

SIMONE MARIA CIPAS PERHS

**Avaliação de solução hidro alcoólica de própolis na resposta
hematopoética em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes***



Campinas

2009

SIMONE MARIA CIPAS PERHS

**Avaliação de solução hidro alcoólica de própolis na resposta
hematopoética em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-
Graduação em Farmacologia 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



Campinas
2009

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

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

P432a Perhs, Simone Maria Cipas
Avaliação de solução hidro alcoólica de própolis na resposta hematopoética em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* / Simone Maria Cipas Perhs. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

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

1. Própolis. 2. *Listeria monocitogenes*. 3. Hematopoese. 4. Interferon-gama. I. Queiroz, Mary Luci de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Evaluation of hydro alcoholic solution of propolis on the hematopoietic response in *Listeria Monocytogenes* infected mice

Keywords: • Propolis
• *Listeria Monocytogenes*
• Hematopoiesis
• Interferon-gamma

Titulação: Mestrado em Farmacologia

Banca examinadora:

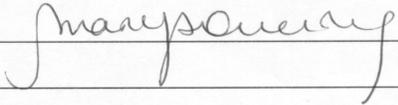
Prof^ª. Dr^ª. Mary Luci de Souza Queiroz
Prof^ª. Dr^ª. Claudia Bincoletto Trindade
Prof^º. Dr^º. Stephen Hyslop

Data da defesa: 18-06-2009

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Simone Maria Cipas Perhs

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

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Cláudia Bincoletto Trindade	
Professor (a) Doutor (a) Stephen Hyslop	
Professor (a) Doutor (a) Mary Luci de Souza Queiroz	

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

Data: 18/06/2009

Foram tantos que me ajudaram, direta e indiretamente, a realizar este trabalho que seria impossível citar todos, mas gostaria de agradecer alguns em especial.

Primeiramente a Deus, por guiar os meus caminhos

Ao meu marido (Ingo) e minhas filhas, Swantje e Wiebke que me apoiaram nesta empreitada, embora isso nem sempre fosse fácil para eles.

Ao departamento de Farmacologia a da Unicamp e à CNPq por me fornecem condições de elaborar este trabalho. A minha orientadora, Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, por abrir as portas do Laboratório de Imunotoxicologia e CFU e acreditar na minha capacidade.

Ao Pedro Luwerdis (em memória) por ter me ajudado e incentivado a minha vinda e da minha família à Campinas para realizar este sonho.

As amigas Cristiane Okuda e Samara Erbelin, que sempre arrumaram um tempo para me ajudar em todos os momentos do meu trabalho com muita paciência e compreensão.

A Profa. Léonilda M. B dos Santos que acreditou em mim e no meu trabalho.

A todos colegas de laboratório pela ajuda, pelas risadas, pelo bom astral e companheirismo acima de tudo. Por serem tantos; alguns que saíram, outros que entraram mais recentemente; tenho receio de esquecer de nomear algum, então deixo aqui registrado um muito obrigado a TODOS.

A toda equipe do PRODECAD-UNICAMP que cuidou com carinho das minhas filhas nos horários de meus estudos.

Finalmente, aos animais que serviram com sua morte para que pudéssemos cuidar da vida, meu respeito e eterna gratidão.

	PÁG.
Lista de abreviaturas.....	xiii
Lista de figuras.....	xvii
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxv
INTRODUÇÃO.....	29
Considerações gerais da própolis.....	31
Modelo experimental de infecção por <i>Listeria monocytogenes</i>	35
OBJETIVOS.....	39
MATERIAL E MÉTODOS.....	43
1. Animais.....	45
2. Tratamento com solução hidro alcoólica de própolis.....	45
3. <i>Listeria monocytogenes</i>	45
4. Cultura clonal de precursores hematopoéticos da medula óssea e baço de camundongos (CFU-C)	47
4.1. Medula óssea.....	47
4.2. Baço.....	48
4.3. Preparação das placas de cultura da medula óssea e baço em meio semi-sólido.....	48
5. Obtenção do soro de animais para detecção da atividade dos fatores estimuladores de colônias.....	49
6. Realização da curva de sobrevivência.....	50
7. Dosagem de IFN- γ no sobrenadante de culturas de células esplênicas	50
8. Análise estatística.....	51

RESULTADOS.....	53
1. Efeitos da solução hidro alcoólica de própolis na sobrevida de animais infectados com uma dose letal de <i>Listeria monocytogenes</i>	55
2. Efeitos da solução hidro alcoólica de própolis sobre o número de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos da medula óssea e do baço de camundongos (CFU-C).....	57
2.1. Medula óssea.....	57
2.2. Baço.....	59
3. Efeitos da solução hidro alcoólica de própolis sobre a produção de fatores estimuladores de colônias (CSFs)	61
4. Efeitos da solução hidro alcoólica de própolis sobre a produção de IFN- γ no sobrenadante de culturas de células esplênicas.....	63
DISCUSSÃO.....	65
CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

BHI	Brain-Heart Infusion
CA	Ácido caféico
CAPE	Éster do ácido fenetil caféico
CD	Células Dendríticas
CFU-GM	Unidades formadoras de colônias - granulócitos e macrófagos
Con-A	Concanavalina - A
CSA	Atividade estimuladora de colônia
CSFs	Fatores estimuladores de colônias
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Médium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EEP	Extrato etanólico de própolis
G-CSF	Fator estimulador de colônia para granulócito
GM-CSF	Fator estimulador de colônia para granulócito e macrófago
ICAM-1	Molécula intercelular de adesão-1
IFN-γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico síntase induzível
LLO	Listeriosina O
LM	<i>Listeria monocytogenes</i>
LPS	Lipopolisacarídeo
M-CSF	Fator estimulador de colônia para macrófago
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NF-κB	Fator transcricional-kappa B
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
OVA	Ovalbumina
SFB	Soro fetal bovino

SHAP	Solução hidroalcoólica de própolis
T CD4	Linfócitos T auxiliares
T CD8	Linfócitos T citotóxicos
TGF-β1	Fator beta transformador de crescimento-1
Th	Células T auxiliares
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

	PÁG.
Figura 1. Curva da capacidade estimuladora do crescimento de colônias expressa em unidades/mL.....	50
Figura 2. Efeitos do tratamento por 10 dias consecutivos de diferentes concentrações de solução hidro alcoólica de própolis (2, 4, 8, 16 e 24 mg/kg) na sobrevida de camundongos BALB/c infectados com dose letal de com <i>Listeria monocytogenes</i> . Grupos de 10 animais foram observados diariamente para a avaliação da sobrevida. P<0,05 em relação ao grupo LM. Teste-Cox-Mantel	56
Figura 3. Número de progenitores de granulócitos–macrófagos (CFU-GM) na medula óssea em camundongos normais, pré-tratados com solução hidro alcoólica de própolis e infectados com dose subletal de <i>Listeria monocytogenes</i> ($1,5 \times 10^4$). &P<0,05, em relação ao grupo controle; *P<0,001 em relação ao grupo infectado 48h, e @P<0,05, em relação ao grupo infectado 72h. ANOVA – Teste Tukey	58
Figura 4. Número de progenitores de granulócitos–macrófagos (CFU-GM) no baço em camundongos normais, pré-tratados com solução hidro alcoólica de própolis e infectados com dose subletal de <i>Listeria monocytogenes</i> ($1,5 \times 10^4$). *P<0,001, em relação ao grupo controle; &P<0,01 em relação ao grupo infectado 48h, e @P<0,001, em relação ao grupo infectado 72h. ANOVA – Teste Tukey	60

Figura 5. Efeitos da solução hidro alcoólica de própolis administrados durante 10 dias consecutivos sobre a produção de fatores estimuladores de colônias no soro de animais normais e infectados com dose subletal de *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^4$). & P<0,001, em relação ao controle; * P<0,001, em relação ao infectado 48 h; @P<0,05, em relação ao infectado 72 h. ANOVA – Teste Tukey. 62

Figura 6. Produção de IFN- γ em sobrenadantes de culturas esplênicas de animais normais, tratados com solução hidro alcoólica de própolis e infectados com dose subletal de *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^4$ i.p. bactérias/animal).#P<0.001, em relação ao grupo controle e @P<0.001, em relação ao grupo infectado 48h e *P<0,01 em relação ao grupo infectado 72h. ANOVA – Teste Tukey. 64



RESUMO

O modelo experimental de infecção por *Listeria monocytogenes* tem provado ser útil na investigação dos efeitos de novos compostos na resposta imunológica primária contra bactérias intracelulares. Em particular, o número de células hematopoéticas na medula óssea e baço é de fundamental importância na resistência a esta infecção.

No presente estudo, investigamos o efeito da solução hidro alcoólica de própolis (SHAP), sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea e do baço de animais infectados com *Listeria monocytogenes*. Além disso, quantificamos os níveis de fatores estimuladores de colônias (CSFs). A eficácia da SHAP frente a uma dose letal da bactéria também foi avaliada.

Demonstramos que a SHAP protegeu os animais contra uma dose letal de *L. monocytogenes*, quando administrada profilaticamente na dose de 4 mg/kg durante 10 dias, com aumento de 20% na sobrevivência.

Este tratamento também preveniu a mielossupressão e hematopoese extramedular causadas por uma dose subletal de *L. monocytogenes*, devido a um aumento no número de CFU-GM na medula óssea. Além disso, observamos que os animais somente tratados (não infectados) não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle.

Adicionalmente, a investigação da produção de fatores estimuladores de colônias no soro dos animais revelou um aumento de CSA nos grupos infectados após 48 e 72h pré-tratados com SHAP, sugerindo que a estimulação da mielopoese pelo produto seja mediada pela produção de fatores de crescimento. Além disso, observamos o aumento da citocinas interferon- gamma IFN- γ no grupo infectado/tratado com o produto nas 48e 72h.



