

***EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA
Acanthospermum hispidum SOBRE A RESPOSTA
IMUNOLÓGICA***

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica – Ana Claudia Neves Pereira.

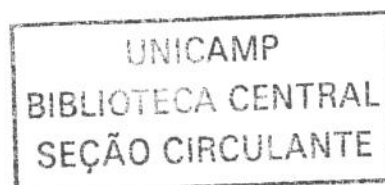
Campinas, 30 de janeiro de 2001.

*Prof. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz
- Orientadora -*

Orientadora: Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz



Campinas, 2001



***EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA
Acanthospermum hispidum SOBRE A RESPOSTA
IMUNOLÓGICA***

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

Orientadora: Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz



UNICAMP

Campinas, 2001

ii

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	88
Nº CHAMADA	TUNICAMP
40442	
V	EX
TOMBO BC	53911
PROC.	124108
C	D
PREÇO	R\$11,00
DATA	29/04/03
Nº CPD	

BIBID. 290745

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

CM00182572-9

P414e

Pereira, Ana Claudia Neves

Efeitos do extrato hidroalcoólico da *Acanthospermum Hispidum* sobre a resposta imunológica / Ana Claudia Neves Pereira. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Mary Luci de Souza Queiroz

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

1. Sistema imune. 2. *Listeria monocytogenes*. 3. Plantas medicinais. 4. Hematopoese. I. Mary Luci de Souza Queiroz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Membros:

1. Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

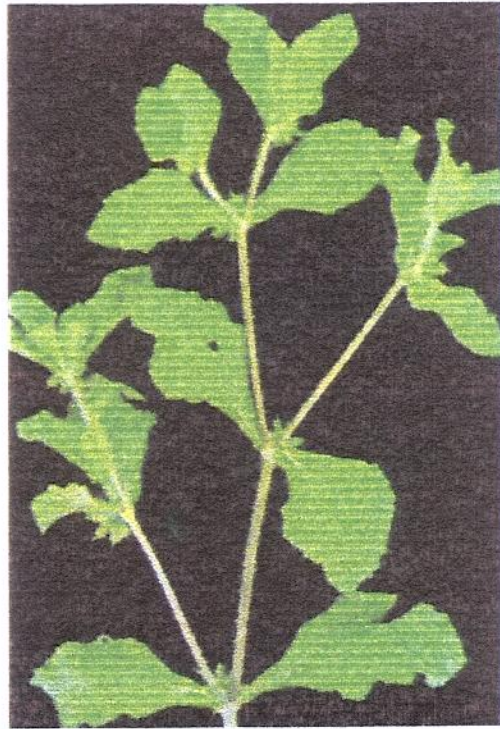
2. Profa. Dra. Nancy Airoidi Teixeira

3. Profa. Dra. Giselle Zenker Justo

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

Data: 30 /01/01

2003-15-191



Acanthospermum hispidum

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, desejo expressar o sentimento de gratidão e respeito à Profa. Dra Mary Luci de Souza Queiroz, orientadora desta Tese, pela oportunidade de crescimento pessoal e realização que me concedeu.

Inesquecivelmente, agradeço à Profa. Dra. Claudia Bincoletto pela abertura deste caminho.

Agradeço também aos colegas e amigos do laboratório: Ana Paula, Adriana, Daniela, Fátima (*in memoria*), Giselle, Luciana, Marize, Sílvia, Solange, Sueli, Raphael, Valdirene, pelas oportunidades de aprendizado, amizade e cooperação recebidas no decorrer de minhas atividades de mestrado.

Aos profissionais do Departamento de Comunicação Social do Hemocamp: Sandrinha e Rosana, por todos os momentos de ajuda e orientação recebidas durante este período de mestrado.

Aos setor de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica desta Universidade pelo auxílio e orientação técnica no desenvolver deste trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Hemocamp, pelo apoio financeiro, o qual foi muito importante para a realização deste trabalho.

À Dra. Alba R. M. Souza Brito pelo auxílio na obtenção do extrato, o qual foi essencial para a elaboração desta tese.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

E a todos àqueles que eventualmente não estejam citados, mas que auxiliaram-me neste trabalho de mestrado.

Muito obrigada.

Dedico este trabalho à FORÇA MAIOR que nos dá sonhos e desejos, mas também nos oferece as oportunidades, impulso e força para realizá-los.

À minha mãe e ao meu pai que foram instrumentos divinos para minha existência e que são fontes de amor e força em minha vida.

Aos amigos que com suas palavras me ajudaram neste período.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	pág. 36
Figura 2	pág. 38
Figura 3	pág. 40
Figura 4	pág. 42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1pág. 61

TABELA 2pág. 62

TABELA 3pág. 63

TABELA 4pág. 64

TABELA 5pág. 65

TABELA 6pág. 66

TABELA 7pág. 67

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
I- INTRODUÇÃO	19
II- OBJETIVOS	25
III- MATERIAIS E MÉTODOS	27
1. Animais	27
2. Obtenção da <i>Acanthospermum hispidum</i>	27
3. <i>Listeria monocytogenes</i>	28
4. Tratamento	29
5. Procedimentos Experimentais	30
5.1. Cultura clonal dos precursores hematopoiético da medula óssea de camundongos (CFC-GM).....	30
5.1.2. Preparação do fator estimulador do crescimento de colônias (CSF). Meio Condicionado de células Esplênicas (SCM).....	31
5.2. Realização da curva de sobrevida.....	32
6. Metodologia Estatística	33
IV- RESULTADOS	34
1. Efeitos do tratamento com EHA <i>A.hispidum</i> sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea	35
2. Efeitos do tratamento com EHA <i>A.hispidum</i> sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos do baço	37

3. Efeitos do EHA <i>A.hispidum</i> sobre o peso do baço	39
4. Efeitos do EHA <i>A.hispidum</i> na sobrevivência de animais infectados pela <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	41
V- DISCUSSÃO	44
VI- CONCLUSÕES	49
VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
VIII- APÊNDICE	61

Resumo

Neste trabalho tivemos como objetivo a investigação dos efeitos do extrato hidroalcoólico da *Acanthospermum hispidum* (EHA *A.hispidum*) sobre o crescimento e diferenciação das células progenitoras hematopoiéticas para a série granulócitos-macrófagos (CFU-GM) da medula óssea e do baço, em animais infectados com *Listeria monocytogenes*.

Para a realização dos experimentos camundongos Balb/c foram tratados oralmente por cinco dias com EHA *A.hispidum* nas doses de 100, 500 ou 1000mg/kg/dia. Ao final do tratamento, os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (1×10^5 /animal) e sacrificados 48 e 72 horas após a infecção. Os animais somente infectados apresentaram uma diminuição no número de colônias de precursores hematopoiéticos (CFU-GM) na medula nas 48 (I-48h) e 72 (I-72h) horas após a infecção. A administração das 3 diferentes doses de EHA *A.hispidum* aos animais normais conduziu a uma diminuição dose-dependente do CFU-GM da medula em relação ao grupo controle. Os animais tratados/infectados com as três diferentes doses de EHA *A.hispidum* nas 48 (TI-48h) e 72 (TI-72h) horas após a infecção, mantiveram a diminuição provocada pela infecção no número de CFU-GM da medula óssea da infecção, sendo que esta diminuição foi mais acentuada no período de 72 horas após a infecção.

Com relação à hematopoiese esplênica, a inoculação de uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* levou a um aumento no número de CFU-GM no baço nas 48 e 72 horas após a infecção. Os animais normais tratados com as 3 diferentes doses de EHA *A.hispidum* tiveram um aumento no número de CFU-GM do baço em relação ao grupo controle. Os animais tratados/infectados (TI-48h) com as três diferentes doses de EHA *A.hispidum* mantiveram o número de CFU-GM do baço quando comparado ao grupo infectado (I-48h). Após 72 horas, os grupos tratados/infectados (TI-72h) com as doses de 100 e 500mg/kg de EHA *A.hispidum* apresentaram uma diminuição no número de CFU-GM em relação ao infectado (I-72h), enquanto

que o grupo tratado com a dose de 1000 mg/kg de EHA *A.hispidum*, neste mesmo período de infecção apresentou aumento significativo no número de CFU-GM em relação a todos os demais grupos.

O peso do baço dos animais tratados com as doses de 500 e 1000mg/kg de EHA *A.hispidum* aumentou em relação ao grupo controle. A infecção produziu aumento no peso do baço nas 48 e 72 horas em relação ao controle, sendo que os animais infectados (I-48h) tiveram aumento superior aos dos infectados (I-72h). Valores normais foram observados nos animais tratados/infectados (TI-48h) com 100, 500 e 1000mg/kg de EHA *A.hispidum*. Porém, nos animais tratados/infectados (TI-72h) com as 3 doses o peso do baço não variou em relação ao grupo infectado (I-72h).

Com o objetivo de verificar a resistência à infecção dos animais previamente tratados com as 3 diferentes doses do extrato hidroalcoólico de *Acanthospermum hispidum* realizamos uma curva de sobrevida com camundongos Balb/c infectados com uma dose letal de *L.monocytogenes*. Após 30 dias de observação, 30% dos animais tratados com a dose de 100mg/kg, e 60% dos animais tratados com 500 e 1000 mg/kg sobreviveram a dose letal da *L.monocytogenes*, enquanto que 100% dos animais do grupo controle infectado morreram em seis dias.

Nossos resultados sugerem que o EHA *A.hispidum* aumenta a resistência dos camundongos Balb/c infectados com a *L. monocytogenes* através de mobilização dos precursores hematopoiéticos medulares que se alojam no baço.

Summary

The objective of this work was to investigate the effects of *A. hispidum* hidroalcoholic extract (*A. hispidum* HAE) on the growth and differentiation of granulocyte-macrophage hematopoietic progenitor cells (CFU-GM) from the bone marrow and spleen of mice infected with *L. monocytogenes*.

In this study, groups of Balb/c mice were treated orally for 5 days with 100, 500 or 1000mg/kg/ day of *A. hispidum* HAE. At the end of the treatment, mice were infected intraperitoneally with a sublethal dose of *L. monocytogenes* (1×10^5 bacteria/animal) and sacrificed 48 or 72 hours after infection. The administration of the 3 different doses of *A. hispidum* HAE to normal mice led to a dose-dependent decrease in the number of CFU-GM in the bone marrow in relation to control. A decrease in the number of CFU-GM in the bone marrow of infected mice at 48 (I-48h) and 72 (I-72h) hours after infection was observed, when compared with control. The effect observed in bone marrow CFU-GM number of infected mice was maintained when mice were pre-treated with the 3 different doses of *A. hispidum* HAE, however the decrease was more accentuated at 72 hours after infection.

