Citomegalovírus* promove uma redução da habilidade das células estromais suportar a hematopoese pela diminuição de fatores estimuladores de colônias (LAGNEAUX, DELFORGE, SNOECK, STRYCKMANS e BRON, 1994), posteriormente descritos com IL-6 e LIF (Fator inibidor de leucemia) (LAGNEAUX *et al.* 1996). Os ensaios realizados demonstraram que a infecção por *Listeria* promove uma acentuada queda do número de CFU-GM em relação ao grupo controle. Essa característica é reflexo da diminuição da capacidade de diferenciação e proliferação destes progenitores. Está bem estabelecido na literatura a importância da interação entre estroma medular e os precursores (DEXTER, 1990; SPOONCER, ELIANSON e DEXTER, 1993). Dessa forma, sugerimos que a infecção tenha a propriedade de impedir este contato físico que é estritamente necessário para a manutenção da hematopoese, visto que ao final das semanas de cultura os animais infectados apresentam uma diminuição significativa dos precursores para granulócitos e macrófagos em relação ao grupo controle. Outras hipóteses para esta redução significativa são: a) produção de fatores inibitórios pelas células estromais que interferem negativamente nas células hematopoéticas ou; b) o seqüestro não efetivo dos fatores de crescimento presentes no meio pelas células estromais desencadeado por alterações na superfície celular.

Por outro lado, os animais infectados tratados profilaticamente com as doses de 100 e 250mg/Kg do GTE não apresentaram redução do número de precursores para granulócitos e macrófagos no sobrenadante da cultura. Esta característica é muito interessante visto que o aumento da reserva de progenitores para granulócitos e macrófagos é considerado determinante para a resistência

do animal à *Listeria*. Animais resistentes à *Listeria monocytogenes*, como por exemplo o C57BL, o número de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (GM) na medula óssea é geneticamente maior que em linhagens susceptíveis como o BALB/c (CHEERS e McKENZIE, 1978). Outra diferença entre animais susceptíveis e resistentes é o número de receptores para CSF-1 nos progenitores para GM. Os animais resistentes apresentam maior número de receptores para CSF-1 em sua superfície do que os animais susceptíveis. Dessa forma, os animais resistentes são capazes de gerar mais GM maduros (CHEERS *et al.* 1988). O aumento da expressão de receptores para CSFs e a geração de maior quantidade de CSFs podem ser fatores determinantes das alterações provocadas pelo GTE.

Esta manutenção da capacidade de proliferação e diferenciação dos precursores para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) promovida pelo GTE em LTBMCM de animais infectados, pode estar relacionada a manutenção do contato físico entre o estroma medular e as células hematopoéticas, a um aumento dos fatores estimuladores de colônias hematopoéticas e a uma maior expressão de receptores para estes fatores.

Além de investigações sobre fatores de crescimento e mecanismos de ação hematopoéticos, a LTBMCM permite avaliar a interferência de drogas tóxicas para o estroma medular (GUEST e UETRECH, 2000). Neste contexto, através do estudo da viabilidade celular e da contagem de células aderentes em cultura, verificamos que o GTE não demonstrou toxicidade sobre o estroma medular (Tabela 5).

O mecanismo de ação pelo qual o GTE exerce sua atividade imunomoduladora ainda não está completamente esclarecido. No entanto, os mecanismos descritos neste trabalho como a regulação hematopoética, aumento da atividade lítica de células NK, o aumento da proliferação de linfócitos e a polarização da resposta imunológica para Th1 são de fundamental importância na ação antibacteriana do GTE.



Conclusões

9. CONCLUSÕES

A partir dos experimentos realizados podemos concluir que o GTE:

- ☒ Possui atividade antibacteriana *in vivo* por um mecanismo hemato/imunomodulador;
- ☒ As doses do GTE com eficácia terapêutica foram 100 e 250mg/Kg, aumentando a resistência dos animais à uma dose letal de *Listeria monocytogenes* (LM) em 33% e 50% de sobrevivência, respectivamente;
- ☒ Embora as doses de 500 e 1000mg/Kg tenham protegido os animais infectados com dose letal de LM revelaram elevada toxicidade;
- ☒ Estimula o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos na medula óssea de camundongos infectados nas doses de 100 e 250 mg/Kg,;
- ☒ Impede a hematopoese extramedular e esplenomegalia induzida pela infecção bacteriana no baço dos animais infectados com as três doses estudadas (50, 100 e 250mg/Kg);
- ☒ As doses de 100 e 250mg/Kg de GTE aumentam a atividade estimuladora de colônias hematopoéticas (CSA) no soro de animais tratados e infectados com dose subletal de LM nos estágios iniciais da infecção;
- ☒ Embora a dose de 50mg/Kg do extrato não tenha garantido a proteção de animais infectados, percebemos uma interferência tardia no compartimento hematopoético com esta dosagem;
- ☒ Aumenta a atividade citotóxica de células NK em todos os períodos analisados com as doses de 100 e 250mg/Kg do extrato;
- ☒ Estimula a proliferação de linfócitos nos períodos de 48 e 72h após a infecção nas doses de 100 e 250mg/Kg do extrato; adicionalmente, a maior dose interfere na proliferação de linfócitos nas primeiras 24h de infecção;
- ☒ Induz aumento de IFN- γ e diminuição de IL-10 em cultura de células esplênicas;
- ☒ Estimula a geração de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) provenientes das células não aderentes da cultura líquida de longa duração;
- ☒ Não é tóxico para o estroma medular em sistema de cultura líquida de longa duração.

A Figura 16 ilustra o mecanismo imunomodulador proposto neste estudo. Em suma, o aumento de CSF nas primeiras 24h de infecção induzido pelo GTE promove uma pronta mobilização de fagócitos circulantes e teciduais para o sítio de proliferação microbiana. Os fagócitos ativados irão ativar células NK que respondem produzindo IFN- γ que juntamente com a supressão de IL-10 promovem a polarização da resposta imunológica para Th1.