ABSTRACT

Infection with *Listeria monocytogenes* has proven to be a useful model to investigate early effects of new compounds on the immune response to intracellular bacteria. In particular, the number of hematopoietic cells in the bone marrow and spleen is critically important to resistance to this infection.

In this study, we demonstrated the protective effects of hydro alcoholic solution of propolis in mice infected with a lethal dose of *Listeria monocytogenes*, when administered prophylactically at 4mg/kg for 10 days, with survival rates up to 20%.

This dose also prevented the myelosuppression and the splenomegaly caused by a sublethal infection with *Listeria monocytogenes*, due to the maintenance of granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM) numbers in the bone marrow. Non-infected mice treated with hydro alcoholic solution of propolis presented similar numbers of CFU-GM in the bone marrow when compared to the controls.

Furthermore, investigation of the production of colony-stimulating factors (CSF) revealed increased colony-stimulating activity (CSA) in the serum of infected mice pre-treated with hydro alcoholic solution of propolis 48 and 72 hours after the infection, suggesting that its effects on the production of growth factors mediate stimulation of myelopoiesis by hydro alcoholic solution of propolis. Moreover, we observed increased level of IFN- γ in infected/treated mice.

These results sustain our proposal of hydro alcoholic solution of propolis use as an adjuvant agent in the prophylaxis of opportunistic infections and reduction of side effects caused by immunosuppressive therapies.



INTRODUÇÃO

CONSIDERAÇÕES GERAIS DA PRÓPOLIS

Própolis é o nome genérico de uma substância resinosa coletada de várias plantas por abelhas (BURDOCK, 1997; ORSOLIC *et al.*, 2004; ORSI *et al.*, 2005). Apresenta coloração escura e composição química complexa, dependendo da origem geográfica (BANKOVA, 2005; TRUSHEVA *et al.*, 2006; SALOMÃO *et al.*, 2007). Essa substância é usada por esses insetos para fixar os caixilhos, esterilizar e envernizar os favos antes da postura e paredes internas do ninho, selar frestas para evitar a entrada do vento, além de utilizá-la como desinfetante geral (WIESE, 1980). Tem sido utilizada na medicina popular há muito tempo por possuir efeitos benéficos principalmente em processos patológicos (BLONSKA *et al.*, 2004).

Quando se refere à própolis bruta, sabe-se que sua composição química varia sensivelmente, mas de modo geral é composta de 50 % de resinas solúveis em etanol, 30% de cera, e o restante composto de óleos essenciais, pólen, aminoácidos, vitaminas, sais minerais e resíduos insolúveis (WIESE, 1980).

Mais de 300 componentes incluindo terpenos, derivados do fenilpropano (éster do ácido caféico), ácido cinâmico, flavonóides, aminoácidos, aldeídos e cetonas (ORSOLIC *et al.*, 2004) já foram encontrados, sendo que a maioria dos bioativos da própolis brasileira são derivados dos ácidos hidroxicinâmico, cafeoilquínico, dipertênicos (SALOMÃO *et al.*, 2007). A combinação destes componentes provavelmente resulta num efeito sinérgico, o qual é essencial para a sua atividade biológica (KUJUMGIEV *et al.*, 1999; FISCHER *et al.*, 2007). Também é importante lembrar que estes componentes são coletâneas de substâncias já encontradas, o que não significa que todos estarão presentes em todas as amostras de própolis.

Estudos têm demonstrado várias propriedades biológicas da própolis, dentre as quais atividade antimicrobiana (BOSIO *et al.*, 2000; SFORCIN *et al.*, 2000; STEPANOVIC *et al.*, 2003; ORSI *et al.*, 2005; BOYANOVA *et al.*, 2006), antioxidante (BANKOTA *et al.*, 2001; JASPRICA *et al.*, 2007; SHENG *et al.*, 2007; NAKAJIMA *et al.*, 2007), antiinflamatória (SONG *et al.*, 2002; BORRELI *et al.*, 2002; PAULINO *et al.*, 2003; KHAYYAL *et al.*, 2003; BLONSKA *et al.*, 2004; HU *et al.*, 2005), hepatoprotetora,

antiviral (BANSKOTA *et al.*, 2000; BANKOTA *et al.*, 2001), antitumoral (HULEIHEL e ISHANO, 2001; SUZUKI *et al.*, 2002; EL-KHAWAGA *et al.*, 2003; ORSOLIC *et al.*, 2005) e imunomoduladora (ORSOLIC e BASIC 2003; ANSORGE *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2004; HO *et al.*, 2005; SY *et al.*, 2005; MISSIMA e SFORCIN, 2007). Mesmo quando quimicamente modificada, tem sido utilizada no tratamento de irritações da mucosa oral, brônquica, gastrointestinal e genital (IVANOSKA *et al.*, 1995).

Ensaio *in vitro* revelaram que as bactérias gran-positivas como *Staphylococcus aureus* e leveduras como *Candida albicans* são mais suscetíveis à ação da própolis do que as gran-negativas como *Escherichia coli* (SFORCIN *et al.*, 2000; SFORCIN *et al.*, 2001; STEPANOVIC *et al.*, 2003; BOYANOVA *et al.*, 2006).

Com relação ao seu potencial antioxidante, NAKAJIMA *et al.* (2007) demonstraram que o extrato aquoso da própolis brasileira verde e derivados do ácido cafeoilquínico exercem efeitos neuroprotetores *in vitro* contra danos na retina induzidos por stress oxidativo. Em outro estudo, o extrato etanólico da própolis (EEP) apresentou atividade contra radicais livres e preveniu a peroxidação do ácido linoleico (SHENG *et al.* 2007).

SONG *et al.* (2002) demonstraram as propriedades antiinflamatórias da própolis revelando que o EEP nas concentrações de 12.5, 25, e 50µg/mL inibiu a produção de óxido nítrico (NO) em linhagem de macrófagos RAW 264.7 por diminuição na expressão e na atividade catalítica de óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Blonska *et al.* também observaram que EEP na concentração de 30µg/mL inibiu a produção de interleucina-1β (IL-1β) e NO em linhagem de macrófagos J774A.1 ativadas e estimuladas com lipopolisacarídeo (LPS), esta ação é mediada por expressão gênica de iNOS e de IL-1β, estes resultados estão de acordo com Natarajan *et al.* que propuseram que o éster do ácido fenetil caféico (CAPE), um constituinte da própolis, seja um regulador específico do fator transcricional (NF-κB), agente central na coordenação da expressão gênica de iNOS

Experimentos realizados *in vivo*, utilizando 3, 10 e 100mg/kg do extrato etanólico padronizado da própolis bulgariana, demonstraram diminuição de contrações

abdominais em camundongos induzidas por ácido acético, sendo que a dose de 100mg/kg causou uma redução significativa da dor na fase inflamatória mas não na dor causada simplesmente por irritação dos nervos terminais, concluindo que o efeito analgésico deste extrato está associado com a inibição da resposta inflamatória (PAULINO *et al.*, 2003).

Um estudo clínico realizado em pacientes com asma suave a moderada, o extrato aquoso de própolis (solução a 13%) administrado durante 2 meses, foi capaz de reduzir os níveis séricos de diversos mediadores inflamatórios como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), molécula intercelular de adesão-1 (ICAM-1), interleucinas (IL) 6 e 8, sendo as duas últimas consideradas citocinas pró-inflamatórias. Ainda, o extrato reduziu significativamente os níveis de prostaglandinas e leucotrienos nos voluntários tratados (KHAYYAL *et al.*, 2003).

Em relação a sua atividade antitumoral, MAHMOUD *et al.* (2000), verificaram que a suplementação alimentar com CAPE reduz a formação de tumores e a expressão da oncoproteína catenina em enterócitos de camundongos Min/+. ORSOLIC *et al.* (2004) expuseram a linhagem de células tumorais HELA a diferentes concentrações de extrato aquoso de própolis, ácido caféico (CA) e CAPE, concluindo que os três componentes exercem efeito citotóxico direto sobre as células tumorais. O extrato também impediu o crescimento celular, ao passo que o CA e o CAPE exerceram um efeito inibitório dose-dependente sobre este crescimento.

Neste mesmo sentido, EL-KHAWAGA *et al.* (2003) revelaram que a administração da própolis 24h antes da inoculação de tumor acético de Ehrlich em camundongos Balb/c, reduziu significativamente o tamanho do tumor, o número e a viabilidade das células tumorais. Além disso, os animais tratados obtiveram uma taxa maior de sobrevivência ultrapassando 30 dias após a inoculação.

Diversas investigações envolvendo extrato da própolis têm revelado um perfil de atividade imunomoduladora (ANSORGE *et al.*, 2003 SY *et al.* 2006). ANSORGE *et al.* (2003) observaram que este produto e alguns de seus principais constituintes são capazes de inibir a síntese de DNA, diminuir a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e IL-12, de resposta Th1 (IL-2) e Th2 (IL-4), ao passo que a citocina imunoregulatória TGF- β 1

produzida por células T-regulatórias foi aumentada em células mononucleares de sangue periférico de doadores saudáveis. Os autores concluíram que a própolis e/ou seus constituintes podem ser utilizados tanto em processos inflamatórios e doenças autoimunes (Th1) como em doenças alérgicas (Th2).