Treatment with these 3 doses of *A. hispidum* HAE enhanced the number of CFU-GM in the spleen of normal mice, in relations to controls. A significant increase of splenic CFU-GM was also observed in infected mice.

At 48 hours after the infection, the animals previously treated with the 3 different doses of *A. hispidum* HAE kept the number of CFU-GM at the infected (I-48h) level. At 72 hours, the groups treated/infected mice with the doses of 100 and 500mg/kg after infection had a decrease in the number of CFU-GM in relation to infected group (I-72h), while, infected mice pre-treated with 1000mg/kg showed an increase in the number of splenic CFU-GM over the levels of infection.

Spleen weight also increased in the groups of 500 and 1000mg/kg of *A. hispidum* HAE in relation to control. The infection also increased the spleen weight at both periods after infection. A decrease was observed in groups with the 3 doses of *A. hispidum* HAE at 48 hours after infection, whereas at 72 hours, no changes were produced in the spleen weight of infected mice when mice were pre-treated with the 3 doses.

We analyzed the mice resistance previously treated with the 3 different doses of *A. hispidum* HAE and infected with a lethal dose of *L. monocytogenes* (3×10^5 bacteria/animal) and observed during 30 days after infection. Thirty percent of the 100mg/kg treated mice and 60% of 500mg/kg and 1000 mg/kg treated mice survived, while 100% of control mice died into 6 days.

Based on these findings, we suggest that *A. hispidum* HAE may induce mobilization of hematopoietic precursors from the bone marrow to the spleen, thus increasing the resistance of *L. monocytogenes* infected mice.

I. Introdução

Plantas medicinais têm sido utilizadas como fontes importantes para a descoberta de novas drogas. No Brasil, existe cerca de 120 mil espécies vegetais das quais, acredita-se que 20% tenham propriedades medicinais. Destas, apenas cerca de 3 mil espécies foram estudadas do ponto de vista fitoquímico e/ou farmacológico (BARATA, 1991; SOUZA BRITO & SOUZA BRITO, 1993). A Organização Mundial de Saúde estima que 80% da população utiliza plantas para o tratamento de doenças primárias (WHO, 1993). A investigação destas plantas permite a descoberta de novos fármacos e muitas vezes a elucidação do mecanismo de ação de uma substância até então pouco estudada.

Acanthospermum hispidum (Asteraceae - Compositae) é uma planta herbácea, ereta, com 50 - 90 cm de altura (LEITÃO FILHO *et al.*, 1972). É amplamente distribuída nas áreas tropicais da África e América do Sul (SUMMERFIELD & SAALMÜLLER, 1998) mas ocorre também em todo o continente e em outras áreas do mundo; no Brasil é encontrada em todo o território, com maior ou menor incidência, sendo vulgarmente conhecida como carrapicho- de- carneiro, chifre- de- veado (LEITÃO FILHO *et al.*, 1972; KISSMAN, 1978) e espinho de cigano (CAETANO *et al.*, 1990).

A. hispidum é amargotônica, aromática e mucilaginosa (MEDEIROS *et al.*, 1988), sendo muito usada na medicina tradicional brasileira como anti-asmática, antitussígena, diurética, febrífuga, sudorífica, tônica e diaforética, e é usada ainda no tratamento de bronquite, dor de garganta, hematúria e gonorréia (CAETANO *et al.*, 1990; MESSIAS *et al.*, 1994). Na maioria das indicações populares a planta é utilizada na forma de chá ou xarope, com variações das partes utilizadas de acordo com a doença. As folhas da *A. hispidum* são usadas na medicina tradicional em Benin, África, também para terapia de doenças infecciosas (SUMMERFIELD & SAALMÜLLER, 1998). Por outro lado, esta planta apresenta indícios de toxicidade em animais

quando ingerida em grandes quantidades durante um longo período de tempo (ALI & ADAM, 1978^a, 1978^b, LEMÔNICA & ALVARENGA, 1994)

Com relação às ações sobre microrganismos patogênicos, o extrato aquoso bruto da raiz *in vitro*, apresentou atividade antibacteriana especialmente contra *Staphylococcus aureus* e menos relevante contra *Salmonella* e *E.coli*. Os mesmos resultados não foram observados com o extrato hidroalcoólico da raiz (1:1), que também apresentou baixo índice de toxicidade (CAETANO et al, 1990). Da *A.hispidum* foram isolados sesquiterpenóides e compostos fenólicos que apresentam atividade anti-cancerígena e citotóxica (JAKUPOVIC et al., 1986; DI STASI et al., 1989). Além destes foram isolados catecolaminas, cumarinas, flavonas, flavononas, leucoantocianidinas, saponinas e xantonas (CAETANO et al., 1990).

Considerando os aspectos citados acima, utilizamos o modelo de infecção pela *Listeria monocytogenes* em camundongos, o qual tem sido extensivamente utilizado no estudo da interação entre parasita e hospedeiro para avaliação da resposta imunológica mediada por células (MACKANESS, 1962; HAHN & KAUFMANN, 1981).

Listeria monocytogenes é um bacilo gram-positivo que pertence ao grupo das bactérias facultativas intracelulares. Seu habitat preferido são os macrófagos e os hepatócitos. A infecção caracteriza-se por duas fases distintas. Uma fase inicial de imunidade inespecífica, onde há predominância da resposta dos neutrófilos, macrófagos e células “natural killers” (NK) e, uma fase mais tardia, onde há envolvimento das células T, que é o fator mais importante para ativação do potencial antibacteriano dos macrófagos (MACKANESS & BLANDEN, 1967; MACKANESS & HILL, 1969; NORTH et al., 1974), conduzindo a uma imunidade com completa erradicação do patógeno no hospedeiro (ROGERS et al., 1995). Após a injeção intravenosa de uma dose subletal de *L. monocytogenes* em camundongos, os microrganismos são

rapidamente removidos da corrente sangüínea em menos de uma hora pelas células do fígado (células de Kupffer) e 60-80% são inativados durante as primeiras 8-12 horas após a infecção (CONLAN & NORTH, 1991). A maioria das bactérias vivas irão se alojar no baço (MACKANESS, 1962), onde haverá crescimento da bactéria sem interrupção durante as primeiras 24 horas (NORTH & CONLAN, 1998). Após este período, mecanismos independentes das células T levam a redução do número bacteriano. Os polimorfonucleares, monócitos teciduais e células NK atuam no local da infecção através de fatores liberados pelos próprios fagócitos infectados, como o interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tecidual (TNF), IL-1, IL-6, IL-8 e C5a (BAGGIOLINI et al. 1989, BANCROFT et al., 1989, SERUSHAGO et al., 1992; ROGERS et al., 1992; PFEFFER et al., 1993; KOPF et al., 1994); formando o foco inflamatório (NORTH, 1970; ROSEN et al., 1989). A migração das células fagocitárias originárias da medula óssea ao local da replicação da bactéria é um componente essencial à resposta primária à *L. monocytogenes* (NORTH, 1970; BENNET & BAKER, 1977; LEPAY et al., 1985; ROSEN et al., 1989). Animais que não conseguem mobilizar estas células ao local de deposição bacteriana, ou o fazem de forma ineficiente, apresentam uma multiplicação exacerbada no número de *L. monocytogenes* no fígado e um aumento da taxa de mortalidade (STEVENSON, 1981; GERVAIS et al., 1986; ROSEN et al., 1989). Estas células fagocitárias são originárias das células primitivas pluripotenciais da medula óssea, chamadas células formadoras de colônias (CFCs), as quais podem dar origem a qualquer célula sangüínea dependendo do estímulo recebido (METCALF, 1984; QUEIROZ, 1988). Os fatores de crescimento e diferenciação hematopoiéticos são conhecidos como fatores estimuladores de colônia (CSF): G-CSF (granulócitos), M-CSF (macrófagos), GM-CSF (granulócitos e macrófagos) e multi-CSF ou IL-3 (estimula a proliferação de vários tipos de células hematopoiéticas) (CHEERS et al., 1988;

CHEERS & STANLEY, 1988), sendo produzidos em grande quantidade durante a infecção (WING *et al.*, 1984; YOUNG & CHEERS, 1986). Alguns trabalhos demonstram que o M-CSF é o fator em maior concentração possuindo um papel importante na geração e maturação dos fagócitos mononucleares e até mesmo aumentando a atividade bactericida destas células (CHEERS *et al.*, 1988, 1989; CHEERS & STANLEY, 1988; GREGORY *et al.*, 1992). Níveis séricos deste fator estão diretamente relacionados com a dose de bactéria administrada e com o aumento da migração das células da medula óssea, entretanto, parecem correlacionar inversamente com o número bacteriano presente no fígado e no baço dos animais (WING *et al.*, 1985, 1987; YOUNG & CHEERS, 1986; CHEERS & STANLEY, 1988). Embora os camundongos susceptíveis à listeriose apresentem elevados níveis de CSFs séricos, o número de precursores hematopoiéticos de medula óssea para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) apresenta-se diminuído no período inicial da infecção, mantendo-se em níveis abaixo do controle por vários dias (WING *et al.*, 1984, 1985).

Embora os macrófagos representem as células efectoras, a presença das células T é essencial para ativar o seu potencial antibacteriano (MACKANESS & BLANDEN, 1967; MACKANESS & HILL, 1969). Todos os três subgrupos de células T, $CD4^+ \alpha\beta$, $CD8^+ \alpha\beta$, e $CD4^- CD8^- \gamma\delta$ contribuem para uma perfeita proteção contra *L. monocytogenes* (MOMBAERTS *et al.*, 1993). As células T $CD4^+ \alpha\beta$ pertencem quase que exclusivamente ao subgrupo Th1 e reconhecem a diversidade de proteínas listeriais apresentadas pelos macrófagos modulando uma reação de hipersensibilidade do tipo tardio (KAUFMANN *et al.*, 1987; MIELKE *et al.*, 1988; BEATTIE *et al.*, 1991; DAUGELAT *et al.*, 1994). Estas células são produtoras de IL-2 e IFN- γ (DAUGELAT *et al.*, 1994).

O baço é um órgão hematopoiético secundário onde a bactéria *L. monocytogenes* também migra, sendo assim, é um órgão onde ocorrem as reações do sistema imunológico descritas acima. O efeito mielosupressor observado após a infecção por *L. monocytogenes* está relacionado com a migração das células da medula óssea para os tecidos, com o objetivo de erradicar rapidamente a infecção (WING *et al.*, 1984; YOUNG AND CHEERS, 1986; QUADROS *et al.*, 1999). Corroborando esta afirmação, estudos na literatura demonstram que o número de precursores hematopoiéticos no baço apresenta-se aumentado durante a infecção (WING *et al.*, 1984). Hematopoiese no baço também foi descrita para vários outros processos infecciosos (ALI-KHAN *et al.*, 1978; MIYANOMAE *et al.*, 1982; ASAMI *et al.*, 1992; LAI *et al.*, 1996).