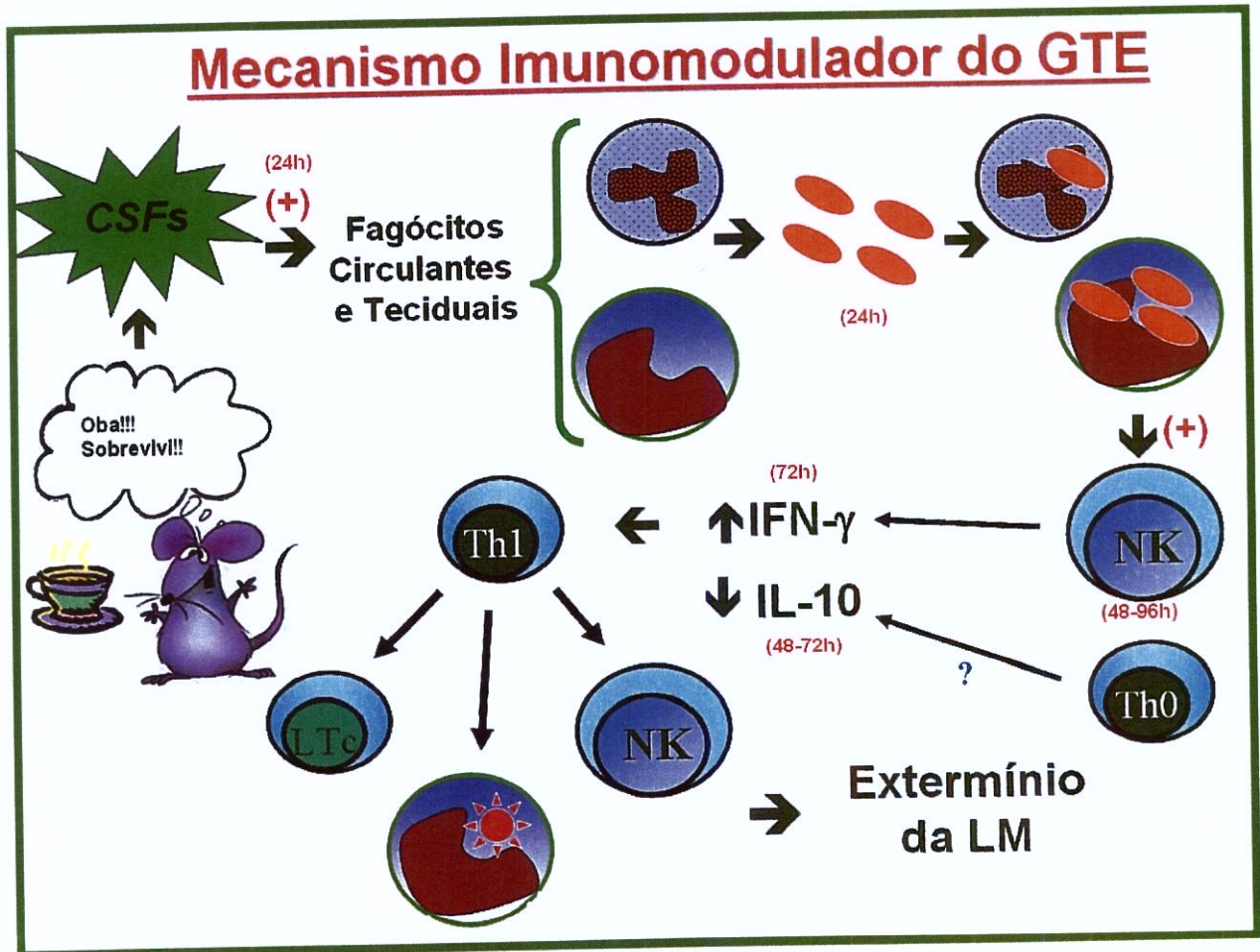
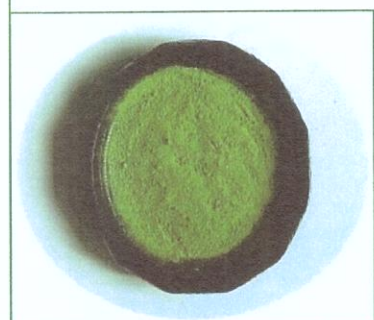


Figura 16: Mecanismo imunohematopoético do GTE



Referências bibliográficas

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B. & BAUTISTA, D. A. Antibacterial activity of green tea polyphenols against *Escherichia coli* K12. **Nahrung-Food**, 44: (1) 60, 2000.
- BECKERMAN, K. P., *et al* Release of nitric oxide during the T cell-independent pathway of macrophage activation. **Journal of Immunology**, 150:888,1993.
- BRAUN, L. & COSSART, P. Interactions between *Listeria monocytogenes* and host mammalian cells. **Microbes and Infections**, 2: 803, 2000.
- BUCHMEIER, N. A. & SCHEREIBER, R. D. Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 82:7404, 1985.
- CHEERS C & STANLEY E R. Macrophage production during murine listeriosis: colony-stimulating factor 1 (CSF-1) and CSF-1-binding cells in genetically resistant and susceptible mice. **Infection and Immunity**. 56 (11): 2972-2978, 1988.
- CHEERS, C. & MCKENZIE, I.F.C. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: genetics of listeriosis. **Infection and Immunity**, 19(3): 755-62, 1978.
- CHEERS, C., HAIGH, A. M., KELSO, A. METCALF, D., STANLEY, E. R and YOUNG, M. Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage-, and multi-CSFs. **Infection and Immunity**, 56: 247, 1988.
- CIFONE M G, ULISSE S & SANTONI A. Natural killer cells and nitric oxide. **International Immunopharmacology**, 1 (8), 1513-1524, 2001.
- COLLET, D. Modeling survival data in medical research. In: **Texts in statistical science**. London, Chapman & Hall, 1, 1994.
- CONLAN, J. W.& NORTH, R. J. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. **Journal Experimental Medicine**, 174:741, 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 Experimental Medicine**, 179:259, 1994.