Em modelo experimental de inflamação das vias aéreas, utilizando 65 e 325mg/kg de extrato de própolis, SY *et al* (2006) observaram diminuição nos níveis de IgE e IgG1 em soro de animais imunizados com ovalbumina (OVA). Os níveis de IL-6, IL-10 e IFN- γ em cultura de células esplênicas estimuladas com concanavalina-A (Con-A) nos animais imunizados e tratados também diminuíram, enquanto que os níveis de TNF- α não apresentaram diferença. Por outro lado SÁ-NUNES *et al.* (2003) em um estudo sobre a proliferação de linfócitos e produção de IFN- γ observaram aumento desta citocina em cultura de células esplênicas de camundongos tratados com baixas concentrações de própolis (2,5 e 5mg/kg). FISCHER *et al.* (2007) usando extrato etanólico de própolis verde em camundongos imunizados com o vírus de hepes suína do tipo 1 observaram o aumento da expressão gênica de IFN- γ .

A atividade dos extratos de própolis é sem dúvida dependente da composição química das amostras coletadas em diferentes áreas geográficas, bem como do seu método de extração. Alguns de seus componentes podem agir ambos em sinergismo como em antagonismo. De fato, tem sido demonstrado que extrato aquoso de própolis coreana foi capaz de ativar macrófagos (HAN *et al.* 2002). O tratamento de linhagens de macrófagos RAW 264.7 com este extrato resultou na produção de IL-1 β e TNF- α . O derivado solúvel em água de própolis originária da Bulgária estimulou macrófagos peritonial a produzirem *in vitro* IL-1 (DIMOV *et al.*, 1991). Em contra partida, BLONSKA *et al.* (2004) observaram que o extrato etanólico de própolis inibiu a produção de IL-1 β e óxido nítrico (NO) em linhagens de macrófagos J774A.1.

Diante dos relatos do uso deste produto na medicina popular e da literatura, nos propomos neste trabalho a estudar os efeitos da SHAP, na resposta hematopoética em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*.

MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO POR *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* (LM) é um cocobacilo gram-positivo, pertencente a um grupo de bactérias intracelulares, anaeróbias facultativas (ROGER et al., 1992, PAMER et al., 1997, PAMER, 2004). Na década de 80, inúmeros surtos de listeriose veiculados por alimentos chamaram a atenção para este patógeno (SCHLECH, 1996). Esta bactéria depende inicialmente da defesa inata do hospedeiro para sua erradicação e, devido a isto, os indivíduos mais suscetíveis a infecções por LM são os imunossuprimidos, idosos, recém nascidos e gestantes (COSSART e BIERNE, 2001; PAMER, 2004; BAKARDJIEV et al., 2006; RAMASWAMY et al. 2007). Seu principal meio de disseminação se dá através de alimentos contaminados como laticínios não pasteurizados ou carnes mal cozidas (PAMER, 2004; RAMASWAMY et al. 2007).

A listeriose tem sido o modelo experimental de infecção mais utilizado em camundongos para identificar e estudar os mecanismos envolvidos na defesa antimicrobiana celular. Os parâmetros da imunidade celular produzidos no camundongo estão bem esclarecidos. É um modelo de fácil e sugestiva manipulação de um processo infeccioso num curto período de tempo, onde respostas definidas podem ser obtidas dentro de poucos dias (KAUFMANN et al., 1995; UNANUE 1997, EDELSON e UNANUE, 2000; COSSART e BIERNE, 2001), além de não produzir risco para o manipulador desde que seja manipulada dentro das técnicas de segurança. (PAMER, 2004).

O mecanismo envolvido na resistência a LM caracteriza-se inicialmente pela resposta inata do hospedeiro, seguida por uma resposta específica, envolvendo neutrófilos, macrófagos, células Natural Killer (NK), células dendríticas (CD), linfócitos T e uma grande seleção de citocinas (HARTY et al., 1996; JENSEN et al., 1997; EDELSON e UNANUE, 2000; MANNERING et al., 2002; PAMER, 2004; FREEMAN e ZIEGLER, 2005; CHANG et al, 2007).

Quando a LM entra em contato com o organismo, deixa rapidamente a corrente sanguínea, alojando-se em células fagocitárias, preferencialmente células hepáticas

e macrófagos (MOCCI *et al.*, 1997; GULERIA e POLLARD, 2001). Após ser fagocitada, a LM produz uma toxina, a Listeriolisina O (LLO), que lisa o fagossoma da célula, permitindo sua saída para o citoplasma, onde ocorre sua proliferação e conseqüente migração para as células adjacentes, dando início à sua disseminação (CONLAN e NORTH, 1991; NISHIBORI *et al.*, 1996; DRAMASI *et al.* 1998; NOMURA *et al.*, 2001).

As primeiras células envolvidas nessa fase inicial da infecção por *Listeria monocytogenes* são os neutrófilos, aparecendo nos sítios da infecção nas primeiras 24 horas (EDELSON e UNANUE, 2000). Eles promovem a lise das células infectadas e conseqüente espalhamento da LM no fígado (CONLAN e NORTH, 1991; EDELSON e UNANUE, 2000). A destruição destas células infectadas garante a exposição da LM ao ataque dos próprios neutrófilos e macrófagos. A importância dos neutrófilos em infecções foi demonstrada por vários pesquisadores, os quais utilizaram anticorpos específicos para depleção dos neutrófilos, levando os camundongos à morte logo no início da infecção (FERRICK, *et al.*, 1995). Os macrófagos, por sua vez, ao serem infectados, liberam GM-CSF e algumas citocinas pró-inflamatórias: IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α (UNANUE, 1997; KUHN e GOEBEL, 1997; ROACH, *et al.*, 2004; TORRES *et al.*, 2005). A IL-12 e TNF- α por sua vez, atuam sinergicamente induzindo as células Natural Killer (NK) a secretarem IFN- γ . A presença de IFN- γ é essencial para ativação dos macrófagos, tornando-os listericidas (BUCHMEIER, *et al.*, 1985; BECKERMAN *et al.*, 1993; SCHLEICHER *et al.*, 2005; BERG *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2007; HUMMAN *et al.*, 2007).

Após a destruição da LM pelos macrófagos, antígenos são apresentados às células T, através das moléculas da classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC classe II), aumentando assim a atividade antimicrobiana (JENSEN *et al.*, 1997; BOUWER *et al.*, 1997; FLESCI *et al.*, 1998; PAMER 2004). As células T CD8⁺ (linfócitos T citotóxicos) lisam estas células infectadas, liberando a bactéria para o ambiente extracelular, favorecendo a fagocitose desta (EDELSON e UNANUE, 2000; BERG *et al.*, 2005). A resposta das células TCD4⁺ é do tipo Th1, induzida pelo IFN- γ e também pela IL-12 (SONG *et al.*, 1995; GULERIA e POLLARD, 2001; WAY *et al.* 2007). As células Th1 produzem mais IFN- γ , amplificando a resposta dos macrófagos, além de IL-

12, TNF- α , GM-CSF e moléculas de adesão (NORTH *et al.*, 1997; MIELKE *et al.*, 1997; BERG *et al.*, 2005).

Na fase inicial, o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local de replicação da bactéria é crucial para a sobrevivência do animal (PAMER, 2004). Essas células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos) são originárias dos progenitores pluripotenciais da medula óssea (CFCs – células formadoras de colônias) que podem dar origem a qualquer célula sanguínea dependendo do estímulo recebido. O crescimento e diferenciação dessas células dependem dos fatores estimuladores de colônias (CSFs), que regulam sua produção, maturação e função (WING *et al.*, 1984; METCALF, 1986; QUEIROZ, 1988).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstram que animais infectados por *Listeria* requerem uma demanda maior sobre o sistema hematopoético, resultando numa redução significativa no número de precursores para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea e hematopoese extramedular (DANTAS e QUEIROZ 1999; DANTAS *et al.*, 1999; QUEIROZ *et al.*, 2000; QUEIROZ *et al.*, 2002 QUEIROZ *et al.*, 2003; ERBELIN *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Diante da importância destas células fagocitárias na fase inicial da infecção por *Listeria*, a avaliação do crescimento e diferenciação destas células, através da técnica de cultura clonal em meio-sólido, é um indicador das alterações hematopoéticas. Além disso, a importância dos granulócitos e macrófagos faz dessa infecção uma escolha adequada para avaliar o papel dos fatores estimuladores de colônia – G-CSF, M-CSF e GM-CSF (ZAHN *et al.*, 1998)



OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos protetores da administração da solução hidro alcoólica de própolis (SHAP) em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* (LM). Os parâmetros avaliados foram:

- número de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea e baço;
- produção de fatores estimuladores de colônias no soro;
- eficácia da SHAP frente a uma dose letal da LM;
- produção de INF- γ



MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Para a realização deste estudo foram utilizados camundongos machos BALB/c com idade de 6 a 8 semanas, os quais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Durante a fase experimental, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura constante de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo escuro de 12 horas. O regime alimentar foi o tipo clássico com ração comercial padrão. O tratamento foi realizado por via oral (gavagem).

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

- a. animais controle (sem tratamento);
- b. animais não inoculados com a bactéria e tratados com a SHAP,
- c. animais inoculados com a *Listeria monocytogenes* e não tratados,
- d. animais tratados com a SHAP e inoculados com a bactéria.

Este trabalho foi aprovado pela comissão de ética na experimentação animal (ceea-ib-unicamp), sob protocolo n° 965-1.

2. Tratamento

A solução hidro alcoólica de própolis (SHAP) foi gentilmente cedida por Sítio São Bernardo – Delfim Moreira, MG (Brasil). O produto consiste de um líquido de cor amarelada com odor e sabor característicos. Por espectrometria da massa foram identificados os seguintes constituintes: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, a mistura de ácido 3,5 diprenil-4-hidroxicinâmico + canferida (flavonóide) e a mistura do ácido comunico (terpeno) + dihidrocanferida (flavonóide).