Assim, neste trabalho buscamos avaliar os efeitos do extrato hidroalcoólico da *Acanthospermum hispidum* (EHA *A.hispidum*) sobre o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos para a série granulócito-macrófago (CFU-GM) da medula óssea e baço de camundongos no modelo experimental de infecção por *Listeria monocytogenes*.

II. Objetivos

O presente trabalho tem os seguintes objetivos:

- Avaliar os efeitos do extrato hidroalcoólico da *Acanthospermum hispidum* (EHA *A.hispidum*) sobre a resposta imunológica inata de animais infectados com a *Listeria monocytogenes* e animais não infectados, através da cultura clonal de precursores hematopoiéticos da medula óssea e no baço para granulócitos e macrófagos (CFU-GM).
- Avaliar os efeitos do EHA *A.hispidum* sobre a resistência dos camundongos Balb/c à uma dose letal da *Listeria monocytogenes*.

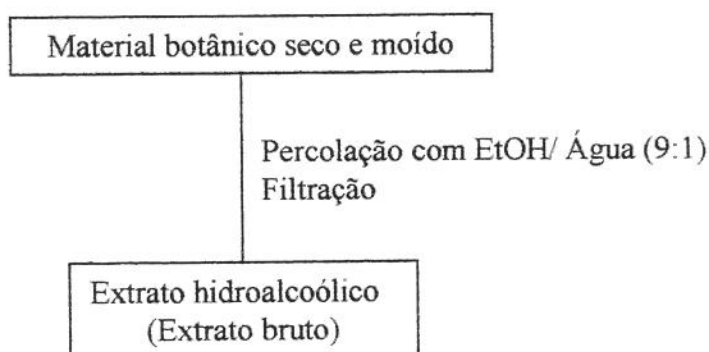
III. Materiais e Métodos

1. Animais

Foram utilizados camundongos machos, com idade entre 6 e 10 semanas da linhagem Balb/c, susceptíveis a infecção por *Listeria monocytogenes*. Estes animais foram criados e fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP.

2. Obtenção da *Acanthospermum hispidum*

A planta *Acanthospermum hispidum* teve suas partes aéreas e raízes trituradas após secas ao sol. O resultado da trituração passou por processo de extração por percolação em solução de etanol: água (9:1). Em seguida, esta solução foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida a 45°C em rotaevaporador, resultando o extrato bruto hidroalcoólico.



O EHA da *A.hispidum* foi diluído em solução de 10% de etanol 70° em água destilada a $\pm 40^{\circ}\text{C}$.

3. *Listeria monocytogenes*

A bactéria *Listeria monocytogenes* utilizada para infectar os animais é um cocobacilo gram-positivo, anaeróbico facultativo, móvel por flagelos peritríquios a temperatura ambiente e facilmente cultivável em ágar-sangue. Esta cepa foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica – Hospital de Clínicas desta Universidade. Após sua aquisição, a bactéria foi submetida a vários testes bioquímicos que confirmaram sua identidade. Os testes realizados demonstraram o seguinte:

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

Rhodococcus equi- negativo

Para provocar infecção nos animais foi necessário determinar o número ideal de microrganismos a ser injetado. A dose ideal não deveria provocar a morte do animal muito rapidamente para que fosse possível a realização dos experimentos após a infecção. A bactéria foi mantida em meio de cultura BHI e incubada por 24-48 horas a 37° C. Os repiques foram feitos com alça de platina em placas de Petri contendo meio ágar- sangue, e novamente incubados a 37° C por 24-48 horas. As colônias obtidas nas culturas frescas de ágar – sangue foram diluídas

em salina e as concentrações determinadas por espectrofotometria através da Escala de McFarland (Colbas).

Para manutenção da patogenicidade da bactéria a mesma foi periodicamente repassada sucessivamente por 25 vezes em camundongos, como descrito a seguir. Os camundongos foram inoculados intraperitonealmente com a bactéria diluída em solução salina 0.9%. Quarenta e oito horas após a inoculação da bactéria os baços foram isolados em ambiente estéril, macerados e mantidos em BHI por 24 –48 horas e, logo após, a bactéria isolada em ágar - sangue. Após o seu isolamento, diluições da mesma foram realizadas até atingir a concentração apropriada para uso.

Para avaliação da sobrevida, 3×10^5 microrganismos/animal foram inoculados intraperitonealmente. Para o estudo dos parâmetros imunológicos e hematológicos a dose subletal de 1×10^5 bactérias/animal foi utilizada.

4. Tratamento

A administração do extrato hidroalcoólico da *Acanthospermum hispidum* foi realizada por via oral com auxílio de uma sonda, após sua dissolução em 10% de álcool 70° e água destilada $\pm$ 40°C. Os animais foram divididos em grupos que receberam 100, 500 ou 1000mg/kg/ dia num volume total de 0.2 mL de extrato por animal, por um período de 5 dias. Três horas após o término do tratamento os grupos infectados receberam a bactéria intraperitonealmente num volume de 0,2 mL por animal. Os parâmetros imunológicos foram avaliados nos períodos de 48 e 72 horas após a infecção.

5. Procedimentos experimentais

Para as avaliações imunológicas *in vivo* e *in vitro* utilizou-se a técnica de cultura clonal em meio semi-sólido dos precursores hematopoiéticos de medula óssea e do baço (CFU-GM).

5.1. Cultura clonal dos precursores hematopoiéticos da medula óssea e do baço de camundongos (CFU – GM)

Sacrificou-se o animal por deslocamento cervical e limpou-se a pele com álcool 70%. Expôs-se o fêmur e removeu-se a cartilagem sobre o orifício na extremidade distal cortando-se o osso na junção superior. Transferiu-se a medula óssea com auxílio de agulha e seringa (com 1ml de RPMI-1640 (Sigma Chemical Co, USA)) para um tubo contendo 4 ml de meio de cultura RPMI-1640. Removeu-se assepticamente o baço e transferiu-se para tubos de ensaio estéreis, contendo 5 ml de meio RPMI-1640. As células foram liberadas cuidadosamente, utilizando-se um macerador.

Contou-se número de células na suspensão medular em câmara hemacitométrica após diluição (1:10) em líquido de TURK. A suspensão de células do baço contou-se nesta mesma câmara após uma diluição (1:10) em salina e após em líquido de Trypan 0,2%.

Preparou-se o meio de cultura semi-sólida que consiste de 30% de meio DMEM (Sigma) 2x concentrado, 20% de soro bovino fetal inativado e 50% de ágar (0.3%) (Bacto-ágar-Difco). A seguir, adicionou-se ao meio o volume apropriado suspensão celular a 37⁰ C, correspondendo a 1x10⁵ e 2x10⁵ células/mL para avaliação da mielopoiese medular e periférica respectivamente. Ressuspendeu-se e distribuiu-se a cultura em volume de 2 mL em cada placa de Petri (35 mm), a qual já continha 0,1 mL do fator estimulador de colônias (SCM – item 5.1.2) apropriado.

Deixou-se gelificar e incubou-se por 7 dias, a 37^o C, em presença de 5% de CO₂. Após este período, contou-se o número de colônias formadas em microscópio de dissecção com aumento de 40x.

5.1.2. Preparação do Fator Estimulador do Crescimento de Colônias (CSF). Meio Condicionado de Células Esplênicas (SCM)

- Baços de alguns camundongos Balb/c foram removidos sob condições assépticas e passados delicadamente através de peneira de aço inoxidável estéril.
- Preparou-se uma suspensão com 2×10^6 células/mL em meio RPMI- 1640 contendo 10% de soro bovino fetal inativado (30 min. a 56°C). Adicionou-se ao meio 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol (concentração final) e 0,05 ml de “ pokeweed mitogen” por mL de meio. Incubou-se por 7 dias a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO₂ no ar. Centrifugou-se o sobrenadante e filtrou-se em filtros Milipore. A atividade funcional do CSF foi determinada pelo estímulo produzido sobre o crescimento clonal de células progenitoras hematopoiéticas em meio semi-sólido (item 5.1.1). A titulação deste lote de SCM demonstrou que uma diluição de até 1:4 forneceu resultados que estão dentro dos níveis de resposta supramáxima. Os resultados em triplicata da titulação realizada em cultura de 7 dias estão apresentados na tabela 2.

TABELA 2: Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) em presença de células da medula óssea de camundongos Balb/c*

DILUIÇÃO SCM	CFU-C **
1:1	101±2
1:2	90±3
1:4	88±2
1:8	63±1
1:16	48±4
1:32	29±3
1:64	6±4
1:168	0

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

** Resultados expressos como média ± DP

5.2. Realização da curva de sobrevida

Para o estudo dos efeitos do tratamento com EHA *A.hispidum* sobre a sobrevida dos animais infectados pela *Listeria monocytogenes*, três grupos de camundongos (n=20/grupo) foram tratados por cinco dias consecutivos com EHA *A.hispidum* nas doses de 100, 500 ou 1000mg/kg respectivamente, enquanto que um grupo controle recebeu apenas veículo na mesma razão dose:volume dos animais tratados (n=20). No quinto dia todos os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose letal da bactéria (3×10^5 bactérias/animal). Os animais foram observados por 30 dias após a inoculação da bactéria.

6. Metodologia Estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se Análise de Variância (ANOVA) seguida de comparações múltiplas pelo teste Tukey-Kramer.

As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e a análise da probabilidade de sobrevida pelo teste de Log-Rank.

O nível de significância estatística adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

IV. Resultados

1. Efeitos do EHA *A.hispidum* sobre o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea

Os efeitos da administração do EHA *A.hispidum* sobre o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos na medula estão representados na Figura 1 Tabelas 1 e 2 (apêndice).

A inoculação de uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (1×10^5 /animal) levou a uma diminuição do número de colônias de precursores hematopoiéticos (CFU-GM) na medula óssea nas 48 e 72 horas após a infecção. Os camundongos normais tratados com as 3 diferentes doses de EHA *A.hispidum* tiveram uma diminuição acentuada do CFU-GM da medula em relação ao grupo controle. Os animais tratados/infectados com as três diferentes doses de EHA *A.hispidum*, nas 48 e 72 horas após a infecção, mantiveram uma diminuição no número do CFU-GM da medula óssea em relação ao controle, sendo que esta diminuição foi mais acentuada no período de 72 horas para as doses de 500 e 1000 mg/kg.