- COSSART, P. & BIERNE, H. The use of host cell machinery in pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. **Current Opinion in Immunology**, 13: 96, 2001.
- CZUPRINSKY C J & HAA-FRENDSCHO M. Non-specific resistance mechanisms to listeriosis: implications for experimental and naturally occurring infection. **Immunol. Rev.** 158, 47-56, 1997.
- CZUPRYNSKI C J, HENSON P M & CAMPBELL P A. Killing of *Listeria monocytogenes* by inflammatory neutrophils and mononuclear phagocytes from immune and nonimmune mice. **J Leukoc Biol.** 35(2), 193-208, 1984.
- CZUPRYNSKI, C. J., *et al.* Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. **Journal of Immunology**, 152:1836, 1994.
- DAUGELAT S, LADEL CH, FLESCHE I & KAUFMANN SH. Activation of natural killer cells by heat-killed *Listeria monocytogenes* requires additional signals from lymphoid cells. **Immunology Letters**, 50 (1-2), 81-85, 1996.
- DEXTER M. **Hematopoietic Growth Factors: Review of biology and clinical potential**, Gardiner-Cadwell Communication, United Kingdom, 1990.
- DUFRESNE, C. & FARNWORTH, E. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea **Journal of Nutritional Biochemistry**, 12: 404, 2001.
- DUFRESNE, C. & FARNWORTH, E. Tea, kombucha and health: a review. **Food Research International**, 33: 409, 2000.
- EDELSON, B. T. & UNANUE. E. R. Immunity to *Listeria* infection **Current Opinion Immunology**, 12(4), 425, 2000.
- FARGEAS, C. *et al.* Differential effect of transforming growth factor beta on the synthesis of Th1- and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes. **European Journal of Immunology**, 22:2173, 1992.
- FERRICK, D. A. *et al.* Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gdT cells in vivo. **Nature**, 373:255, 1995.
- FLESCHE, I. E. A. & KAUFMANN, S. H. E. Checkpoints in antibacterial immunity. **Int. Immunol.**, 6:463, 1994.
- GUEST I & UETRECH J. Drugs toxic to the bone marrow that target the stromal cells. **Immunopharmacology**, 46 (2), 103-112, 2000.
- GUPTA, S., *et al.* Growth inhibition, cell-cycle dysregulation and induction of apoptosis by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate in androgen and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 164: 82, 2000.

- HOBIRA, N. *et al.* A pilot-study of japanese green tea as a medicament – antibacterial and bactericidal effects. **Journal of Endodontics**, 17: (3) 122, 1991.
- HU ZQ, TODA M, OKUBO S, HARA Y & SHIMAMURA T. Mitogenic activity of (-)-epigallocatechin gallate on B-cells and investigation of its structure-function relationship. **International Journal Immunopharmacology**, 14(8), 1399-1407, 1992.
- IIZAWA Y, BROWN JF & CZUPRYNSKI CJ. Early expression of cytokine mRNA in mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**.60 (10), 4068-73, 1992.
- JUSTO G. Z., SILVA, M. R. & QUEIROZ, M. L. S. Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal ehrlich ascites tumor transplantation in mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 23(1), 119-132, 2001.
- KAMATH AB, WANG L, DAS H, LI L, REINHOLD VN, BUKOWSKI JF. Antigens in tea-beverage prime human Vgamma 2Vdelta 2 T cells in vitro and in vivo for memory and nonmemory antibacterial cytokine responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 100 (10): 6009-6014, 2003.
- KATIIYAR, S. K., *et al.* Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate may be associated with alterations in IL-10 and IL-12 production. **Carcinogenesis**, (20) 11: 2117, 1999.
- KAUFMANN, S. H. E. *et al.* Interferon-gamma production by *Listeria monocytogenes*-specific T-cells active in cellular anti-bacterial immunity. **European Journal of Immunology**, 13: 265, 1983.
- KAUFMANN, S. H. E. Immunity to intracellular bacteria. **Annual Review of Immunology**, 11: 129, 1993.
- KAUFMANN, S. H. E.. & DELIBERO, G. Antigen-specific cyt-2+ cytolytic lymphocytes-T from mice infected with the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* **Journal of Immunology**, 137: 2688, 1986.
- KENNEDY, D. O., *et al.* Cellular thiols status and cell death in the effect of green tea polyphenols in Ehrlich ascite tumor cells. **Chemico-Biological Interactions**, 122: 59, 1999.
- KURODA, Y. & HARA, Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. **Mutation Research**, 436: 69, 1999.
- LAGNEAUX L, DELFORGE A, SNOECK R, BOSMANS E, MOREAU JF, TAUPIN JL, DE CLERCQ E, STRYCKMANS P & BRON D. Human cytomegalovirus increases constitutive