Para o tratamento dos animais, a SHAP foi diluída em água mineral e preparada nas doses de 2, 4, 8, 16 e 24mg/Kg/dia. Os animais receberam todas as doses pela via oral

(gavagem) durante 10 dias consecutivos e a bactéria foi inoculada 2 horas depois da última administração.

3. *Listeria monocytogenes*

A bactéria *Listeria monocytogenes* utilizada para infectar os animais, é um cocobacilo gram-positivo, anaeróbio facultativo, móvel por flagelo peritríquios a temperatura ambiente, facilmente cultivável em ágar-sangue. Esta cepa foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica – Hospital de Clínicas desta Universidade. Após a aquisição, a 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 e *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 freezer a -80°C e repicada em meio de cultura BHI (Brain-Heart Infusion) e incubada por 24-48 horas a 37°C . As colônias obtidas nas culturas frescas de ágar-sangue foram diluídas em solução salina a 0,9% e as concentrações determinadas por espectrofotometria através da Escala de McFarland (Vitek Colorimeter).

Para a manutenção da patogenicidade da bactéria a mesma foi periodicamente repassada sucessivamente por 25 vezes em camundongos, 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, mantidos em BHI por 24-48 horas e, logo após, a bactéria foi isolada em placas de ágar-sangue. Após o seu isolamento, diluições da mesma foram realizadas até atingir a concentração apropriada para o uso.

Para o estudo dos parâmetros hematopoéticos e dosagem de citocina IFN- γ foi utilizada a dose subletal de $1,5 \times 10^4$ bactérias/animal. Para a avaliação da sobrevivência dos animais foi necessário utilizar uma concentração letal de $1,5 \times 10^6$ bactérias/animal, a qual foi inoculada intraperitonealmente no décimo dia de tratamento.

A resposta hematopoética e dosagem de citocina IFN- γ foi avaliada 24, 48 e 72 horas após a infecção. .

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

Para enumerar estas células clonogênicas é importante que todas as células multipotenciais presentes na cultura sejam induzidas a proliferar e que as condições de cultura sejam ajustadas para se evitar um número exagerado de colônias em cada placa de petri com consequente superposição das mesmas, de modo a permitir a identificação de cada colônia. Também é importante que o fator estimulador de colônias (rGM-CSF; Sigma G-0282) seja utilizado em concentrações supermáximas. Além disso, a escolha do soro fetal bovino deve ser feita cuidadosamente devido à variação na atividade dos vários lotes e marcas.

4.1. Medula óssea

Após sacrificar o animal através do deslocamento cervical, limpou-se a pele com álcool 70%. Após exposição do fêmur removeu-se a cartilagem sobre o orifício na extremidade distal e cortou-se o osso na junção superior.

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

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

4.2. Baço

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

O número de células na suspensão foi contado em câmara hematócitolométrica após diluição (1:20) das células em azul de tripan 1% e a concentração da suspensão celular ajustada para $2,5 \times 10^5$ células/mL.

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

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

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

A seguir, adicionou-se ao meio descrito acima, o volume apropriado de células (1×10^5 células/mL para a medula óssea e $2,5 \times 10^5$ células/mL para o baço), e distribuiu-se volumes de 2 mL em cada placa de Petri (35 mm), já contendo 100µL do estímulo apropriado (rGM-CSF; Sigma G-0282). Deixou-se geleificar e incubou-se por 7 dias a 37°C

em presença de 5% de CO₂. Após este período contou-se o número de colônias formadas em microscópio de dissecação com aumento de 40x (METCALF, 1984).

5. Obtenção do soro dos animais para detecção da atividade dos fatores estimuladores de colônias

O sangue dos animais dos grupos experimentais foi obtido do plexo ocular, sendo separado em “pools”, centrifugados para obtenção do soro e armazenados a -20°C. A presença de fatores estimuladores de colônias no soro dos animais foi determinada pela 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 fator estimulador de colônias (rGM-CSF; Sigma, G-0282) ilustrada na figura 1. 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/mL.

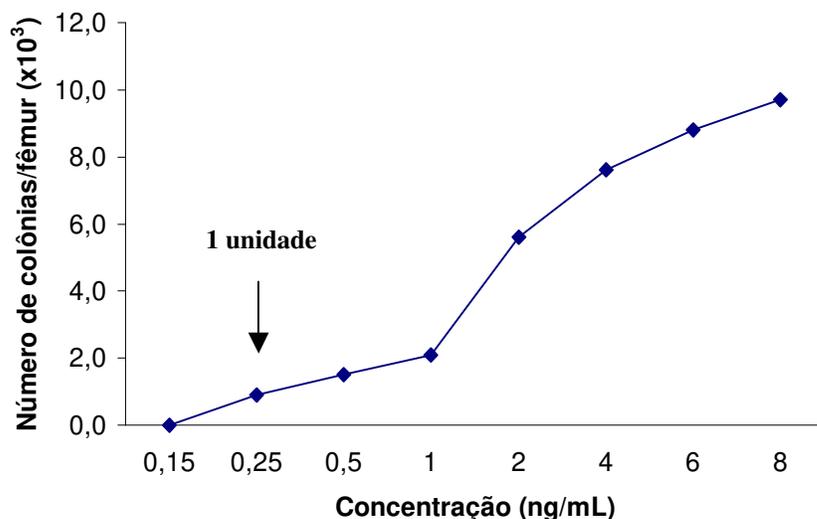


Figura 1. Curva da capacidade estimuladora do crescimento de colônias expressa em unidades/mL.

6. Realização da curva de sobrevida

Com o intuito de observar uma possível proteção dos animais tratados com a SHAP, realizou-se uma curva de sobrevida. Foram considerados dois grupos experimentais: animais somente infectados com *Listeria monocytogenes* $1,5 \times 10^6$ bactérias/animal e, animais tratados com SHAP nas doses de 2, 4, 8, 16 e 24mg/Kg por 10 dias e infectados 2 horas após, com a mesma concentração de bactéria. Os animais foram observados por um período de 30 dias.

7. Dosagem de IFN- γ no sobrenadante de culturas de células esplênicas

As concentrações de IFN- γ 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 72 horas 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) foram adicionados 800 μ L de RPMI enriquecido com 5% de SBF e 200 μ L de suspensão celular em cada poço. As placas foram incubadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após 48 horas de incubação foram coletados os sobrenadantes para dosagem da citocina (IFN- γ).

Em seguida, a produção da citocina foi dosada utilizando-se o kit DuoSet ELISA mouse IFN- γ (DY485; R&D System).

8. Análise estatística

A análise de variância foi utilizada para avaliar as variáveis CFU-C/fêmur; CFU-C/baço; fatores estimuladores de colônias, peso do baço e citocinas. O teste de Tukey foi utilizado quando a análise de variância detectava diferenças significativas entre os grupos. A curva de sobrevivência dos animais foi representada pelo método descrito por Kaplan-Maier (COLLET, 1994). A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Log-rank. Em todos os grupos estudados, foram considerados estatisticamente significativos aqueles cujos valores de P foram menor que 0,05.



RESULTADOS

1. EFEITOS DA SHAP NA SOBREVIDA DE ANIMAIS INFECTADOS COM UMA DOSE LETAL DE *Listeria monocytogenes*

Os resultados obtidos na avaliação da eficácia da SHAP na sobrevida de animais infectados com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^6$ bactérias/animal) estão representados na figura 2.

Podemos observar que os animais apenas infectados, recebendo veículo (água estéril por gavagem), apresentaram uma taxa de mortalidade de 100% até o quinto dia após a inoculação bacteriana. O pré-tratamento com a dose de 4mg/Kg de SHAP aumentou a resistência dos animais a *Listeria monocytogenes*, resultando em 20% de sobrevida ($P < 0,05$). As doses de 2, 8, 16 e 24 mg/Kg de SHAP não demonstraram proteção dos animais.

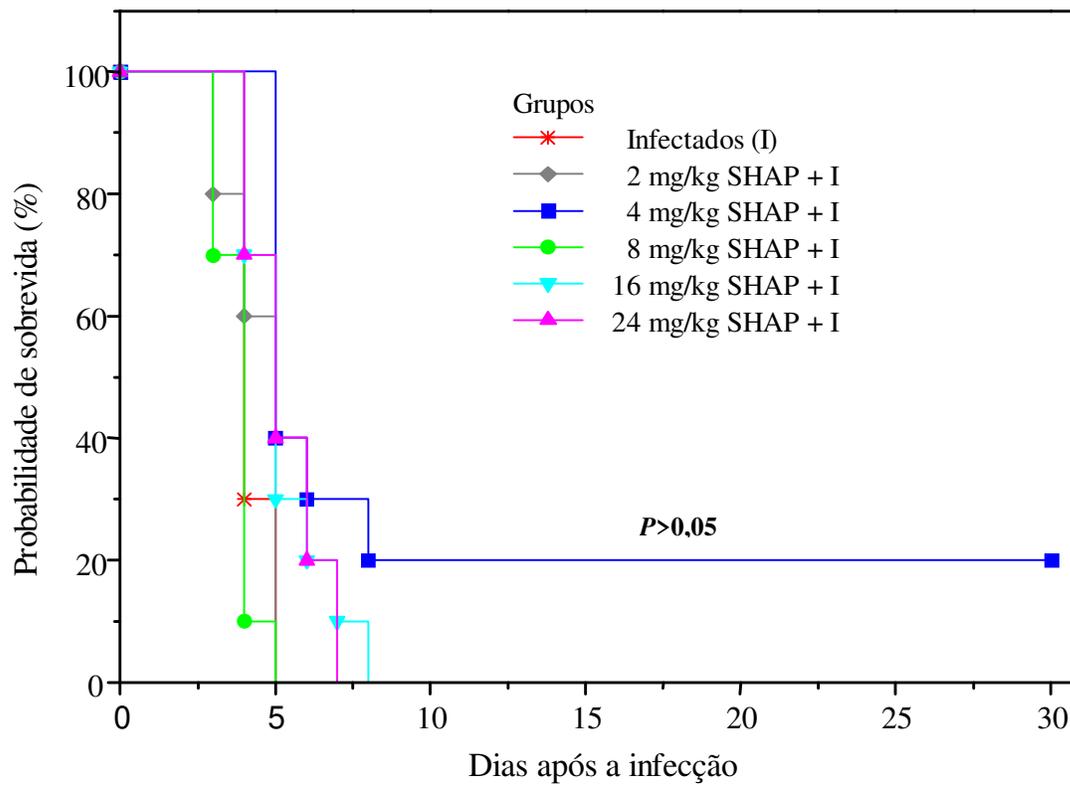


Figura 2. Efeitos do tratamento por 10 dias consecutivos de diferentes concentrações de SHAP (2, 4, 8, 16 e 24 mg/Kg/dia) na sobrevivência de camundongos BALB/c infectados com dose letal de *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^6$ bactérias/animal). $P < 0,05$ para a dose de 4mg/Kg em relação ao grupo somente infectado (tratado com água estéril). $n = 10$, Curva de Kaplan-Maier, Teste Log-Rank.