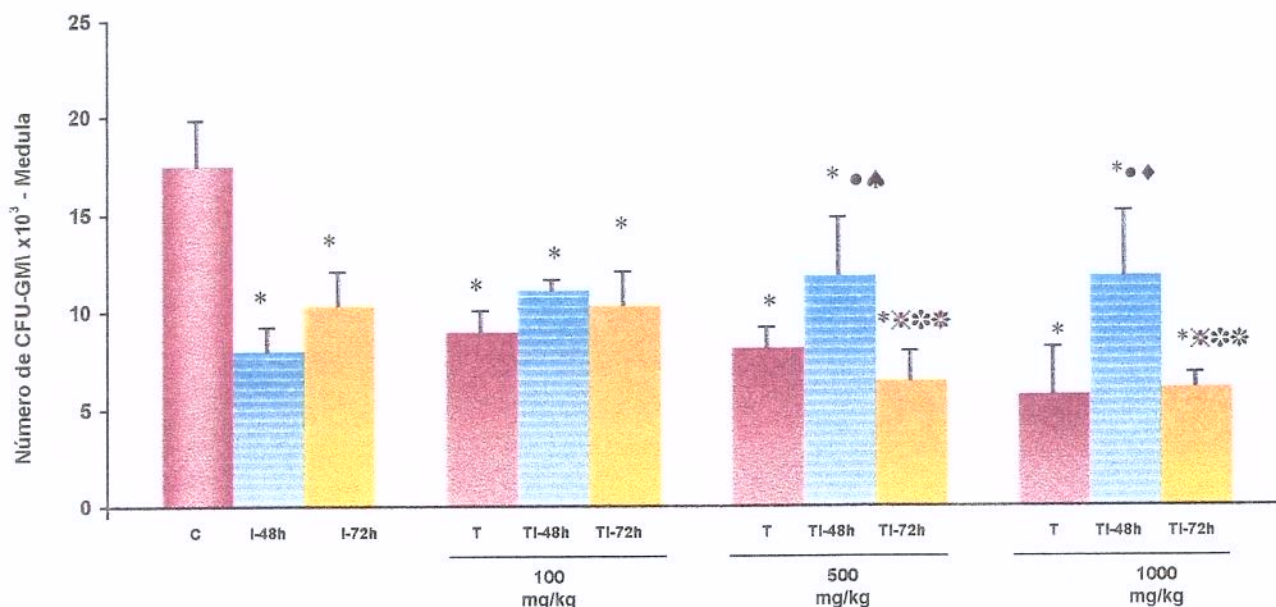


Figura 1. Número de CFU-GM da medula óssea de camundongos tratados por 5 dias consecutivos com 3 diferentes doses de EHA *A.hispidum* (100, 500 e1000 mg/kg) e infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^5 bactérias/animal) 3 horas após o término do tratamento. Os animais foram sacrificados 48 e 72 horas após a infecção. ANOVA- Tukey-Kramer ($p < 0,05$). Os resultados representam a média e DP de 6 animais por grupo. C = controle; T = tratados com EHA *A.hispidum*; TI = tratados e infectados; I = somente infectados.

* = significativo em relação ao controle ; • = significativo em relação ao Infectado (I-48 h); * = significativo em relação ao Infectado (I-72 h); ▲ = significativo em relação ao T500; ♦ = significativo em relação ao T1000; ** = significativo em relação ao TI 100 (TI-72 h); * = significativo em relação ao respectivo TI-48h.

2. Efeitos do EHA *A.hispidum* sobre o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos do baço

Os efeitos da administração do EHA *A.hispidum* sobre o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos do baço estão representados na Figura 2 e tabelas 3 e 4 (apêndice).

Com relação à hematopoiese esplênica, a inoculação de uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (1×10^5 /animal) levou a um aumento no número de CFU-GM no baço nas 48 e 72 horas após a infecção. Os camundongos normais tratados com as 3 diferentes doses de EHA *A.hispidum* tiveram um aumento significativo do CFU-GM do baço em relação ao grupo controle. Os animais tratados/infectados (TI-48h) com as três diferentes doses de EHA *A.hispidum* mantiveram o número de CFU-GM do baço ao nível do grupo infectado (I-48h). Nas 72 horas, os animais tratados/infectados (TI-72h) com as doses de 100 e 500mg/kg de EHA *A.hispidum* apresentaram diminuição no número de CFU-GM em relação ao grupo infectado (I-72h), enquanto que, o tratado/infectado (I-72h) com 1000 mg/kg de EHA *A.hispidum* apresentou aumento em relação a todos os demais grupos.

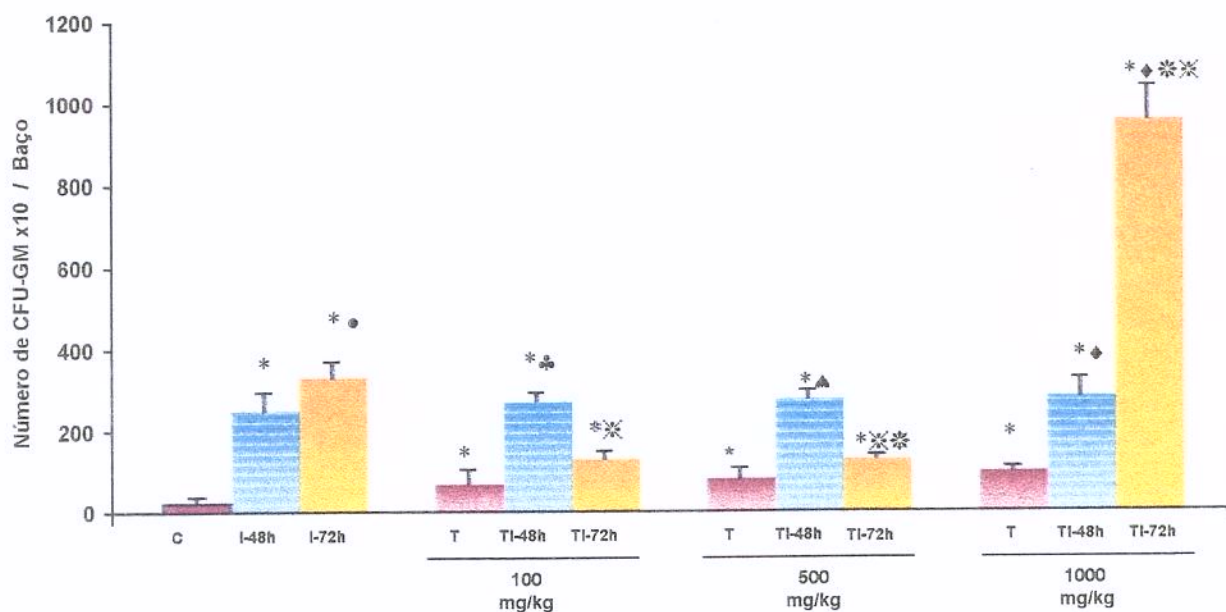


Figura 2. Número de CFU-GM do baço de camundongos tratados por 5 dias consecutivos com 3 diferentes doses de EHA *A.hispidum* (100, 500 e 1000 mg/kg) e infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^5 bactérias/animal) 3 horas após o término do tratamento. Os animais foram sacrificados 48 e 72 horas após a infecção. ANOVA- Tukey-Kramer ($p < 0,05$). Os resultados representam a média e DP de 6 animais por grupo. C = controle; T = tratados com EHA *A.hispidum*; TI = tratados e infectados; I = somente infectados.

* = significativo em relação ao controle; • = significativo em relação ao Infectado (I-48h); ✱ = significativo em relação ao Infectado (I-72 h); ♣ = significativo em relação ao T100; ♠ = significativo em relação ao T500; ♦ = significativo em relação ao T1000; ✱ = significativo em relação ao respectivo TI (I-48h).

3. Efeitos do EHA *A.hispidum* sobre o peso do baço

Os efeitos da administração do EHA *A.hispidum* sobre o peso do baço estão representados na Figura 3 e tabelas 5 e 6 (apêndice).

O peso do baço dos animais tratados com as doses de 500 e 1000mg/kg de EHA *A.hispidum* aumentou em relação ao grupo controle. um aumento no peso dos baços também foi observado nos animais somente infectados nos 2 períodos de observação em relação ao controle. Além disso, o aumento observado nas 48 horas após a infecção foi estatisticamente superior ao nas 72 horas.

Uma redução no peso dos baços aos níveis normais foi observada nos animais infectados e tratados com 100, 500 e 1000mg/kg de EHA *A.hispidum* nas 48 horas após a infecção. Porém, nos animais tratados/infectados com as 3 doses de EHA *A.hispidum* nas 72 horas após a infecção, o peso dos baços aumentou, atingindo um valor similar ao obtido para o grupo somente infectado (I-72h).

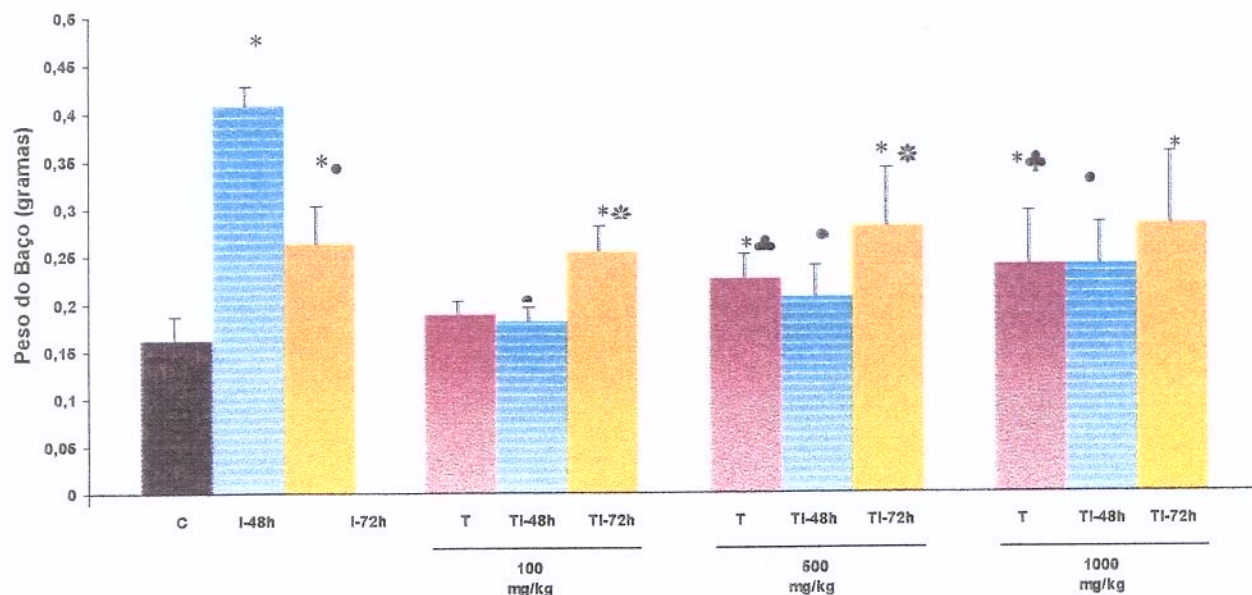


Figura 3. Peso do baço (g) de camundongos tratados por 5 dias consecutivos com 3 diferentes doses de EHA de *A.hispidium* (100, 500 e 1000 mg/kg) e infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^5 bactérias/animal) 3 horas após o término do tratamento. Os animais foram sacrificados 48 e 72 horas após a infecção. ANOVA- Duncan e Tukey-Kramer ($p < 0,05$). Os resultados representam a média e DP de 6 animais por grupo.