- production of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor by bone marrow stromal cells. **Blood**, 87 (1), 59-66, 1996.
- LAGNEAUX L, DELFORGE A, SNOECK R, STRYCKMANS P & BRON D. Decreased production of cytokines after cytomegalovirus infection of marrow-derived stromal cells. **Experimental Hematology**, 22 (1), 26-30, 1994.
- MANNERING S I, ZHONG J & CHEERS C. T-cell activation, proliferation and apoptosis in primary *Listeria monocytogenes* infection. **Immunology**, 106 (1), 87-95, 2002.
- MATSUNAGA K, KLEIN TW, FRIEDMAN H, YAMAMOTO Y. Epigallocatechin gallate, a potential immunomodulatory agent of tea components, diminishes cigarette smoke condensate-induced suppression of anti-*Legionella pneumophila* activity and cytokine responses of alveolar macrophages. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 9: (4) 864-871, 2002.
- MATSUNAGA K, KLEIN TW, FRIEDMAN H, YAMAMOTO Y. *Legionella pneumophila* replication in macrophages inhibited by selective immunomodulatory effects on cytokine formation by epigallocatechin gallate, a major form of tea catechins. **Infection and Immunity**, 69: (6) 3947, 2001.
- McLAUCHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis **Food Control**, 7: 187, 1996.
- MIELKE, M. E. A.; EHLERS, S. & HAHN, H. The role of cytokines in experimental listeriosis. **Immunobiology**, 189: 285, 1993.
- MIN, Z. & PEIGEN, X. Quantitative analysis of the active constituents in green tea. **Phytotherapy Research**, 05: 239, 1991.
- MIRANDOLA, L., JUSTO, G.Z. & QUEIROZ, M.L.S. Modulation by *Acanthospermum australe* extracts of the tumor induced hematopoietic changes in mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 24(2), 275-288, 2002.
- MITSCHER, *et al.* Chemoprotection: a review of the potential therapeutic antioxidant properties of green tea (*Camellia sinensis*) and certain of its constituents. **Medicinal Research Reviews**, 17:327, 1997.
- MOCCI S, DALRYMPLE A S, NISHINAKAMURA R & MURRAY R. The cytokine stew and innate resistance to *L. monocytogenes*. **Immunol. Rev.** 158, 107-114, 1997.
- MOMBAERTS, P., *et al.* Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. **Nature**, 365: 53, 1993.
- PILLAI, S. P., *et al.* The ability of certain antimutagenic agents to prevent development of antibiotic resistance. **Mutation Research**, 496: 61, 2001.

- QUEIROZ ML, JUSTO GZ, VALADARES MC & PEREIRA-DA-SILVA FR. Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 23(3), 367-382, 2001.
- QUEIROZ ML, RODRIGUES AP, BINCOLETO C, FIGUEIREDO CA & MALACRIDA S. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. **International Immunopharmacology**, 3 (6), 889-900, 2003.
- QUEIROZ, M.L.S.; QUADROS, M.R. & SANTOS, L.M.B. 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, 2000.
- RENNICK D, YANG C & GEMMELL L. Control of hemopoiesis by a bone marrow stromal cell clone: lipopolysaccharide- and interleukin-1-inducible production of colony-stimulating factors. **Blood**. 69 (2), 682-691, 1987
- ROGERS, H. W. *et al.* Endogenous IL-1 is required for neutrophil recruitment and macrophage activation during murine listeriosis. **Journal of Immunology**, 153: 2093, 1994.
- ROGERS, H. W., *et al.* Interleukin-1 participates in the development of anti-*Listeria* response in both normal and scid mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89: 1011, 1992.
- SAKANAKA, S., *et al.* Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 90: (1) 81, 2000.
- SATO, T. & MIYATA, G. The nutraceutical benefit, part I: green tea. [Review]. **Nutrition**, 16: 315, 2000.
- SPOONER E, ELIANSO J & DEXTER M. **Hematopoiesis: A practical approach**, NG Testa and G Molineux, Oxford, University press New York, 1993.
- TODA, M., *et al.* The bactericidal activity of tea and coffee. **Letters in Applied Microbiology**, 8: 123, 1989.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and its role in the generation of TH-1 cells. **Immunology Today**, 14: 335, 1993.
- VALADARES, M.C. & QUEIROZ, M. L. S. The effect of a Titanocene Dichloride derivative, Ti IV (C₅H₅)₂ NCS₂, on the haematopoietic response of Ehrlich tumour-bearing mice. **European Journal of Pharmacology**, 439 (1-3), 35-42, 2002.
- VAN DEN ENGH, G. J. & BOL, S. The presence of a CSF enhancing activity in the serum of endotoxin treated mice. **Cell Tiss. Kinet.**, 8: 579, 1975.

- WING EJ, BARCZYNSKI LC, WAHEED A & SHADDUCK RK. Effect of *Listeria monocytogenes* infection on serum levels of colony-stimulating factor and number of progenitor cells in immune and nonimmune mice. **Infection and Immunity**. 49 (2): 325-328, 1985.
- WING, E. J. & GREGORY, S. H. An updated model of cell-mediated immunity--listeriosis: clinical and research aspects. **Allergy Asthma Proc.**, 21(4), 209, 2000.
- WING, E. J.; WAHEED, A. & SHADDUCK, R. K. Changes in serum colony-stimulating factors and monocytic progenitor cells during *Listeria monocytogenes* infection in mice. **Infection and Immunity**, 45: 180-184, 1984.
- WOOD, S., N. MAROUSHEK, & C. J. CZUPRYNSKI. Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line. **Infection and Immunity**. 61:3068-3072. 1993.
- YAM, T. S., *et al.* Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*) and of tea components. **Fems Microbiology Letters**, 152: (1) 169, 1997.
- YAN Y S. Effect of Chinese tea extract on immune function of mice bearing tumor and their antitumor activity. **Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi**, 26 (1), 5-7, 1992.
- YANG, C. S. & WANG, Z-Y. Tea and cancer: a review **Journal of the National Cancer Institute**, 85: 1038, 1993.
- YEN, G.-C. & CHEN, H.-Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43: 27, 1995.
- ZVETKOVA E, WIRLEITNER B, TRAM NT, SCHENNACH H, FUCHS D. Aqueous extracts of *Crinum latifolium* (L.) and *Camellia sinensis* show immunomodulatory properties in human peripheral blood mononuclear cells. **International Immunopharmacology**, 1: (12) 2143-2150, 2001.



Apêndices

Tabela 6: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c. *L. monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e a avaliação hematopoética foi realizada 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.