2. EFEITOS DA SHAP SOBRE O NÚMERO DE PRECURSORES HEMATOPOÉTICOS PARA GRANULÓCITOS E MACRÓFAGOS DA MEDULA ÓSSEA E DO BAÇO DE CAMUNDONGOS (CFU-C)

2.1 - Medula óssea

Os resultados do pré-tratamento por 10 dias com SHAP na atividade hematopoética da medula óssea em animais normais e infectados com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^4$ bactérias/animal) estão representados na figura 3.

O tratamento de animais normais (não infectados) com todas as diferentes doses SHAP não produziu alterações no número de CFU-GM medular quando comparado com o grupo controle. A infecção com dose subletal de *Listeria monocytogenes* provocou uma redução significativamente no número de CFU-GM comparado ao grupo controle, a qual foi observada às 48 e 72 horas após a inoculação conforme dados anteriores de nosso laboratório. O tratamento com as diferentes doses de SHAP preveniu a mielossupressão induzida pela infecção apenas na dose de 4mg/Kg 48h ($P < 0,001$) e 72h ($P < 0,05$). As doses de 2 e 8 mg/Kg produziram respostas iguais às do grupo infectado.

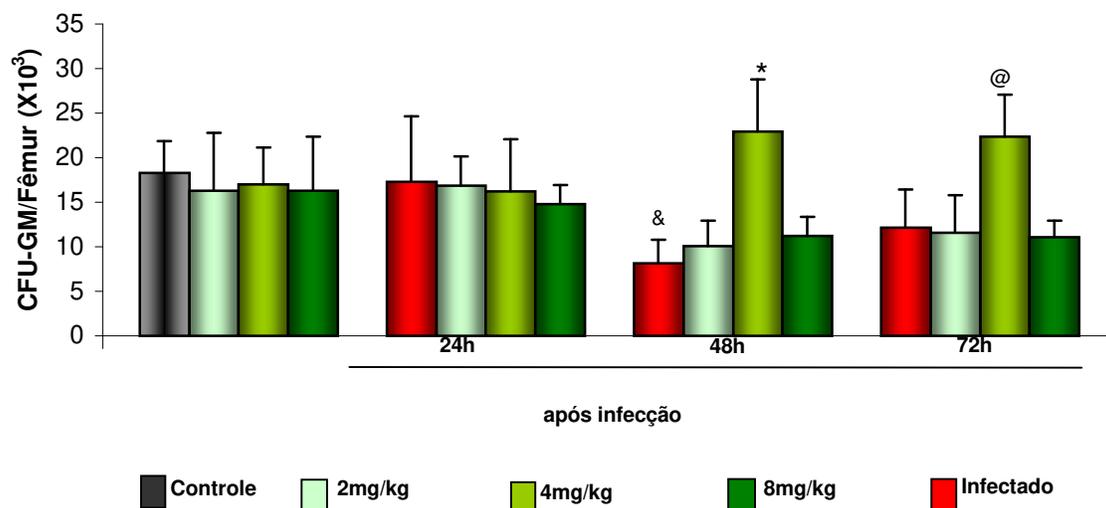


Figura 3 - Número de precursores hematopóéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea de camundongos infectados com dose subletal ($1,5 \times 10^4$ i.p. bactérias/animal) *Listeria monocytogenes* e tratados profilaticamente por 10 dias consecutivos com diferentes doses de SHAP (2, 4 e 8 mg/Kg/dia). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72h após a infecção. O grupo controle recebeu água. Os dados representam a média \pm desvio padrão obtidos de 6 animais por grupo. & $P < 0,05$, em relação ao grupo controle; * $P < 0,001$ em relação ao grupo infectado 48h, e @ $P < 0,05$, em relação ao grupo infectado 72h. ANOVA – Teste Tukey.

2.2- Baço

Os resultados do pré-tratamento por 10 dias com SHAP na atividade hematopoética extramedular em animais normais e infectados com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^4$ bactérias/animal) estão representados na figura 4.

O tratamento de animais normais (não infectados) com todas as diferentes doses SHAP não produziu alterações no número de CFU-GM na formação de colônias esplênicas quando comparado com o grupo controle. A infecção com dose subletal de *Listeria monocytogenes* provocou um aumento significativamente no número de CFU-GM comparado ao grupo controle, a qual foi observada as 48 e 72 horas após a inoculação conforme dados anteriores de nosso laboratório. O tratamento com as diferentes doses de SHAP evitou o aumento drástico da atividade hematopoética extramedular induzida pela infecção apenas na dose de 4mg/Kg 48h ($P < 0,01$), e 72h ($P < 0,001$). As doses de 2 e 8 mg/Kg produziram respostas iguais às do grupo infectado.

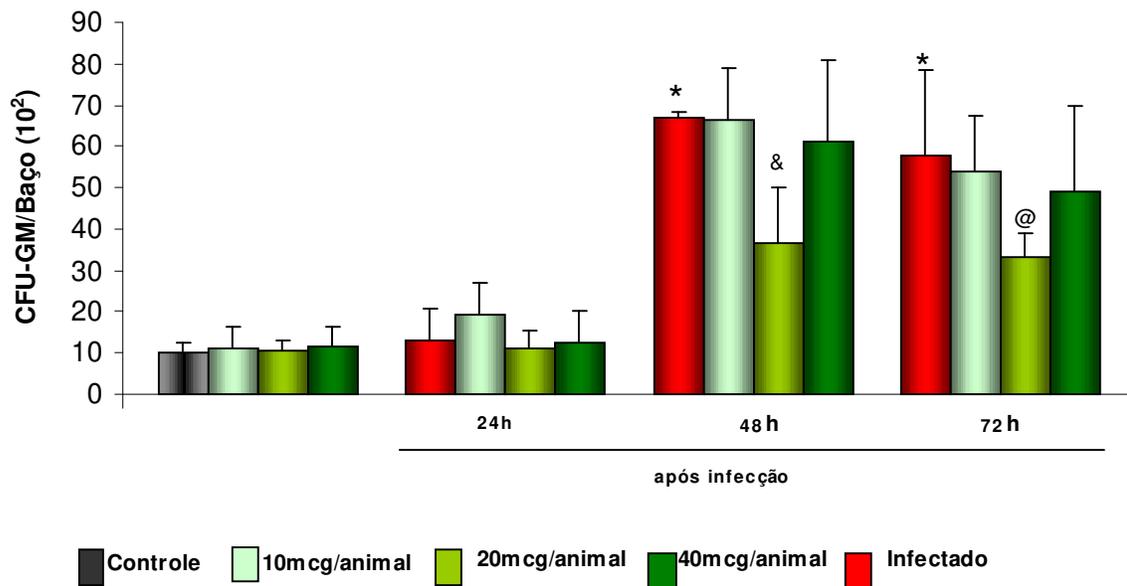


Figura 4 - Número de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) no baço de camundongos infectados com dose subletal ($1,5 \times 10^4$ i.p. bactérias/animal) *Listeria monocytogenes* e tratados profilaticamente por 10 dias consecutivos com diferentes doses de SHAP (2, 4 e 8 mg/Kg/dia). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72h após a infecção. O grupo controle recebeu água. Os dados representam a média \pm desvio padrão obtidos de 6 animais por grupo. * $P < 0,001$, em relação ao grupo controle; & $P < 0,01$ em relação ao grupo infectado 48h, e @ $P < 0,001$, em relação ao grupo infectado 72h. ANOVA – Teste Tukey

3. EFEITOS DA SHAP SOBRE A PRODUÇÃO DE FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS (CSFs)

Os resultados do pré-tratamento por 10 dias com SHAP sobre a produção de fatores estimuladores de colônias no soro de animais normais e infectados com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^4$ bactérias/animal) estão representados na figura 5.

Nos animais normais (não infectados) tratados com diferentes doses da SHAP não observamos um aumento nos níveis séricos de CSFs. A infecção com dose subletal de *Listeria monocytogenes* produziu um aumento agudo nos níveis séricos de CSFs comparado ao grupo controle, a qual foi observada as 48 e 72 horas após a inoculação conforme dados anteriores de nosso laboratório. O pré-tratamento com a dose de 4mg/Kg de SHAP, aumentou a produção de CSFs significativamente em relação ao grupo infectado após 48 ($P < 0,001$) e 72 horas ($P < 0,05$). Os resultados obtidos com as doses de 2 e 8mg/Kg da SHAP não foram significativos em relação ao grupo infectado.