C = controle; T = tratados com EAH; TI = tratados e infectados; I = somente infectados.

* = significativo em relação ao controle. • = significativo em relação ao I-48 h. ♣ = significativo em relação ao T100; ** = significativo em relação ao respectivo TI 48h.

4. Efeitos do tratamento com EHA *A.hispidum* na sobrevida de animais infectados pela *Listeria monocytogenes*

Com intuito de avaliar uma possível proteção em relação à infecção nos animais tratados com EHA *A.hispidum* realizou-se uma curva de sobrevida. Considerou-se os seguintes grupos experimentais: animais normais infectados com *Listeria monocytogenes* 3×10^5 / animal e, grupos de animais tratados por 5 dias consecutivos com as 3 diferentes doses do EHA *A.hispidum* e infectados logo após, com a mesma concentração de bactérias. Os grupos foram observados durante 30 dias.

Na Figura 4 e tabela 7, podemos observar os resultados da sobrevida dos animais. Os animais controle possuem mortalidade de 100% com mortes gradativas entre o 2º e 6º dias após a infecção.

Os camundongos tratados previamente com EHA *A.hispidum* apresentaram alterações na resistência contra a *L. monocytogenes*. O grupo tratado com 100mg/kg apresentou uma sobrevida de 30%. Entretanto, os grupos previamente tratados com 500 e 1000 mg/kg apresentaram 60% de sobrevida. É interessante ressaltar que 4 dos 8 animais tratados com a dose de 500mg/kg e infectados que morreram, resistiram até o 17º dia após a infecção, e no grupo tratado com 1000 mg/kg, as mortes iniciaram quando a maioria dos animais controle (80%) somente infectados já haviam morrido, indicando um aumento na resistência dos animais tratados que responderam fatalmente à infecção.

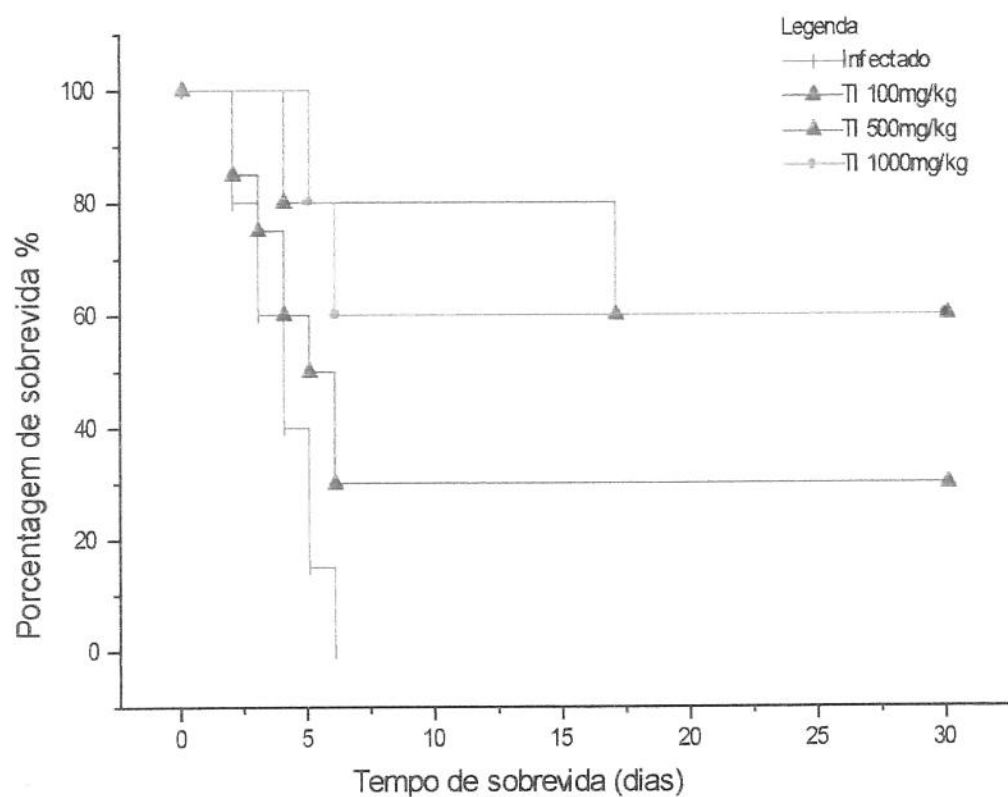


Figura 4: Curva de sobrevivência de camundongos Balb/c (n=20) tratados com 3 diferentes doses de EHA *A.hispidum* durante 5 dias e infectados com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* (3×10^5 bactérias/animal), 3 horas após o término do tratamento. Método Kaplan-Meier, teste Log-rank ($p < 0,001$).

V. Discussão

A *Acanthospermum hispidum* é uma planta que apresenta no uso popular efeitos benéficos contra infecções, embora efeitos tóxicos tenham sido observados quando administrada em altas doses em estudos experimentais. Nos nossos estudos, camundongos Balb/c foram previamente tratados durante 5 dias consecutivos com as doses de 100, 500 e 1000mg/kg de extrato hidroalcoólico de *A.hispidum* (EHA *A.hispidum*) e infectados com *L. monocytogenes*, sendo que às 48 e 72 horas após a infecção avaliamos o número de precursores hematopoiéticos na medula óssea e no baço dos animais. A infecção produz uma diminuição no número de precursores hematopoiéticos para granulócitos-macrófagos (CFU-GM) na medula óssea e um aumento no número desses precursores no baço. Tanto nos animais apenas tratados com o extrato da planta como nos animais tratados/infectados, os resultados demonstraram uma diminuição de 30 a 50% no número de CFU-GM da medula óssea, paralelamente a um aumento de até 45 vezes no número desses precursores no baço em relação ao controle. Concomitante a esses dados, observou-se esplenomegalia nos animais tratados e nos tratados/infectados após 72 horas. Ao realizarmos uma curva de sobrevida utilizando-se uma dose letal de *L. monocytogenes* em animais tratados com as 3 diferentes doses do extrato hidroalcoólico desta planta, constatamos um aumento significativo no índice de sobrevida, que foi dependente da dose utilizada.

Trabalhos realizados em nosso laboratório demonstram que o aumento na sobrevida em camundongos infectados com uma dose letal de *L. monocytogenes* está relacionado ao aumento no número de CFU-GM medular (QUADROS *et al.*, 1999; DANTAS & QUEIROZ, 1999). Entretanto, paralelo ao aumento no índice de sobrevida, nossos animais mantiveram o aumento no número de CFU-GM no baço e a diminuição no número destes na medula, causados pela listeriose. O aumento da resistência de nossos animais deve-se, provavelmente, à hematopoiese esplênica. Está documentado na literatura que a diminuição na hematopoiese da medula é

geralmente acompanhada de hematopoiese extramedular compensatória nesse órgão. Este efeito ocorre devido à migração dos precursores hematopoiéticos da medula pela via sangüínea, produzindo, como consequência, um acúmulo destas células no baço, com aparente esplenomegalia (NILSSON *et al.*, 1994; HAAN *et al.*, 1995; JACKSON *et al.*, 1995; QUESNIAUX *et al.*, 1996; MURRAY *et al.*, 1998; DEGUCHI *et al.*, 1999).

O aumento no número de CFU-GM no baço, principal foco da listeriose (NORTH & CONLAN, 1998), concomitante ao aumento da sobrevivência, sugere que a hematopoiese extramedular pode favorecer a reação do hospedeiro. Em nosso trabalho, os animais apresentaram aumento no número de CFU-GM extramedular também nos grupos apenas tratados, levando-nos a sugerir que este resultado, poderia favorecer a rapidez e eficácia de ação dos granulócitos e macrófagos na defesa do hospedeiro contra a instalação da infecção. Corrobora nossa hipótese o fato de que camundongos resistentes à listeriose apresentam um maior número de células formadoras de colônias (CFCs) no baço em relação aos animais susceptíveis (YOUNG & CHEERS, 1986; CHEERS *et al.*, 1988; CHEERS & STANLEY, 1988).

Observamos na literatura que a resistência à listeriose também está relacionada com a melhor atividade das células de defesa, como por exemplo, maior mobilização e atividade listericida dos macrófagos, além das células CFCs tornarem-se mais sensíveis aos fatores estimuladores de colônias em animais resistentes (CSFs) (STEVENSON *et al.*, 1981; GERVAIS *et al.*, 1986). Assim, sugerimos que concomitante à mobilização dos precursores para o baço, houve maior eficácia de ação dos granulócitos e macrófagos na defesa do hospedeiro provavelmente devido a um aumento na produção de citocinas envolvidas no mecanismo de defesa contra a listeriose.

Durante esse processo infeccioso, está envolvido na resposta inata o recrutamento de neutrófilos que limitam, através de fagocitose e lise, a bactéria ao local da infecção. O G-CSF é um fator relacionado à diferenciação dos neutrófilos e é produzido durante o curso natural da infecção com *L. monocytogenes* (CHEERS *et al.*, 1988), conferindo maior resistência aos animais contra a listeriose devido ao aumento dos fagócitos no local da infecção e do metabolismo oxidativo destas células (SHINOMIYA *et al.*, 1991; SERUSHAGO *et al.*, 1992; KAYASHIMA *et al.*, 1993). Estudos demonstram que a administração de G-CSF aos camundongos conduz a um aumento no número de CFU-GM, peso e celularidade do baço e a uma diminuição destes precursores na medula (PODJA *et al.*, 1990; MOLINEAUX *et al.*, 1990; HAAN *et al.*, 1995).