Parâmetros $\times 10^3$

n	C	T	I24	I48	I72	T+I24	T+I48	T+I72
1	18,40	7,83	17,80	4,30	7,50	15,00	10,70	4,83
2	16,40	21,30	16,30	4,90	7,00	10,30	18,20	16,60
3	21,00	13,20	15,00	4,00	7,50	10,80	7,51	15,20
4	16,40	19,10	17,80	4,30	7,50	9,10	10,70	5,04
5	18,40	13,40	16,30	4,90	7,00	4,30	7,51	5,04
6	16,40	13,10	15,00	4,00	7,50	6,50	18,60	21,60
MD	17,83	14,65	16,37	4,40	7,33	9,33	12,2	11,38
DP	1,83	4,83	1,25	0,41	0,26	3,70	5,0	7,34

Tabela 7: Efeitos do tratamento com doses diárias de 100mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c. *L. monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e a avaliação hematopoética foi realizada 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.

Parâmetros $\times 10^3$

n	C	T	I24	I48	I72	T+I24	T+I48	T+I72
1	18,40	23,40	17,80	4,30	7,50	29,00	13,20	11,00
2	16,40	25,00	16,30	4,90	7,00	16,20	14,00	9,40
3	21,00	13,20	15,00	4,00	7,50	16,20	18,40	15,00
4	16,40	14,20	17,80	4,30	7,50	16,20	15,00	16,00
5	18,40	17,20	16,30	4,90	7,00	18,60	25,00	25,00
6	16,40	25,00	15,00	4,00	7,50	14,00	17,00	24,00
MD	17,83	19,66	16,37	4,40	7,33	16,36	17,10	16,73
DP	1,83	5,45	1,25	0,41	0,26	1,25	4,32	6,50

Tabela 8: Efeitos do tratamento com doses diárias de 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c. *L. monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e a avaliação hematopoética foi realizada 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.

Parâmetros $\times 10^3$

n	C	T	I24	I48	I72	T+I24	T+I48	T+I72
1	18,40	27,50	17,80	4,30	7,50	16,20	25,30	14,20
2	16,40	12,70	16,30	4,90	7,00	6,00	18,20	18,20
3	21,00	17,40	15,00	4,00	7,50	16,20	24,80	20,40
4	16,40	12,00	17,80	4,30	7,50	27,00	20,30	12,40
5	18,40	7,40	16,30	4,90	7,00	11,30	12,40	17,50
6	16,40	27,50	15,00	4,00	7,50	27,00	19,30	33,00
MD	17,83	17,41	16,37	4,40	7,33	17,28	20,05	19,28
DP	1,83	8,43	1,25	0,41	0,26	8,41	4,75	7,31

Tabela 9: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de camundongos BALB/c. *L. monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e a avaliação hematopoética foi realizada 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.

Parâmetros $\times 10^2$

n	C	T	I24	I48	I72	T+I24	T+I48	T+I72
1	4,90	2,70	6,50	78,00	48,00	1,26	6,48	16,20
2	5,40	4,30	7,70	48,00	58,00	1,89	5,76	16,20
3	3,20	2,30	6,80	84,00	59,00	5,40	4,68	11,30
4	5,40	1,40	6,50	78,00	48,00	4,32	2,97	20,20
5	4,90	3,20	7,70	48,00	58,00	4,32	3,60	7,30
6	5,40	5,00	6,80	84,00	48,00	4,32	5,76	4,86
MD	4,87	3,15	7,00	70,00	53,16	3,59	4,88	12,68
DP	0,85	1,32	0,56	17,25	5,67	1,62	1,37	5,89

Tabela 10: Efeitos do tratamento com doses diárias de 100mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos do baço de camundongos BALB/c. *L. monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e a avaliação hematopoiética foi realizada 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.

Parâmetros $\times 10^2$

n	C	T	I24	I48	I72	T+I24	T+I48	T+I72
1	4,90	1,80	6,50	78,00	48,00	3,60	3,78	2,25
2	5,40	2,90	7,70	48,00	58,00	3,00	7,56	4,40
3	3,20	1,30	6,80	84,00	59,00	4,30	11,80	0,60
4	5,40	2,90	6,50	78,00	48,00	1,80	2,20	2,25
5	4,90	1,30	7,70	48,00	58,00	6,50	4,30	2,25
6	5,40	5,40	6,80	84,00	48,00	4,70	2,70	2,25
MD	4,87	2,60	7,00	70,00	53,16	3,98	5,39	2,33
DP	0,85	1,55	0,56	17,25	5,67	1,60	3,66	1,21

Tabela 11: Efeitos do tratamento com doses diárias de 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos do baço de camundongos BALB/c. *L. monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e a avaliação hematopoiética foi realizada 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.

Parâmetros $\times 10^2$

n	C	T	I24	I48	I72	T+I24	T+I48	T+I72
1	4,90	0,90	6,50	78,00	48,00	1,35	12,24	3,60
2	5,40	3,80	7,70	48,00	58,00	2,20	12,24	4,68
3	3,20	5,00	6,80	84,00	59,00	0,80	8,10	7,29
4	5,40	2,90	6,50	78,00	48,00	4,32	6,48	1,89
5	4,90	3,60	7,70	48,00	58,00	2,2	8,10	1,98
6	5,40	0,90	6,80	84,00	48,00	4,32	2,20	4,32
MD	4,87	2,85	7,00	70,00	53,16	2,54	8,23	3,96
DP	0,85	1,65	0,56	17,25	5,67	1,48	3,78	2,00

Tabela 12: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o peso do baço de camundongos BALB/c. *L. monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o peso do baço foi mensurado 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.