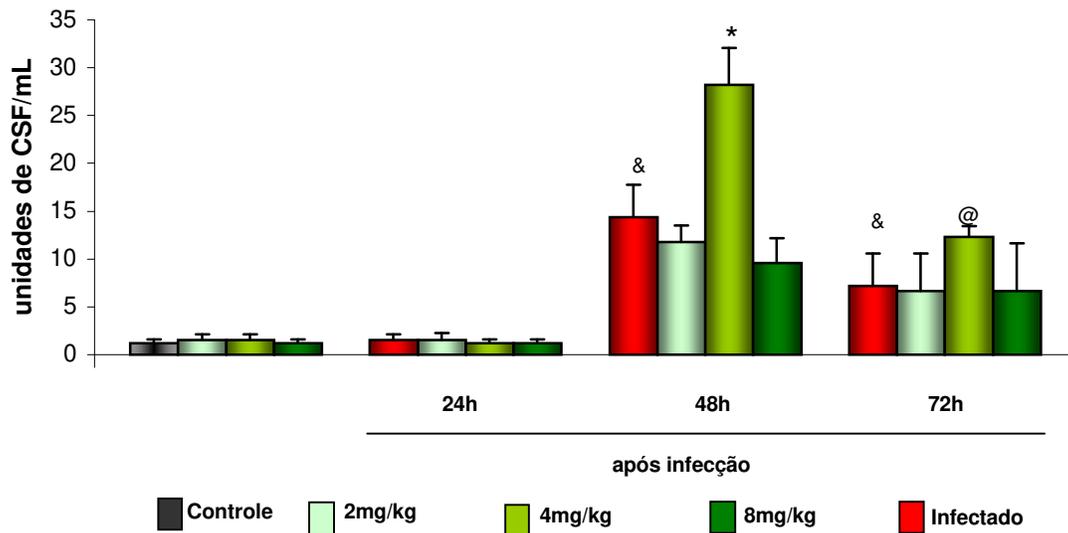


Figura 5. Efeitos das diferentes doses de SHAP (2, 4 e 8 mg/Kg/dia) administrados profilaticamente durante 10 dias consecutivos sobre a produção de fatores estimuladores de colônias no soro de animais normais e infectados com dose subletal ($1,5 \times 10^4$ bactérias/animal) de *Listeria monocytogenes*. Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. O grupo controle recebeu água. Os dados representam a média \pm desvio padrão obtidos de 6 animais por grupo. & $P < 0,001$ em relação ao controle; * $P < 0,001$, em relação ao infectado 48 horas; @ $P < 0,05$, em relação ao infectado 72 horas. ANOVA – Teste Tukey.

4. EFEITOS DA SHAP SOBRE A PRODUÇÃO DE IFN- γ NO SOBRENADANTE DE CULTURAS DE CÉLULAS ESPLÊNICAS

Os resultados do pré-tratamento por 10 dias com SHAP sobre a produção da citocina IFN- γ no sobrenadante de culturas de células esplênicas de animais normais e infectados com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^4$ bactérias/animal) estão representados na figura 6.

Nos animais normais (não infectados) tratados com a SHAP não observamos alterações na produção de IFN- γ nas culturas analisadas. A infecção com dose subletal de *Listeria monocytogenes* produziu um aumento significativo da produção de IFN- γ em relação ao grupo controle 48h após a infecção. O pré-tratamento com a dose de 4mg/kg de SHAP aumentou a produção de IFN- γ em relação aos grupos infectados após 48 ($P < 0,001$) e 72 horas ($P < 0,01$).

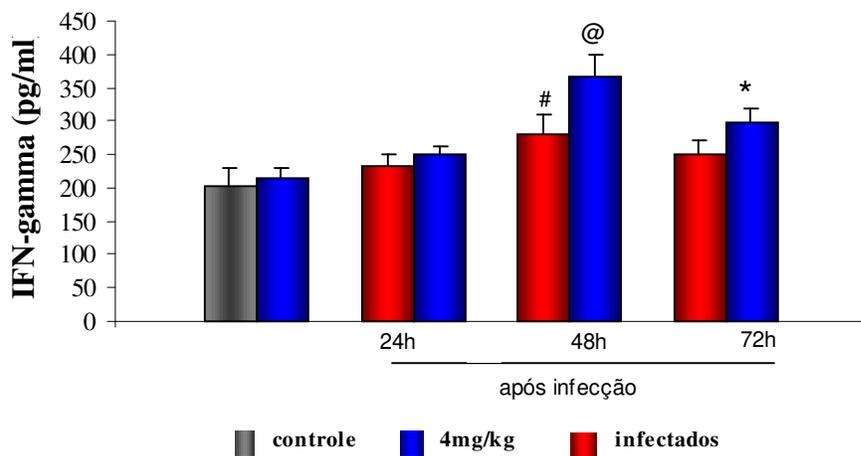


Figura 6 - Efeitos da administração profilática de SHAP por 10 dias consecutivos com a dose de 4mg/kg sobre a produção de IFN- γ em sobrenadantes de culturas esplênicas de animais normais e infectados com dose subletal de *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^4$ i.p. bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. O grupo controle recebeu água. Os dados representam a média \pm desvio padrão obtidos de 6 animais por grupo. [#]P>0.001, em relação ao grupo controle, [@]P>0.001, em relação ao grupo infectado 48h e ^{*}P<0.01, em relação ao grupo infectado 72 horas. ANOVA – Teste Tukey.



DISCUSSÃO

Atualmente, o aumento expressivo na busca por fármacos de origem natural é evidenciado pelo crescente número de publicações científicas na área de etnofarmacologia. Produtos de origem natural constituem uma importante fonte de componentes biologicamente ativos, muitos dos quais podem servir de modelo para a síntese de fármacos inovadores (CALIXTO, 2003). Imunomodulação através destas substâncias pode ser considerada uma alternativa para a prevenção e cura de infecções (ORSOLIC e BASIC, 2002).

Os granulócitos e macrófagos destacam-se como células vitais na defesa contra infecções bacterianas (METCALF, 1986; CHEERS, *et al.*, 1988). Estudos demonstram que na Listeriose a habilidade da medula óssea em produzir e mobilizar estas células para o sítio da infecção é essencial na resposta imunológica primária, e conseqüentemente na sobrevivência do animal (WING *et al.*, 1985; CHEERS *et al.*, 1988; KAYASHIMA *et al.*, 1993; ZHAN *et al.*, 1998). Estas células são derivadas dos progenitores pluripotenciais da medula óssea e o crescimento destas colônias é um indicador das alterações hematopoéticas que ocorrem durante o processo infeccioso, em particular com uma bactéria intracelular facultativa como a *Listeria monocytogenes* (LM).

Estudos do nosso laboratório definiram a listeriose como um modelo prático e eficaz para avaliar diversos compostos naturais, nos vários componentes da resposta imunológica do hospedeiro envolvidos na defesa contra a LM, com ênfase na habilidade do tecido hematopoético em produzir e mobilizar macrófagos (BINCOLETTO e QUEIROZ, 1996; QUADROS *et al.*, 1999, DANTAS *et al.*, 1999; DANTAS e QUEIROZ, 1999; QUEIROZ *et al.*, 2000a; QUEIROZ *et al.*, 2000b; MELO *et al.*, 2001, QUEIROZ *et al.*, 2001, QUEIROZ *et al.*, 2003; ERBELIN *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Já está bem documentado na literatura que a infecção primária por listeria está associada a um aumento nos níveis de fatores estimulantes de colônias (CSFs) e na quantidade de granulócitos e macrófagos no local da infecção, seguido de uma redução no número de células progenitoras na medula óssea e um drástico aumento da hematopoese extra-medular (WING *et al.*, 1985, CHEERS *et al.*, 1988; CHEERS e STANLEY, 1988, QUEIROZ *et al.*, 2000a; QUEIROZ *et al.*, 2000b; , QUEIROZ *et al.*, 2001, QUEIROZ *et al.*, 2003; ERBELIN *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Sabe-se que estas células progenitoras podem migrar da medula óssea através do sangue para outros tecidos hematopoéticos como o baço, sítio de replicação bacteriana, como parte da defesa do hospedeiro (WING *et al.*,1985). A persistente elevação dos níveis de CSFs serve como estímulo constante para sustentar a sobrevivência, proliferação, diferenciação e função dos granulócitos e macrófagos, uma vez que os níveis retornam ao normal quando a contagem no fígado e baço aproximam-se de zero (CHEERS *et al.*; 1988; KAYASHIMA, *et al.*; 1993; ZHAN, *et al.*; 1998; GULERIA e POLLARD, 2001; JIN *et al.*, 2002).

Nossos resultados corroboram com estes dados, uma vez que a administração de uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* ($1,5 \times 10^4$ bactérias/animal) reduziu significativamente o número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea 48 horas após a infecção, com aumento no baço em 48 e 72 horas após a infecção. Portanto, para verificar os mecanismos subjacentes à eficácia terapêutica da solução hidro alcoólica de própolis (SHAP), investigamos os efeitos do tratamento sobre o número de CFU-GM na medula óssea de animais normais e infectados com *L. monocytogenes*. Nestes experimentos, observamos que o tratamento profilático por 10 dias consecutivos de animais normais com as doses de 2, 4 e 8mg/kg/dia SHAP não produziu nenhum efeito no número de CFU-GM da medula óssea dos camundongos. Entretanto, o pré-tratamento de animais infectados com a dose de 4mg/kg reverteu a mielossupressão atingindo os níveis dos controles.

A listeriose induz a migração das células fagocíticas da medula óssea em direção ao baço, visto que este é o local de replicação da bactéria e um componente essencial da resposta primária frente à infecção. A administração da dose de 4mg/kg foi capaz de prevenir o aumento do número de CFU-GM, entretanto não atingiram os níveis dos controles.