Durante a resposta inata também ocorre a ativação dos macrófagos. Estas células, estimuladas pela *L. monocytogenes* fagocitada, liberam TNF- α e IL-12 que juntos ativam as células NK a produzirem IFN- γ (KOBAYASHI *et al.*, 1989; STERN *et al.*, 1990; ROGERS *et al.*, 1995). Este por sua vez, juntamente com a IL-1, ativa os macrófagos que expressarão o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II, aumentando assim, a atividade listericida destas células (MACKANESS, 1962; ROGERS *et al.*, 1995; FLESCHE *et al.*, 1995). O macrófago ativado irá secretar mais IL-12, que estimulará a diferenciação das células Th0 em Th1, as quais também produzirão IFN- γ . Concordando com os resultados apresentados neste estudo, consta na literatura que camundongos tratados com IL-12 tiveram uma supressão da hematopoiese medular e, simultaneamente, desenvolveram esplenomegalia causada pela hematopoiese extramedular no baço (TARE *et al.*, 1995; JACKSON *et al.*, 1995). Acredita-se que a IL-12 conduza a mobilização das células progenitoras medulares para a circulação periférica, alojando-as no baço e em outros órgãos como o fígado e o pulmão (JACKSON *et al.*, 1995). Alguns autores sugerem que os efeitos da IL-12 *in vivo* são induzidos por IFN- γ (ENG *et al.*, 1995;

QUESNIAUX & RYFFEL, 1996). Dessa forma, esses dados corroboram nossa hipótese de que a hematopoiese extramedular esteja relacionada com a maior produção de algumas das principais citocinas envolvidas na defesa contra a listeriose.

A propriedade de aumentar a produção de IFN- γ já foi encontrada em uma planta da mesma família da *Acanthospermum hispidum*, a *Dichrocephala bicolor* (Asteraceae) (LIN *et al.*, 1999). Além disso, camundongos da linhagem C57BL/6, resistente à *Listeria*, apresentaram maior expressão de IFN- γ nas células do baço quando comparados a camundongos susceptíveis (IIZAWA *et al.*, 1993). Esses fatos reforçam nossa hipótese de que a proteção apresentada pelo EHA da *A. hispidum* pode estar relacionada também ao aumento de IFN- γ .

O IFN- γ é produzido também pelas células Th1, as quais são essenciais para a erradicação completa da *L. monocytogenes* do hospedeiro (ROGERS *et al.*, 1995). A resposta tardia caracterizada pelo envolvimento das células T, inicia-se no 6º dia após a infecção (MITSUYAMA *et al.*, 1978; MIYATA *et al.*, 1984, KRATZ & KURLANDER, 1988), período em que nossos animais controle já haviam morrido. Assim, a sobrevivência a partir deste período sugere que mecanismos do sistema imune adaptativo (células Th1) se estabeleceram nos animais tratados com EHA *A. hispidum*.

Podemos concluir que o EHA *A. hispidum* é capaz de induzir a mobilização de células hematopoiéticas da medula para o baço. Além disso, o EAH *A. hispidum* poderia estimular e ativar mecanismos da resposta imune inata (neutrófilos/macrófagos/células NK) e adquirida (Th1) no baço durante a infecção, devido à estimulação da produção de alguma das principais citocinas envolvidas na resistência dos animais à listeriose.

VI. Conclusões

- O EHA *A.hispidum* induz a mobilização dos precursores hematopoiéticos da medula óssea para o baço levando a uma defesa imunológica mais rápida após a infecção.
- O EHA *A.hispidum* poderia estimular e ativar mecanismos da resposta imune inata (neutrófilos/macrófagos/células NK) e adquirida (Th1) no baço durante a infecção, devido à estimulação da produção de algumas das principais citocinas envolvidas na resistência dos animais à listeriose.

VII. Referência Bibliográfica

1. ALI B. & ADAM, S. E. - "Effects of Acanthospermum hispidum on goats." **J. Comp. Pathol.** **88**: 533-544, 1978a.
2. ALI B. & ADAM, S. E. - "Toxicity of Acanthospermum hispidum to mice". **J. Comp. Pathol.** **88**: 433-448, 1978b.
3. ALI-KHAN, Z. - "Cellular changes in the lymphoreticular tissues of C57L/J mice infected with *Echinococcus multilocularis* cystis." **Immunology**, **34**: 831, 1978.
4. ASAMI, M., OWHASHI, M; ABE, T. & NAWA, Y. - "A comparative study of the Kinetic changes of hemopoietic stem cells in mice infected with lethal and non letal malaria." **International Journal of Parasitology**, **22**: 43, 1992.
5. BAGGLIOLINI, M; WALZ, A. & KINKEL, S.L. - "Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils." **Journal of Clinical Investigation**, **84**: 1045-1049, 1989.
6. BANCROFT, G.J.; SHEEHAN, K.C.F.; SCHREIBER, R.D. & UNANUE, E.R.- " Tumor necrosis factor is involved in the T cell independent pathway of macrophage activation in scid mice." **Journal of Immunology**, **143**: 127-130, 1989.
7. BARATA, L. - " Plantas medicinais da Amazônia". Boletim apresentado à Fundação Brasileira de Plantas Mediciniais, **9**: 1991.
8. BARNERS, P.F; GRISSO, C.L; ABRAMS, J.S; BAND, H; REA, T.H; MODLIN, R. L. - " γ/δ T lymphocytes in human tuberculosis." **Journal of Infectious Diseases** **165**: 506-512, 1992.
9. BEATTI, I.A.; SWAMINATHAN, B.& ZIEGLER, H.K. - " Cloning and characterization of T cell-reactive protein antigens from *Listeria monocytogenes*." **Infection and Immunity**, **58**: 2792-2803, 1991.
10. BENNETT, M. & BAKER, E.E. " Marrow-dependent cell function in early stages of infection with *Listeria monocytogenes*." **Cellular Immunology**, **33**: 203-210, 1977.

11. CAETANO, N.P; MAIA,B; AFIATPOUR, P; ARAÚJO, E; REGO, L.M; SOUZA, M.A; WANDERLEY, M. & SILVA, N. H. - “ **Resumo de XI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, João Pessoa, p. 322., 1990.
12. CAMARGO, M.T.L.A. - “Medicina Popular. Aspectos Metodológicos Para Pesquisa.” Editora Almed, São Paulo, p. 130, 1985.
13. CHEERS, C.; HAIGH, A.M.; KELSO, A; METCALF, D.; STANLEY, E.R. & YOUNG, A.M. - “ Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separated determinations of macrophages-; granulocyte-; granulocyte-macrophage- and multi-CSFs.” **Infection and Immunity**, **56**: 247-251, 1988.
14. CHEERS, C.; STANLEY, E.R - “ Macrophage production during murine listeriosis: colony-stimulating factor 1 (CSF-1) binding cells in genetically resistant and susceptible mice.” **Infection and Immunity**, **56**: 2972-2978, 1988.
15. CONLAN, J.W; NORTH, R.J - “ Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium.” **Journal of Experimental Medicine**, **174**: 741-744, 1991.
16. DANTAS, D. C. M; QUEIROZ, M.L.S. - “ Effects of *Clorella vulgaris* on bone marrow progenitor cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*.” **International Journal of Immunopharmacology**, **21**: 499-508, 1999.
17. DAUGELAT, S.; LADEL, C.H.; SCHOEL, B.& KAUFMANN, S.H.E. - “Antigen-specific T cell responses during primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection.” **Infection and Immunity**, **62**: 1881-1888, 1994.
18. DEGUCHI, K.; YAGI, H.; INADA, M.; YOSHIZAKI, K.; KISHIMOTO, T.; KOMORI, T.; “ Excessive extramedullary hematopoiesis in Cbfa1-deficient mice with a congenital lack of bone marrow.” **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **255(2)**: 352-359, 1999.
19. DI STASI, L. C., SANTOS, E.M.G. and HIRUMA, C. A. - “ Plantas Medicinais Na Amazônia.” Editora Unesp, São Paulo, 194: 51-52, 1989.

20. ENG, V.M; CAR, B.D; SCHNYDER, B; LORENZ, M; LUGLI, S; AGUET, M; ANDERSON, T.D; RYFFEL, B; QUESNIAUX, V.F. - "The stimulatory effects of interleukin (IL)-12 on hematopoiesis are antagonized by IL-12-induced interferon gamma in vivo." **Journal of. Experimental Medicine**, **181(5)**: 1893-1898, 1995.
21. FLESCHE, I.E.A; HESS, J.H; HUANG, S; AGUET, M; ROTHE, J; BLUETHMANN, H; KAUFFMANN, S.H.E. - "Early interleukin-12 production by macrophages in response to mycobacterial infections depends on interferon- γ and tumor necrosis factor α ." **Journal of. Experimental Medicine**, **181**: 1615-1622, 1995.
22. GERVAIS, A.; MORRIS-HOOKE, A.; TRAN, T.A. & SKAMENE, E.-Analysis of macrophage bacterial function in genetically resistant and susceptible mice using the temperature-sensitive mutant of *Listeria monocytogenes*." **Infection and Immunity**, **54**: 315-321, 1986.
23. GREGORY, S.H.; WING, E.J; TWEARDY, D.J.; SHADDUCK, R.K. & LIN, H.S. - "Primary listerial infections are exacerbated in mice administered neutralizing antibody to macrophage colony-stimulating factor." **Journal of Immunology**, **149**: 188-193, 1992.
24. HAAN, G.; DONTJE, B; ENGEL, C; LOEFFLER, M; NIJHOF, W. - "The kinetics of murine hematopoietic stem cells in vivo in response to prolonged increased mature blood cell production induced by granulocyte colony-stimulating factor". **Blood**, **86(8)**: 2986-2992, 1995.
25. HAHN, H. & KAUFMANN, S.H.E. - "The role of cell-mediated immunity in bacterial infections." **Reviews of Infection Disease**, **3**: 1221-1250, 1981.
26. IIZAWA, Y; WAGNER, R. D; CZUPRYNSKI, C.J. - "Analysis of cytokine mRNA expression in *Listeria*-resistant C57BL/6 and *Listeria*-susceptible A/J mice during *Listeria monocytogenes* infection." **Infection and Immunity**, **61 (9)**: 3739-3744, 1993.
27. JACKSON, J. D; YAN, Y; BRUNDA, M. J; KELSEY, L. S; TALMADGE, J. E; "Interleukin-12 enhances peripheral hematopoiesis in vivo." **Blood**, **85(9)**: 2371-2376, 1995.