Parâmetros $\times 10^{-2}$

n	C	T	I24	I48	I72	T+I24	T+I48	T+I72
1	9,00	7,00	20,00	16,00	28,00	10,00	13,00	20,00
2	10,00	9,00	8,00	17,00	17,00	10,00	13,00	18,00
3	9,00	7,00	20,00	18,00	17,00	10,00	11,00	19,00
4	10,00	8,00	8,00	16,00	28,00	11,00	9,00	7,00
5	10,00	6,00	20,00	17,00	17,00	9,00	11,00	11,00
6	12,00	5,00	20,00	18,00	14,00	8,00	10,00	11,00
MD	10,00	7,00	16,00	17,00	20,10	9,66	11,20	14,33
DP	1,09	1,41	6,19	0,89	6,17	1,03	1,60	5,35

Tabela 13: Efeitos do tratamento com doses diárias de 100mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o peso do baço de camundongos BALB/c. *L. monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o peso do baço foi mensurado 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.

Parâmetros $\times 10^{-2}$

n	C	T	I24	I48	I72	T+I24	T+I48	T+I72
1	9,00	6,00	20,00	16,00	28,00	13,00	18,00	14,00
2	10,00	8,00	8,00	17,00	17,00	10,00	15,00	14,00
3	9,00	10,00	20,00	18,00	17,00	8,00	17,00	14,00
4	10,00	7,00	8,00	16,00	28,00	11,00	10,00	19,00
5	10,00	6,00	20,00	17,00	17,00	12,00	13,00	24,00
6	12,00	11,00	20,00	18,00	14,00	13,00	13,00	22,00
MD	10,00	8,00	16,00	17,00	20,10	11,16	12,66	14,00
DP	1,09	2,09	6,19	0,89	6,17	1,94	2,58	1,09

Tabela 14: Efeitos do tratamento com doses diárias de 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre o peso do baço de camundongos BALB/c. *L. monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o peso do baço foi mensurado 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.

Parâmetros $\times 10^{-2}$

n	C	T	I24	I48	I72	T+I24	T+I48	T+I72
1	9,00	10,00	20,00	16,00	28,00	9,00	21,00	15,00
2	10,00	9,00	8,00	17,00	17,00	7,00	24,00	13,00
3	9,00	8,00	20,00	18,00	17,00	10,00	13,00	20,00
4	10,00	10,00	8,00	16,00	28,00	7,00	13,00	15,00
5	10,00	9,00	20,00	17,00	17,00	8,00	16,00	08,00
6	12,00	11,00	20,00	18,00	14,00	10,00	12,00	15,00
MD	10,00	9,50	16,00	17,00	20,10	8,50	12,66	12,33
DP	1,09	1,04	6,19	0,89	6,17	1,37	0,51	3,44

Tabela 15: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a produção de fatores estimuladores de colônias hematopoéticas (CSF) no soro de camundongos BALB/c. *L. monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o soro foi obtido 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.

Unidades de CSF/mL

n	C	T	I24	I48	I72	T+I24	T+I48	T+I72
1	0,90	0,132	0,80	13,50	6,20	0,20	6,70	15,70
2	1,30	0,132	1,50	14,30	6,80	0,20	7,50	13,80
3	0,80	0,134	0,20	11,80	5,50	0,30	10,70	16,20
4	0,70	0,130	1,20	14,00	6,50	0,30	6,70	15,70
5	1,20	0,132	0,70	12,70	7,30	0,20	7,50	13,80
6	0,50	0,132	0,30	12,30	5,80	0,30	10,70	16,20
MD	0,90	0,13	0,78	13,10	6,35	0,25	8,30	15,23
DP	0,30	0,001	0,50	0,99	0,66	0,05	1,89	1,13

Tabela 16: Efeitos do tratamento com doses diárias de 100mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a produção de fatores estimuladores de colônias hematopoéticas (CSF) no soro de camundongos BALB/c. *L. monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o soro foi obtido 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.

Unidades de CSF/mL

n	C	T	I24	I48	I72	T+I24	T+I48	T+I72
1	0,90	1,32	0,80	13,50	6,20	12,07	20,00	7,89
2	1,30	1,32	1,50	14,30	6,80	12,07	20,00	7,89
3	0,80	1,22	0,20	11,80	5,50	13,00	21,00	8,00
4	0,70	1,34	1,20	14,00	6,50	11,25	22,00	7,70
5	1,20	1,25	0,70	12,70	7,30	11,30	18,00	6,00
6	0,50	1,50	0,30	12,30	5,80	14,10	17,00	11,00
MD	0,90	1,32	0,78	13,10	6,35	12,29	19,66	8,08
DP	0,30	0,09	0,50	0,99	0,66	1,08	1,86	1,61

Tabela 17: Efeitos do tratamento com doses diárias de 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a produção de fatores estimuladores de colônias hematopoéticas (CSF) no soro de camundongos BALB/c. *L. monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o soro foi obtido 24, 48 e 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.

Unidades de CSF/mL

n	C	T	I24	I48	I72	T+I24	T+I48	T+I72
1	0,90	5,92	0,80	13,50	6,20	12,50	16,44	6,60
2	1,30	5,92	1,50	14,30	6,80	12,50	16,44	6,70
3	0,80	6,00	0,20	11,80	5,50	13,00	15,00	7,00
4	0,70	5,99	1,20	14,00	6,50	11,00	16,00	7,80
5	1,20	5,60	0,70	12,70	7,30	10,50	17,00	6,50
6	0,50	4,99	0,30	12,30	5,80	9,90	18,00	6,00
MD	0,90	5,74	0,78	13,10	6,35	11,57	16,48	6,76
DP	0,30	0,39	0,50	0,99	0,66	1,27	1,00	0,60

Tabela 18: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a atividade lítica de células NK em camundongos BALB/c. *L. monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio de citotoxicidade foi realizado 48 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.