Além disso, avaliamos os efeitos do tratamento com SHAP sobre a atividade estimuladora de colônias hematopoéticas do soro (CSA) de animais normais e infectados com *L. monocytogenes*. Verificamos que o tratamento de animais normais com as três doses não produziu nenhum efeito. Todavia, para os animais infectados, a dose de 4mg/kg/dia aumentou significativamente estes fatores 48 e 72 horas após a infecção.

Adicionalmente, avaliamos os efeitos do tratamento com o produto sobre os níveis de IFN- γ no sobrenadante de cultura de células esplênicas dos animais infectados e tratados/infectados com listeria. Observamos o aumento desta citocina 48 horas após a infecção. Verificamos que o tratamento de animais normais com a dose de 4mg/kg/dia não produziu nenhum efeito. Todavia, para os animais infectados, a dose de 4mg/kg/dia aumentou significativamente esta citocina 48 e 72 horas após a infecção em relação aos animais somente infectados. Este resultado está de acordo com estudos anteriores o qual foi observado o aumento IFN- γ em culturas de células esplênicas de camundongos tratados com baixas concentrações de própolis (2,5 e 5mg/kg) SÁ-NUNES *et al.* 2003. Camundongos imunizados com o vírus de hepes suína do tipo 1 e tratado com extrato etanólico de própolis verde resultou o aumento da expressão gênica de IFN- γ FISCHER *et al.* (2007)

O mecanismo pelo qual a SHAP melhorou a taxa de sobrevivência dos animais infectados com dose letal de listeria não está totalmente elucidado, porém sugerimos que é devido ao aumento da produção de IFN- γ e à prevenção da diminuição de CFU-GM na medula óssea. Verificou-se um aumento de 20% na sobrevivência dos animais tratados com 4mg/kg/dia.

Portanto, nossos resultados demonstram que a dose de 4mg/Kg de solução hidroalcoólica de própolis promove reversão da mielossupressão e da hematopoese extramedular, aumento da citocina IFN- γ a qual é essencial para ativação dos macrófagos, com conseqüente aumento da resistência dos animais contra infecção por listeria, mecanismos de fundamental importância em sua ação antibacteriana.



CONCLUSÃO

O presente estudo sobre os efeitos da SHAP, demonstrou:

- Prevenção da mielossupressão e da hematopoese extramedular causada pela infecção
- Aumento na atividade estimuladora de colônias no soro em animais infectados
- Aumento na sobrevivência de animais infectados
- Aumento de IFN- γ



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ansorge S, Reinhold D, Lendeckel U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- β 1 production of human immune cells. *Zeitschrift für Naturforschung* 2003; 58c: 580-9.

Bakardjiev AI, Theriot JA, Portnoy DA. *Listeria monocytogenes* traffics from maternal organs to the placenta and back. *PLoS Pathogenes* 2006; 2(6):623-31.

Bankova V. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2005; 2(1): 29-32.

Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Midorikawa K, Matsushige K, Message D, et al. *Cytotoxic*, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 72: 239–46

Berg RE, Crossley E, Murray S, Forman J. Relative contributions and CD8 T cells to IFN- γ mediated innate immune protection against *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Immunology* 2005; 175:1751-7.

Bincoletto C, Queiroz MLS. The effect of lead on the bone marrow stem cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Veterinary and Human Toxicology* 1996; 38: 186-90.

Blonska M, Bronikowska J, Pietsz G, Czuba ZP, Scheller S, Krol W. Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 91: 25-30.

Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* 2002; 73(1): S53-63.

Bosio K, Avanzini C, D'Avolio A, Ozino O, Savoia D. *In vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 2000; 31:174-7.

Bouwer HGA, Barry RA, Hinrichs DJ. Acquired immunity to an intracellular pathogen: immunologic recognition of *Listeria monocytogenes*-infected cells. Immunological Reviews 1997; 158:137-46.

Boyanova L, Kolarov R, Gergova G, Mitov I. *In vitro* activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria. Anaerobe 2006 12:173-7.

Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). Food and Chemical Toxicology 1998; 36:347-63.

Calixto J.B. Biodiversidade como fonte de novos medicamentos. Ciência e Cultura 2003; 55(3): 37- 37.

Chang SR, Wang KJ, Lu YF, Yang LJ, Chen WJ, Lin YH, et al. Characterization of early gamma interferon (IFN- γ) expression during murine listeriosis: I identification of NK1.1⁺ CD11c⁺ cells as the primary IFN- γ -expressing cells. Infection and Immunity 2007; 1167-76

Cheers C, Stanley ER. Macrophages production during murine listeriosis: colony-stimulating factor 1 (CSF-1) and CSF-1-binding cells in genetically resistant and susceptible mice. Infection and Immunity 1988; 56(11): 2972-78.

Cheers C, Haigh AM, Kelso A, Metcalf D, Stanley ER, Young AM. Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage-, and multi-CSFs. Infection and Immunity 1988; 56(1): 247-51.

Collet D. Modeling survival data in medical research. IN: COLLET D. Texts in Statistical Science. London: Chapman & hall, 1994. p 1-13.

Conlan JW, North RJ. Roles of *Listeria monocytogenes* virulence factors in survival: virulence factor distinct from Listeriolysin are needed for the organism to survive an early neutrophil-mediated host defense mechanism. Infection and Immunity 1992; 951-7.

Conlan JW, North RJ. Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* 1 defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by granulocyte-depleting monoclonal antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1994; 179:259-68.

Cossart P, Bierne H. The use of host cell machinery in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *Current Opinion in Immunology* 2001; 13:96-103.

Dantas CM, Queiroz MLS Effects of *Chlorella vulgaris* on bone marrow progenitor cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Immunopharmacology* 1999; 21: 499-508.

Dantas DCM, Kaneno R, Queiroz MLS. Effects of *Chlorella vulgaris* in protection of mice infected with *Listeria monocytogenes*. Role of natural killer cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 1999; 21(3): 609-19.

Dimov V, Ivanovska N, Manolova N, Bankova V, Nikolov N, Propov S. Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. *Apidologie* 1991, 22:155-62.

Dramasi S, Levi S, Troller A, Crossart P. Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an in vitro study. *Infection and Immunity* 1998; 66:4461-68.

Eberlin S, Santos LMB, Queiroz MLS. *Uncaria tomentosa* extract increase the number of myeloid progenitor cells in the bone marrow of mice infected with *Listeria monocytogenes*. *International Immunopharmacology* 2005; 5: 1235-46.

Edelson BT, Unanue ER. Immunity to *Listeria* infection. *Current Opinion in Immunology* 2000; 12:425-31.

El-Khawaga OAY, Salem TA, Elshal MF. Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. ***Clinica Chimica Acta*** 2003; 338:11-16.

Fischer G, Conceição FR, Leite FPL, Dummer LA, Vargas GA, Hübner SO, et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular response of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine* 2007; 25: 1250-56.

Flesch IEA, Collins H, Hess J, Kaufmann SHE. Checkpoints in antibacterial immunity. *Research in Immunology* 1998; 149:693-97.

Freeman MM, Ziegler HK. Simultaneous Th1-type cytokine expression is a signature of peritoneal CD4+ lymphocytes responding to infection with *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Immunology* 2005, 175:394-403.

Guleria I, Pollard JW, Aberrant macrophage and neutrophil population dynamics and impaired Th1 response to *Listeria monocytogenes* in colony-stimulating factor 1- deficient mice. *Infection and Immunity* 2001; 69(3): 1795-807.

Han S, Sung KH, Yim D, Lee S, Cho K, Lee CK, *et al.* Activation of murine macrophage cell line RAW 2664.7 by Korean propolis. *Archives of Pharmaceutical Research* 2002, 25: 895-902.

Humman J, Bjordahl R, Andreassen K, Lenz LL. Expression of the p60 autolysin enhances NK cell activation and is required for *Listeria monocytogenes* expansion in IFN- γ -Responsive Mice¹, *The Journal of Immunology* 2007; 178: 2407-14.

Harty JT, Lenz LL, Bevan MJ. Primary and secondary immune responses to *Listeria monocytogenes*, *Current Opinion in Immunology* 1996, 8:526-30.

Ho CC, Lin SS, Chou MY, Chen FLI, Hu CC, Chen CS, *et al.* Effects of CAPE-like compounds on HIV replication *in vitro* and modulation of cytokines *in vivo*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; 56:372-79.

Hu F, Hepburn HR, Li Y, Chen M, Radloff SE, Daya S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 100:276-83.

Huleihel M, Ishano V. Effect of propolis extract on malignant cell transformation by moloney murine sarcoma virus. *Archives of Virology* 2001; 146 (8): 1517-26.

Ivanovska ND, Dimov VB, Pavlova S, Bankova VS, Popov SS. Immunomodulatory action of propolis v. anticomplementary activity of a water-soluble derivative. *Journal of Ethnopharmacology* 1995; 47:135-43.

Jasprica I, Mornar A, Debeljak Z, Bubalo AS, Saric MM, Mayer L, et al. *In vivo* study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *Journal of Ethnopharmacology* 2007;110: 548-54.

Jensen ER, Shen H, Wettstein FO, Ahmed R, Miller JF. Recombinant *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vehicle and a probe for studying cell-mediated immunity. *Immunological Reviews* 1997; 158:147-57.

Kaufmann SHE. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunology Today* 1997; 16(7): 338-42.

Kayashima S, Tsuru S, Hata N, Rokutanda M. The therapeutic effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on the protection against *Listeria* infection in SCID mice. *Immunology* 1999 80: 471-76

Khayyal MT, El-Ghazaly MA, El-Khatib AS, Hatem AM, Vries Pjf, El-Shafei S, et al. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2003; 17: 93-102.