28. JAKUPOVIC, J; BARVAH, R.N; BOLHMANN, F; & MSONTHI, J.P. - "Further acanthospermolides from *Acanthospermum hispidum*." **Planta Médica**, **2**: 154-155, 1986.
29. KAUFMANN, S.H.E; HUG,E; VÄTH, U. & DE LIBERO, G. - " Specific lysis of *Listeria monocytogenes* – infected macrophages by class II- restricted L3T4+ T cells." **European Journal of Immunology**, **17**: 237-246, 1987.
30. KAYASHIMA, S; TSURU, S; HATA, N & ROKUTANDA, M. – " Therapeutic effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on the protection against *Listeria* infection in SCID mice." **Immunology**, **80**: 471-476, 1993.
31. KISSMAN, K. G.; "Invasoras na cultura de Soja", vol, 1978 – Basf – SP.
32. KOBAYASHI, M; FITZ, L; RYAN, M; HEWICK, R.M; CLARK, S.C; CHAN, S; LOUDON, R; SHERMAN, F; PERUSSIA, B & TRINCHIERI, G. " Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes." **J. Exp. Med**, **170**: 827-845, 1989.
33. KOPF, M.; BAUMANN, H; FREER, G; FREUDENBERG, M; LAMERS, M; KISHIMOTO, T; ZINKERNAGEL, R; BLUETHMANN, H; KÖHLER, G. - "Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6 deficient mice." **Nature**, **368**: 339-342, 1994.
34. KRATZ, S.S. & KURLANDER, R. - " Characterization of the pattern of inflammatory cell influx and cytokine production during the murine host response to *Listeria monocytogenes*." **Journal of Immunology**, **141**: 598, 1988.
35. LAI, Y.H; HESLAN, J. M; POPPEMA, S; ELLIOT, J.F & MOSMANN, T.R. - "Continuous administration of IL-13 to mice induces extramedullary hemopoiesis and monocytosis" **The Journal of Immunology**, **156**: 3166-3173, 1996.
36. LEITÃO FILHO, H.F; ARANHA, C. & BACCHI, O. - "Plantas invasoras de culturas do Estado de São Paulo", vol. II, 1972, Hucitec. SP.

37. LEMÔNICA, I.P.; & ALVARENGA, C.M.D. - "Abortive and teratogenic effect of *Acanthospermum hispidum* DC. and *Cajanus cajan* (L.) Millps. in pregnant rats." **Journal of Ethnopharmacology** **43**: 34 - 44, 1994.
38. LEPAY, D.A.; STEINMAN, R.M.; NATHAN, C.F.; MURRAY, H.W. & COHN, Z.A.- "Liver macrophages in murine listeriosis: cell mediated immunity is correlated with an influx of macrophages capable of generating reactive oxygen intermediates." **Journal of Experimental Medicine**, **161**: 1503-1512, 1985.
39. LIN, L.C; KUO, Y.C; CHOU, C.J. - "Immunomodulatory principles of *Dichrocephala bicolor*." **J. Nat. Prod.**, **62**: 405-408, 1999.
40. MACKANESS, G.B.- "Cellular resistance to infection." **Journal of Experimental Medicine**, **116**: 381-406, 1962.
41. MACKANESS, G.B. & BLANDEN, R.V. - "Cellular immunity". **Progress in Allergy**, **11**: 89, 1967.
42. MACKANESS, G.B. & HILL, W.C.- The effect anti-lymphocyte globulin on cell-mediated resistance to infection". **Journal of Experimental Medicine**, **129**: 993-1012, 1969.
43. MEDEIROS, I.A.; BRANDÃO, V.J., ROLIM, D.A.L.; AGRA, M.F.; CORTES, S.F.; PAULO, M.Q. & BRITO, A.R.M.S. - " Isolamento dos princípios farmacologicamente ativos sobre o sistema cardiovascular de *Acanthospermum hispidum* (Asteraceae)". São Paulo. **Resumo do X Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, p.7. 1988.
44. MESSIAS, A.S.; NORONHA, C.F.A. - " Avaliação do efeito do composto urbano sobre plantas medicinais cultivadas na estação experimental de Itapirema" – IPA. **Resumo do Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil (061)**, Fortaleza, 1994.
45. METCALF,D.- The hematopoietic colony stimulating factors. New York, Oxford, 1984.

46. MIELKE, M.E.A; EHLERS, S. & HAHN, H. – “T-cell subsets in delayed-type hypersensitivity, protection and granuloma formation in primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection in mice: superior role of Lyt-2 T cells in acquired immunity.” **Infection and Immunity**, **56**: 1920-1925, 1988.
47. MIYANOMAE, T; OKABE, T; MORI, K. J & SETO, A. - “Effects of salmonella infection on hemopoietic stem cells in mice immunized with *Salmonella* vaccines.” **Biomed, Pharmacother.** **36**: 286, 1982.
48. MITSUYAMA, M; TAKEYA, K; NOMOTO, K; & SHIMOTORI, S. - “ Three phases of phagocyte contribution to resistance against *Listeria monocytogenes*.” **J. Gen. Microbiol**, **106**: 165, 1978.
49. MIYAMATA, M; MITSUYAMA, M; OGATA, N. & NOMOTO, K. - “ Protective mechanisms against infection by *Listeria monocytogenes* accumulation and activation of macrophages.” **J. Clin. Lab. Immunol**, **13**: 111, 1984.
50. MOLINEAUX, G; PODJA, Z; DEXTER, T.M.;. – “ A comparision of hematopoiesis in normal and splectomized mice treated with granulocyte colony stimulating factor.” **Blood**, **75 (3)**: 563-569, 1990.
51. MOMBAERTS, P.; AMOLDI, J.; RUSS, F.; TONEGAWA, S. & KAUFMANN, S.H.E. – “Different roles of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in immunity against an intracellular bacterium.” **Nature**, **365**: 53-56, 1993.
52. MURRAY, P.J.; YOUNG, R. A.; DALEY, G. Q. – “Hematopoietic remodeling in interferon-gamma-deficient mice infected with mycobacteria.” **Blood**, **91(8)**: 2914-2924, 1998.
53. NILSSON, S. K.; BERTONCELLO, I. - “Age-related changes in extramedullary hematopoiesis in the spleen of normal and perturbed osteopetrotic (op/op) mice.” **Experimental Hematology** **22(4)**: 377-383, 1994.

54. NORTH, A., NUMATA, A. & MINAGAWA, T. – “Endogenous tumor necrosis factor, interleukin-6, and gamma-interferon levels during *Listeria monocytogenes* infection in mice.” **Journal of Experimental Medicine**, **132**: 521-534, 1970.
55. NORTH, R.J., CONLAN, J.W. - “ Immunity to *Listeria monocytogenes*.” Immunology of Intracellular Parasitism. **Chem. Immunol.** Basel, Karger, vol.70:1-20, 1998.
56. NORTH, R.J., SPITALNY, G. “ Inflammatory lymphocytes in cell-mediated antibacterial immunity: Factors governing the accumulation of mediator T cells in peritoneal exudates”. **Infection and Immunity** **10**: 489-498,, 1974.
57. PFEFFER, K.; MATSUYAMA, T.M.; WAKEHAM, A.; KISHIHARA, K.; SHAHININ, A.; WEGMANN, K.; OHASHI, P.S.; KRONKE, M. & MARK, T.W. - “ Mice infected deficient for the 55 kD tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. **Cell**, **73**: 457-467, 1993.
58. PODJA, Z; MOLINEAUX, G; & DEXTER, M.– “ Hemopoietic effects of short-term in vivo treatment of mice with various doses of rhG-CSF.” **Experimental Hematology**, **18**: 27-31, 1990.
59. QUADROS, R.M; SOUZA BRITO, A. R. M; QUEIROZ, M. L.S. “ *Petiveria alliacea* L. extract protects mice against *Listeria monocytogenes* infection – effects on bone marrow progenitor cells.” **Immunopharmacology & Immunotoxicology**, **21**(1): 109-124, 1999.
60. QUEIROZ, M.L.S. - “Células pluripotenciais hematopoiéticas em cultura.” Revisão bibliográfica. **Ciência e Cultura**, **40**: 421-426, 1988.
61. QUESNIAUX, V. F.; RYFFEL, B.; “ Interleukin-12 induced interferon-gamma inhibits hematopoiesis in vivo in mice.” **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **795**: 189-195, 1996.
62. ROGERS, H.W.; SHEEHAN, K.C.F.; BRUNT, L.M.; DOWER, S.K.; UNANUE, E.R. & SCHREIBER, R.D. – “Interleukin-1 participates in the development of anti – *Listeria* responses in both normal and scid mice.” **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **89**: 1011-1015, 1992.

63. ROGERS, H.W.; TRIPP, C.S.; SCHREIBER, R.D. & UNANUE, E.R. - "Endogenous IL-1 is required for neutrophil recruitment and macrophage activation during murine listeriosis." **Journal of Immunology**, **153**: 2093-2101, 1994.
64. ROGERS, H.W.; TRIPP, C.S. & UNANUE, E.R. - "Different stages in the natural and aquire resistance to an intracellular pathogen." **The Immunologist**, **3/4**, 152-156, 1995.
65. ROSEN, H.; GORDON, S. & NORTH, R.J. - "Exacerbation of murine listeriosis by a monoclonal antibody specific for type 3 complement receptor of myelomonocytic cells. Absence of monocytes at infective foci allows *Listeria* to multiply in non phagocytic cells." **Journal of Experimental Medicine**, **170**: 27-37, 1989.
66. SERUSHAGO, B.A.; YOSHIKAI, Y.; HANDA, T.; MITSUYAMA, M.; MURAMORI, K.; NOMOTO, K. - "Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) on murine resistance against *Listeria monocytogenes*." **Immunology**, **75**: 475-480, 1992.
67. SHINOMIYA, N; TSURU, S; KATSURA, Y; KAYASHIMA, S; NOMOTO, K. - "Enhanced resistance against *Listeria monocytogenes* achieved by pretreatment with granulocyte colony stimulating factor." **Infection and Immunity**, **59**: 4740-4743, 1991.
68. SOUZA BRITO, A.R.M. & SOUZA BRITO, A.A. - "Fourty years of Brazilian medicinal plant research." **Journal of Ethnopharmacology**, **714**: 136-142, 1993.
69. STERN, A.S; PODLASKI, F.J; HULMES, J.D; PAN, Y.C.E; QUINN, P.M; WOLITZKY, A.G; FAMILLETI, P.C; STREMLO, D.L; TRUITT, T; CHIZZONITE, R; & GATELY, M.K. - "Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblatoid cells." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **87**: 6808-6812, 1990.
70. STEVENSON, M.M.; KONGSHAVN, P.A.L. & SKAMENE, E. "Genetic linkage of resistance to *Listeria monocytogenes* with macrophage inflammatory response." **Journal of Immunology**, **127**: 402-407, 1981.