% de citotoxicidade

n	C	T50	T100	T250	I	T50+I	T100+I	T250+I
1	21,50	30,20	35,70	34,00	48,30	65,00	65,30	65,30
2	22,50	3,03	36,00	33,40	44,70	61,00	66,40	66,40
3	21,50	30,20	35,70	34,00	48,30	65,00	66,00	66,00
4	22,50	30,30	36,00	33,40	44,70	62,00	68,00	68,00
5	21,50	30,20	35,70	34,00	48,30	66,00	68,00	68,00
6	22,50	30,30	36,00	33,40	44,70	66,00	66,00	66,00
MD	22,00	25,70	35,85	33,70	46,50	52,50	64,16	66,61
DP	0,54	11,10	0,16	0,32	1,97	3,50	2,13	1,12

Tabela 19: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a atividade lítica de células NK em camundongos BALB/c. *L. monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio de citotoxicidade foi realizado 72 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.

% de citotoxicidade

n	C	T50	T100	T250	I	T50+I	T100+I	T250+I
1	21,50	30,20	35,70	34,00	35,00	47,00	55,10	62,50
2	22,50	3,03	36,00	33,40	40,00	46,00	52,10	56,80
3	21,50	30,20	35,70	34,00	35,00	48,60	47,00	51,70
4	22,50	30,30	36,00	33,40	40,00	48,70	52,00	48,30
5	21,50	30,20	35,70	34,00	35,00	46,00	48,00	62,50
6	22,50	30,30	36,00	33,40	40,00	46,00	48,00	56,80
MD	22,00	25,70	35,85	33,70	37,5	47,05	50,36	56,43
DP	0,54	11,10	0,16	0,32	2,73	1,29	3,18	5,69

Tabela 20: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a atividade lítica de células NK em camundongos BALB/c. *L. monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio de citotoxicidade foi realizado 96 horas após infecção. n=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.

% de citotoxicidade

n	C	T50	T100	T250	I	T50+I	T100+I	T250+I
1	21,50	30,20	35,70	34,00	29,00	26,80	38,00	38,00
2	22,50	3,03	36,00	33,40	26,00	33,00	35,00	39,00
3	21,50	30,20	35,70	34,00	29,00	27,00	39,00	41,00
4	22,50	30,30	36,00	33,40	26,00	35,30	36,00	45,50
5	21,50	30,20	35,70	34,00	29,00	33,00	38,00	45,50
6	22,50	30,30	36,00	33,40	26,00	33,00	39,00	41,00
MD	22,00	25,70	35,85	33,70	27,50	31,35	37,50	41,66
DP	0,54	11,10	0,16	0,32	1,64	3,56	1,64	3,18

Tabela 21: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/ animal, sobre a proliferação de linfócitos de camundongos BALB/c. *L. monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio de proliferação foi realizado 24 horas após infecção. N=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.

% de proliferação

n	C	I	T50	T100	T250	T50+I	T100+I	T250+I
1	102,71	109,80	93,70	108,00	114,20	110,40	154,20	179,60
2	96,08	124,53	100,00	106,40	114,20	111,60	116,50	144,40
3	99,16	109,80	105,50	112,00	155,10	107,00	110,10	130,90
4	100,20	109,80	93,70	108,00	104,10	109,00	118,20	149,00
5	102,05	124,53	100,00	106,40	155,10	102,00	111,60	195,20
6	99,74	109,80	105,50	112,00	155,10	110,40	110,10	130,90
MD	99,99	114,71	99,73	108,80	132,96	108,40	120,11	155,00
DP	2,35	7,60	5,28	2,57	24,52	3,50	17,03	26,57

Tabela 22: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/ animal, sobre a proliferação de linfócitos de camundongos BALB/c. *L. monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio de proliferação foi realizado 48 horas após infecção. N=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.

% de proliferação

n	C	I	T50	T100	T250	T50+I	T100+I	T250+I
1	102,71	85,23	93,7	108,00	114,20	95,40	89,70	95,10
2	96,08	75,23	100,00	106,40	114,20	94,30	85,00	93,10
3	99,16	66,9	105,50	112,00	155,10	82,70	97,10	96,00
4	100,20	67,81	93,70	108,00	104,10	88,20	103,50	96,90
5	102,05	76,06	100,00	106,40	155,10	89,90	97,10	97,70
6	99,74	66,96	105,50	112,00	155,10	82,70	103,50	97,70
MD	99,99	73,03	99,73	108,80	132,96	88,86	95,98	96,08
DP	2,35	7,27	5,28	2,57	24,52	5,47	7,42	1,77

Tabela 23: Efeitos do tratamento com doses diárias de 50, 100 e 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/ animal, sobre a proliferação de linfócitos de camundongos BALB/c. *L. monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio de proliferação foi realizado 72 horas após infecção. N=6. P<0,05 ANOVA-Tukey.

% de proliferação

n	C	I	T50	T100	T250	T50+I	T100+I	T250+I
1	102,71	102,00	93,70	108,00	114,20	95,70	116,70	137,80
2	96,08	103,5	100,00	106,40	114,20	121,40	103,80	133,50
3	99,16	90,00	105,5	112,00	155,10	102,00	107,00	112,10
4	100,20	89,00	93,70	108,00	104,10	95,40	116,20	158,20
5	102,05	88,00	100,00	106,40	155,10	95,70	134,00	115,30
6	99,74	88,00	105,50	112,00	155,10	102,00	135,00	158,50
MD	99,99	93,41	99,73	108,80	132,96	102,03	118,78	135,90
DP	2,35	7,28	5,28	2,57	24,52	9,99	13,18	20,04

Tabela 24: Efeitos do tratamento com doses diárias de 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a produção de IFN- γ em sobrenadante de culturas esplênicas (ConA 48h) de camundongos BALB/c. A *Listeria monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio foi realizado 24, 48 e 72 horas após infecção. n=5. P<0,05, Kruskal-Wallis não paramétrico ANOVA.