Kolb-Mäurer A, Weissinger F, Kurzai O, Mäurer M, Wilhelm M, Goebel W. Bacterial infection of human hematopoietic stem cells induces monocytic differentiation. *Immunology and Medical Microbiology* 2004; 40:147-53.

Kuhn M, Goebel W. Response by murine macrophages infected with *Listeria monocytogenes* crucial for the development of immunity to this pathogen. *Immunological reviews* 1997; 158:57-67.

Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology* 1999; 64: 235-40.

Mahmoud N, Carothers AM, Grunberger D, Bilinski TR, Churchill RM, Martucci C. Plant phenolic decrease intestinal tumors in an animal model familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis* 2000; 21(5): 921-28.

Mannering SI, Zhong J, Cheers C. T-cell activation, proliferation and apoptosis in primary *Listeria monocytogenes* infection. *Immunology* 2002; 106:87-95.

Masihi KN. Immunomodulators in infectious diseases: panoply of possibilities. *International Journal of Immunopharmacology* 2000; 22: 1083-1091.

Melo A, Justo GZ, Queiroz MLS. Stimulation of myelopoiesis in *Listeria monocytogenes*-infected by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. *Human & Experimental Toxicology* 2001; 20: 38-45.

Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 1986; 56(6): 257-67.

Metcalf D. The bioassay of colony-stimulating factors. In: METCALF D. *The Hematopoietic Colony- Stimulating Factors*. Amsterdam: Elsevier, 1984. p. 187-212

Mielke MEA, Peters C, Hahn H. Cytokines in induction and expression of T-cell-mediated granuloma formation and protection in the murine model of listeriosis. *Immunological Reviews* 1997; 158:79-93.

Missima F, Sforcin JM. Green Brazilian propolis action on macrophages and lymphoid organs of chronically stressed mice. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2007; 1-5.

Mocci S, Dalrymple SA, Nishinakamura R, Murray R. The cytokine stew and innate resistance to *Listeria monocytogenes*. *Immunological Reviews* 1997; 158:107-14.

Nakajima Y, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects *via* antioxidant actions. *Life Sciences* 2007; 80: 370-77.

Natarajan K, Singh S, Jr Burke TR, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93: 9090-95

Nishibori T, Xiong H, Kawamura I, Arakawa M, Miysuyama M. Induction of cytokine gene expression by Listeriolysin O and roles of macrophages and NK cells. *Infection and Immunity* 1996; 64: 3188-95.

Nomura T, Kawamura I, Isuchiya K, Kohda C, Baba H, Ito Y, et al. Essential role of interleukin-12 (IL-12) and IL-18 for gamma interferon production induced by listeriolysin O in mouse spleen cells. *Infection and Immunity* 2002; 70(3): 1049-55.

North RJ, Dunn PL, Conlan JW. Murine listeriosis as a model of antimicrobial defense. *Immunological Review*, 1997; 158:27-36.

Orsi RO, Sforcin JM, Funari SRC, Bankova V. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. *International Immunopharmacology* 2005; 5: 359-68.

Orsolich N, Sver L, Terzic S, Basic I. Peroral application of water-soluble derivative of propolis (WSDP) and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumour activity. *Veterinary Research Communications* 2005; 29: 575-93.

Orsolich N, Kenezevic AH, Sver L, Terzic S, Basic I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 94: 307-15.

Orsolic N, Basic I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 84: 265-73.

Pamer G.E. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nature* 2004; 4: 812-83.

Pamer EG, Sits AJAM, Villanueva MS, Busch DH, Vijn S. MHC class I antigen processing of *Listeria monocytogenes* proteins: implications for dominant and subdominant CTL responses. *Immunological Reviews* 1997; 129-36.

Park JH, Lee JK, Kim HS, Chung ST, Eom JH, Kim KA, et al. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. *International immunopharmacology* 2004; 4: 429-46.

Paulino N, Dantas AP, Bankova V, Longhi DT, Scremin A, Castro SL, Calixto J.B. Bulgarian propolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits in vitro contraction of airway smooth muscle. *Journal of Pharmacological Sciences* 2003; 93: 307-13.

Paulsen SM. Use of herbal products and dietary supplements by oncology patients. *Highlights in Oncology Practice* 1998; 15(4): 94-106.

Quadros MR, Souza Brito ARM, Queiroz MLS. *Pitiveria Alliacea L.* extract protects mice against *Listeria monocytogenes*-infection - effects on bone marrow progenitor cell. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 1999; 21(1): 109-24.

Queiroz MLS, Justo GZ, Pereira-Da-Silva FRR, Muller AH, Guilhon GMSP. Stimulatory action of *Pluchea quitoc* extract on the hematopoietic response during murine listeriosis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2000a; 22(4): 721-40.

Queiroz MLS, Quadros MR, Santos LMB. Cytokine profile and natural killer cell activity in *Listeria monocytogenes* infected mice treated orally with *Pitiveria alliacea* extract. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2000b; 22(3): 501-18.

Queiroz MLS, Justo GZ, Valadares MC, Pereira-Da-Silva FRR. Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2001; 23(3): 367-82.

Queiroz MLS, Rodrigues APO, Bincoletto C, Figueredo CAV, Malacrida S. Protective effects of *Chorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. *International Immunopharmacology* 2003; 3: 889-900.

Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP et al. *Listeria* – review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 2007; 40: 4-13

Roach DR, Briscoe H, Saunders BM, Britton WJ. Independent protective effects for tumor necrosis factor and lymphotoxin alpha in the host response to *Listeria monocytogenes* infection. *Infection and Immunity* 2005; 47: 787-92.

Rogers HW, Tripp CS, Schreiber RD, Unanue ER. Interleukin-1 participates in the development of anti-*Listeria* responses in both normal and scid mice. *Proceedings National of the Academy of Sciences USA* 1992; 89:1011-15.

Salomão K, Pereira PRS, Campos LC, Borba CM, Cabello PH, Marcucci MC, et al. Brazilian propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2007; 1-8.

Sá-Nunes A, Faccioli LH, Sforcin JM. Própolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. *Journal of Ethnopharmacology* 2003, 87: 93-7

Schlech WF. Overview of listeriosis. *Food Control* 1996; 7(4/5): 183-6.

Schleicher U, Hesse A, Bogdan C. Minute numbers of contaminant CD8⁺ T cells or CD11b⁺CD11c⁺ NK cells are the source of IFN- γ in IL-12/IL-18 -stimulated mouse macrophage populations. *Blood* 2005; 105: 1319-28.

Sforcin JM, Jr.Fernandes A, Lopes CAM, Bankova V, Funari SRC. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 73: 243-49.

Sforcin JM., Jr.Fernandes A., Lopes CAM., Funari SRC., Bankova V., Seasonal effect on Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of Venoms and Animal Toxins* 2001; 7(1): 63-9.

Sheng J, Zhou J, Wang L, Xu J. Antioxidant activity of ethanol and petroleum ether extracts from Brazilian propolis. *European Food Research Technology* 2007; 225: 249-53.

Shinoniya 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* 1991; 4740-43.

Song YS, Park EH, Hur GM, Ryu YS, Kim YM, Jin C. Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 80:155-61,

Stepanovic S, Antic N, Dakic I, Vlahovic MS. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research* 2003; 158:353-57.

Suzuki I, Hayashi I, Takaki T, Groveman DS, Fujimiya Y. Antitumor and anticytopenic effects of extracts of propolis in combination with chemotherapeutic agents. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 2002; 17(5): 553-62.

Sy LB, Wu YL, Chiang BL, Wang YH, Wu WM. Propolis extract exhibit an immunoregulatory activity in an OVA-sensitized airway inflammatory animal model. *International Immunopharmacology* 2006 6:1053-60.

Teixeira ST, Valadares MC, Gonçalves SA, Melo A, Queiroz MLS. Prophylactic administration of *Withania somnifera* extract increases host resistance in *Listeria monocytogenes* infected mice. *International Immunopharmacology* 2006; 6:1535-42.

Thäle C, Kiderlen AF. Source of interferon-gamma (IFN- γ) in early immune response to *Listeria monocytogenes*. *Immunobiology* 2005; 210: 673-83.

Torres D, Janot L, Quesniaux VFJ, Grivennikov SI, Maillet I, Sedgwick JD, et al. Membrane tumor necrosis factor confers partial protection to *Listeria* infection. *American Journal of Pathology* 2005; 167:1677-87.

Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, et al. I. Bioactive Constituents of Brazilian red propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2006; 3(2): 249-54.

Unanue ER. Why listeriosis? A perspective on cellular immunity to infection. *Immunological Reviews* 1997a; 158-5.

Unanue ER. Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and T-cell response. *Immunological Reviews* 1997b; 158:11-25.

Van Den Engh GJ, Bol S. The presence of a CSF enhancing activity in the serum of endotoxin treated mice. *Cell Tissue Kinet* 1975; 8: 579-87.

Way SS, Havenar-Daughton C, Kolumam GA, Orgun NN, Murali-Krishna K. *The Journal of Immunology*.2007; 178: 4498-505.

Wiese, H. Os produtos das abelhas. Nova Apicultura. Porto Alegre, Rio Grande do Sul: Livraria e Editora Agropecuária Ltda, 1980. p. 426-27.

Wing EJ, Barczynski LC, Waheed A, Shaddock 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* 1985; 49(2): 325-28.

Wing EJ, Abdul W, Shaddock RK. Changes in serum colony- stimulating factor and monocytic progenitor cells during *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Infection and Immunity* 1984; 180-84.

Zhan Y, Lieschke GJ, Grail D, Dunn AR, Cheers C. Essential roles for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF in the sustained hematopoietic response of *Listeria monocytogenes*-infected mice. *Blood* 1998; 91(3): 863-69.