71. SUMMERFIELD, A.; SAALMÜLLER, A. - "Interleukin-2 dependent selective activation of porcine $\gamma\delta$ T lymphocytes by an extract from the leaves of *Acanthospermum hispidum*." **Int. J. Immunopharmacology**, **20**: 85-98, 1998.
72. TARE, N.S; BOWEN, S; WARRIER, R.R; CARVAJA, D.M; BENJAMIN, W.R; RILEY, J.H; ANDERSON, T.D; GATELY, M.K. - " Administration of recombinat interleukin-12 to mice suppresses hemaopoiesis in the bone marrow but enhances hematopoiesis in the spleen." **J. Interferon Cytokine Res.**, **15(4)**: 377-383, 1995.
73. WHO. Regional Office of Western Pacific. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. Manila: WHO, 1993.
74. WING, E.J.; WAHEED, A. & SHADDUCK, R.K. - " Changes in serum colony-stimulating factor and monocytic progenitor cells during *Listeria monocytogenes* infection in mice." **Infection and Immunity**, **45**: 180-184, 1984.
75. WING, E.J.; BARCZYNSKI, L.K.; WAHEED, A. & SHADDUCK, R.K. - "Effect of *Listeria monocytogenes* infection on serum levels of colony-stimulating factor and number of progenitor cells in immune and non-immune animals." **Infection and Immunity**, **49**: 325-328, 1985.
76. WING, E.J.; MAGEE, D.M. & BARCZYNSKI, L.K. "Analysis of colony-stimulating factors and macrophage progenitor cells in mice immunized against *Listeria monocytogenes* by adoptive transfer." **Infection and Immunity**, **55**: 1843-1847, 1987.
77. YOUNG, A. M., & CHEERS - " Colony-forming-cells and colony-stimulating activity during listeriosis in genetically resistant or susceptible mice." **Cellular Immunology**, **97**: 227-237, 1986.

VIII. Apêndice

TABELA 1. Número de células formadoras de colônias para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos Balb/c tratados com EHA *A. hispidum* ou tratados e infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^5 bactérias/animal) 3 horas após o término do tratamento. Cultura clonal realizada 48 horas após a infecção.

CFU-GM $\times 10^3$ - MEDULA								
	Controles (Não tratados)		Grupos tratados com 100mg/kg		Grupos tratados com 500mg/kg		Grupos tratados com 1000mg/kg	
	NT	I-48h	T	TI-48h	T	TI-48h	T	TI-48h
1	17,76	8,46	8,87	10,41	9,38	13,67	4,7	12,9
2	17,76	6,31	7,9	10,83	7,28	8,68	4,56	14,14
3	20,72	9,46	9,58	10,73	8,26	13,35	5,41	12,9
4	19,24	7,74	9,73	11,46	7,28	12,71	4,99	12,42
5	14,8	7,02	10,34	11,67	9,52	15,28	4,28	13,62
6	14,8	9,17	7,75	11,67	7,42	8,04	10,69	5,16
X	17,51	8,02	9,04	11,13	8,2	11,95	5,77	11,86
DP	2,16	1,12	0,95	0,49	0,95	2,66	2,22	3,05

NT-NÃO TRATADOS; I-INFECTADOS; T- TRATADOS; TI- TRATADOS E INFECTADOS.

Teste ANOVA – Tukey-Kramer ($p < 0,05$)

TABELA 2. Número de células formadoras de colônias para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos Balb/c tratados com EHA *A. hispidum* ou tratados e infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^5 bactérias/animal) 3 horas após o término do tratamento. Cultura clonal realizada 72 horas após a infecção.

CFU-GM $\times 10^3$ - MEDULA								
	Controles (Não tratados)		Grupos tratados com 100mg/kg		Grupos tratados com 500mg/kg		Grupos tratados com 1000mg/kg	
	NT	I-72h	T	TI-72h	T	TI-72h	T	TI-72h
1	17,76	8,5	8,87	9,74	9,38	5,21	4,7	4,92
2	17,76	11,19	7,9	10,27	7,28	4,51	4,56	7,32
3	20,72	11,62	9,58	8,16	8,26	8,73	5,41	5,93
4	19,24	11,76	9,73	10,27	7,28	6,34	4,99	6,05
5	14,8	7,8	10,34	11,59	9,52	7,04	4,28	6,05
6	14,8	11,33	7,75	11,32	7,42	7,04	10,69	6,33
X	17,51	10,37	9,04	10,22	8,2	6,48	5,77	6,1
DP	2,16	1,59	0,95	1,13	0,95	1,37	2,22	0,70

NT-NÃO TRATADOS; I-INFECTADOS; T- TRATADOS; TI- TRATADOS E INFECTADOS. Teste ANOVA – Tukey-Kramer ($p < 0,05$)

TABELA 3. Número de células formadoras de colônias para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de camundongos Balb/c tratados com EHA *A. hispidum* ou tratados e infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^5 bactérias/animal) 3 horas após o término do tratamento. Cultura clonal realizada 48 horas após a infecção.

<i>CFU-GM x10¹ - BAÇO</i>								
	Controles (Não tratados)		Grupos tratados com 100mg/kg		Grupos tratados com 500mg/kg		Grupos tratados com 1000mg/kg	
	NT	I-48h	T	TI-48h	T	TI-48h	T	TI-48h
1	9,95	293,6	40,4	290,0	54	267	100	260,0
2	9,95	182,3	40	260,0	54	247	110	253,4
3	9,95	305,0	40	290,0	108,4	283	90	292,0
4	49,8	221,5	100	243,0	108,4	308,0	80	299,5
5	19,9	282,3	100,8	290,0	67,6	290,0	100	360,8
6	29,9	293,6	100	263,0	94,8	259,0	110	230,4
X	21,56	263,0	70,2	272,67	81,2	275,67	98,33	282,68
DP	14,57	45,17	30,07	18,42	23,56	20,33	10,67	41,99

NT-NÃO TRATADOS; I-INFECTADOS; T- TRATADOS; TI- TRATADOS E INFECTADOS.

Teste ANOVA – Tukey-Kramer ($p < 0,05$)

TABELA 4. Número de células formadoras de colônias para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de camundongos Balb/c tratados com EHA *A. hispidum* ou tratados e infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^5 bactérias/animal) 3 horas após o término do tratamento. Cultura clonal realizada 72 horas após a infecção.

CFU-GM $\times 10^1$ - BAÇO								
	Controles (Não tratados)		Grupos tratados com 100mg/kg		Grupos tratados com 500mg/kg		Grupos tratados com 1000mg/kg	
	NT	I-72h	T	TI-72h	T	TI-72h	T	TI-72h
1	9,95	330,0	40,4	139,0	54	132,0	100	821,0
2	9,95	387,0	40	100,0	54	150,0	110	1077,0
3	9,95	316,0	40	135,0	108,4	120,0	90	947,0
4	49,8	287,0	100	122,0	108,4	120,0	80	947,0
5	19,9	374,0	100,8	153,0	67,6	126,0	100	960,0
6	29,9	301,0	100	141,0	94,8	128,0	110	1006,0
X	21,56	332,5	70,2	131,67	81,2	129	98,33	959,7
DP	14,57	36,59	30,07	16,85	23,56	1,18	10,67	76,88

NT-NÃO TRATADOS; I-INFECTADOS; T- TRATADOS; TI- TRATADOS E INFECTADOS. Teste ANOVA – Tukey-Kramer ($p < 0,05$)

TABELA 5. Peso do baço (gramas) de camundongos Balb/c tratados com EHA *A. hispidum* ou tratados e infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^5 bactérias/animal) 3 horas após o término do tratamento. Peso 48 horas após a infecção.

CFU-GM - PESO BAÇO (gramas)								
	Controles (Não tratados)		Grupos tratados com 100mg/kg		Grupos tratados com 500mg/kg		Grupos tratados com 1000mg/kg	
	NT	I-48h	T	TI-48h	T	TI-48h	T	TI-48h
1	0,179	0,462	0,197	0,193	0,260	0,257	0,283	0,186
2	0,155	0,700	0,183	0,208	0,215	0,234	0,232	0,198
3	0,120	0,284	0,201	0,174	0,200	0,169	0,345	0,317
4	0,172	0,261	0,200	0,179	0,235	0,191	0,197	0,227
5	0,200	0,400	0,202	0,169	0,257	0,222	0,208	0,273
6	0,146	0,350	0,167	0,169	0,206	0,169	0,182	0,250
X	0,162	0,409	0,191	0,182	0,228	0,207	0,241	0,241
DP	0,025	0,146	0,012	0,014	0,024	0,033	0,056	0,044

NT-NÃO TRATADOS; I-INFECTADOS; T- TRATADOS; TI- TRATADOS E INFECTADOS.

Teste ANOVA – Duncan e Tukey-Kramer ($p < 0,05$)

TABELA 6. Peso do baço (gramas) de camundongos Balb/c tratados com EHA *A. hispidum* ou tratados e infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^5 bactérias/animal) 3 horas após o término do tratamento. Peso 72 horas após a infecção.

CFU-GM - PESO BAÇO (gramas)								
	Controles (Não tratados)		Grupos tratados com 100mg/kg		Grupos tratados com 500mg/kg		Grupos tratados com 1000mg/kg	
	NT	I-72h	T	TI-72h	T	TI-72h	T	TI-72h
1	0,179	0.326	0,197	0.305	0,260	0.379	0,283	0,361
2	0,155	0.243	0,183	0.257	0,215	0.225	0,232	0,284
3	0,120	0.297	0,201	0.229	0.200	0.317	0,345	0,205
4	0,172	0.234	0,200	0.225	0,235	0.209	0,197	0,244
5	0,200	0.211	0,202	0.258	0,257	0.249	0,208	0,400
6	0,146	0.280	0,167	0.260	0,206	0.315	0,182	0,215
X	0,162	0.265	0,191	0.256	0,228	0.282	0,241	0,284
DP	0,025	0.039	0,012	0.026	0,024	0.06	0,056	0,073

NT-NÃO TRATADOS; I-INFECTADOS; T- TRATADOS; TI- TRATADOS E INFECTADOS.

Teste ANOVA – Duncan e Tukey-Kramer ($p < 0,05$)

TABELA 7. Curva de sobrevivência de camundongos Balb/c (n=20) tratados com 3 diferentes doses de EHA *A.hispidum* durante 5 dias e infectados com dose letal de *Listeria monocytogenes* (3×10^5 bactérias/animal), 3 horas após o término do tratamento.

Sobrevivência de animais tratados com EHA de <i>A.hispidum</i> e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i>				
Dias	Controle (Infectado)	TI 100 mg/Kg	TI 500 mg/Kg	TI 1000 mg/Kg
2º	4 †	3 †	-	-
3º	4 †	2 †	-	-
4º	4 †	3 †	4 †	-
5º	5 †	2 †	-	4 †
6º	3 †	4 †	-	4 †
17º	-	-	4 †	-
30º	-	6 vivos	12 vivos	12 vivos
Total de mortes	20	14	08	08
Total de animais	20	20	20	20

Método Kaplan-Meier, teste Log-rank (Cox-Mantel) ($p < 0,001$).
 TI = tratado e infectado; T = tratado;