(pg/mL)

n	C	T	I24	T+I24	I48	T+I48	I72	T+I72
1	425,40	426,20	426,00	426,80	427,20	455,00	426,40	429,30
2	425,30	428,40	425,90	426,80	426,80	450,00	426,40	429,60
3	425,60	426,60	426,80	427,10	428,30	445,00	426,30	429,60
4	425,60	426,70	426,30	426,60	428,20	444,00	426,30	429,60
5	425,50	426,10	426,80	426,90	427,30	445,80	425,90	430,20
MD	425,48	426,80	426,36	426,84	427,56	447,96	426,26	429,66
DP	0,13	0,93	0,42	0,18	0,65	4,55	0,20	0,32

Tabela 25: Efeitos do tratamento com doses diárias de 250mg/Kg de GTE por 7 dias consecutivos anteriores à inoculação de 1×10^3 bactérias/animal, sobre a produção de IL-10 em sobrenadante de culturas esplênicas (ConA 24h) de camundongos BALB/c. A *Listeria monocytogenes* foi inoculada 3 horas após o término do tratamento e o ensaio foi realizado 24, 48 e 72 horas após infecção. n=5. P<0,05, Kruskal-Wallis não paramétrico ANOVA.

(pg/mL)

n	C	T	I24	T+I24	I48	T+I48	I72	T+I72
1	9,20	8,60	8,30	8,90	9,20	7,60	8,60	7,80
2	8,70	8,70	8,50	8,70	8,90	7,70	8,60	8,10
3	8,70	8,90	8,60	8,70	8,70	7,80	8,80	8,20
4	8,60	8,60	8,50	8,70	8,70	7,90	8,90	7,80
5	8,90	8,60	8,50	9,00	8,70	8,30	8,60	7,70
MD	8,82	8,68	8,48	8,8	8,84	7,86	8,70	7,92
DP	0,23	0,13	0,10	0,14	0,21	0,27	0,14	0,21

Tabela 26: Efeitos de diferentes doses do GTE sobre o número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) em Cultura Líquida de Longa Duração (LTBMC) de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes*. Os animais foram previamente tratados durante sete dias anteriores à inoculação da bactéria e o ensaio realizado 48h após a infecção. Os animais controle receberam apenas o veículo da droga. O ensaio de CFU-GM foi realizado a partir da 1ª semana após o repovoamento (5ª semana). (n=3, p<0,05, ANOVA – Tukey)

5ª Semana - Número de CFU-GM totais

n	C	T50	T100	T250	I	T50+I	T100+I	T250+I
1	303,00	276,00	343,00	450,00	204,00	246,00	305,00	360,00
2	342,00	230,00	343,00	452,00	171,00	200,00	250,00	400,00
3	279,00	258,00	324,00	398,00	165,00	292,00	360,00	320,00
MD	308,00	254,66	336,66	433,33	180,00	246,00	305,00	360,00
DP	31,79	23,18	10,96	30,61	21,00	46,00	55,00	40,00

6ª Semana - Número de CFU-GM totais

n	C	T50	T100	T250	I	T50+I	T100+I	T250+I
1	121,00	120,00	180,00	192,00	34,00	96,00	120,00	98,00
2	82,00	110,00	150,00	200,00	10,00	92,00	150,00	144,00
3	67,00	100,00	160,00	184,00	22,00	100,00	90,00	118,00
MD	90,00	110,00	163,33	192,00	22,00	96,00	120,00	120,00
DP	27,87	10,00	15,27	8,00	12,00	4,00	30,00	23,06

7ª Semana - Número de CFU-GM totais

n	C	T50	T100	T250	I	T50+I	T100+I	T250+I
1	49,00	65,00	90,00	135,00	4,00	40,00	63,00	77,00
2	67,00	45,00	77,00	142,00	22,00	48,00	57,00	65,00
3	82,00	85,00	103,00	128,00	10,00	32,00	69,00	98,00
MD	66,00	65,00	90,00	135,00	12,00	40,00	63,00	80,00
DP	16,52	20,00	13,00	7,00	9,16	8,00	6,00	16,70

8ª Semana - Número de CFU-GM totais

n	C	T50	T100	T250	I	T50+I	T100+I	T250+I
1	62,00	40,00	50,00	74,00	4,00	25,00	58,00	78,00
2	32,00	45,00	62,00	82,00	2,00	32,00	45,00	67,00
3	41,00	35,00	33,00	58,00	3,00	18,00	68,00	65,00
MD	45,00	40,00	48,33	71,33	3,00	25,00	57,00	70,00
DP	15,39	5,00	14,57	12,22	1,00	7,00	11,53	7,00

9ª Semana - Número de CFU-GM totais

n	C	T50	T100	T250	I	T50+I	T100+I	T250+I
1	21,00	27,00	32,00	74,00	5,00	15,00	35,00	44,00
2	43,00	15,00	40,00	65,00	2,00	15,00	29,00	39,00
3	32,00	39,00	36,00	77,00	2,00	24,00	35,00	41,00
MD	32,00	27,00	36,00	72,00	3,00	18,00	33,00	41,33
DP	11,00	12,00	4,00	6,24	1,73	5,19	3,46	2,51

Tabela 27: Avaliação dos efeitos do tratamento com 50, 100, 250, 500 e 1000mg/Kg de GTE, administrado por sete dias consecutivos, anteriores à inoculação de 1×10^5 bac/animal na sobrevivência de camundongos infectados com dose letal de *L. monocytogenes*. Curva de Kaplan-Maier, Log Rank, $P < 0,05$ em relação ao grupo infectado – (n=20/ por grupo).

Dia	LM	50+LM	100+LM	250+LM	500 + LM	1000 + LM
1º						
2º	7					
3º	10	17			4	3
4º	3	3	13	7	10	10
5º				3	3	
30º			7	10	3	7