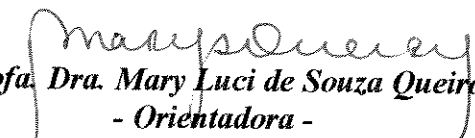


DANIELA STELLATI PEREIRA

***EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE TABEBUIA
AVELLANEDAE SOBRE A RESPOSTA HEMATOPOÉTICA
EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM LISTERIA
MONOCYTOGENES***

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 Dentista – Daniela Stellati Pereira.

Campinas, 31 de janeiro de 2002.


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

CAMPINAS

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
- 30 CIRCULANTE

DANIELA STELLATI PEREIRA

***EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE TABEBUIA
AVELLANEDAE SOBRE A RESPOSTA HEMATOPOÉTICA
EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM LISTERIA
MONOCYTOGENES***

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

Orientadora: Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

CAMPINAS

2002

INIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	P414e
V	EX
TOMBO BC	56286
PROC.	16-124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	4/11/03
Nº CPD	

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

2M00191989-B

ibid 304395

P414e

Pereira, Daniela Stellati

Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Tabebuia avellanedae* sobre a resposta hematopoética em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* / Daniela Stellati Pereira. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador : Mary Luci de Souza Queiroz

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

1. *Listeria*. 2. Medula óssea. 3. Baço. 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:

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Profa. Dra. Giselle Zenker Justo

Profa. Dra. Claudia Bincoletto Trindade

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

Data: 31/01/2002

20033741



*Explicação da poesia
Sem ninguém pedir*

*Um trem de ferro é uma coisa mecânica,
Mas atravessa a noite, a madrugada, o dia,
Atravessou a minha vida,
Virou só sentimento*

(Adélia Prado)

*Este trabalho, eu dedico a Antonio Carvalho, que
atravessa comigo os trilhos de ferro, meus dias e
composição.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria e Durval, por todo amor e presença em minha vida, pelos sonhos plantados e cultivados, e pela verdade que neles se faz.

À Professora Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, minha orientadora, pela oportunidade do início no meio científico, minha profunda gratidão e amizade.

À Laura Helena D'Ottaviano pelo carinho e estímulo vitais no traço desse caminho.

Aos meus amigos do Laboratório CFU: Adriana, Ana Cláudia, Carlos, Cláudia, Cris, Débora, Fernanda, Giselle, Gustavo, Júlia, Luciana, Marcos, Marize, Paula, Pamela, Rafael, Sílvia, Solange, Sueli e Valdirene.

Ao Setor de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica do HC/UNICAMP.

Ao CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Farmacologia, que possibilitou a elaboração desta tese de Mestrado.

	PÁG.
RESUMO	<i>viii</i>
ABSTRACT	<i>x</i>
1. INTRODUÇÃO	12
Modelo experimental de infecção por <i>Listeria monocytogenes</i>	15
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
1. Animais.....	21
2. <i>Listeria monocytogenes</i>	21
3. Tratamento.....	23
4. Cultura clonal de precursores hematopoéticos.....	25
4.1. Medula óssea.....	25
4.2. Baço.....	26
4.3. Preparação das placas de cultura da medula óssea e baço em meio semi-sólido.....	26
5. Preparação do meio condicionado de células esplênicas (SCM).....	27
6. Obtenção do soro dos animais para detecção da atividade dos fatores estimuladores de colônias.....	28
7. Realização da curva de sobrevivência.....	29
8. Peso do baço dos animais	29
9. Análise estatística.....	30
4. RESULTADOS	31
1. Efeitos do EHTA sobre o número de precursores hematopoéticos.....	32
1.1. Medula óssea.....	32
1.2. Baço.....	32
2. Efeitos do EHTA sobre a produção de fatores estimuladores de colônias.....	33
3. Efeitos do EHTA sobre o peso do baço dos animais.....	33

4. Efeitos do EHTA na sobrevivência de animais infectados com uma dose letal de <i>Listeria monocytogenes</i>	34
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
8. APÊNDICE	60



RESUMO

Neste trabalho, investigamos os efeitos do extrato hidroalcoólico de *Tabebuia avellanedae* (EHTA) sobre o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoéticos da medula óssea e do baço em animais infectados com *Listeria monocytogenes*. Foram também avaliadas alterações no peso do baço, atividade estimuladora de colônias do soro e a resistência dos animais à infecção. Durante 7 dias os camundongos BALB/c foram tratados com o EHTA com as doses de 125 mg/Kg , 250, 500 e 1000mg/Kg/dia por gavagem. Finalizando este período, os animais foram infectados com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal) e sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. Também foi realizada uma curva de sobrevivência, utilizando uma dose letal da bactéria (4×10^6 bactérias / animal), onde foi avaliada a resistência dos animais à infecção.

Nossos resultados demonstraram um decréscimo significativo no número de precursores hematopoéticos na medula óssea dos animais infectados com *Listeria monocytogenes*. Além do mais, também foi observado hematopoese extramedular no grupo infectado em 48 e 72 horas após a infecção. No entanto, quando os camundongos foram previamente tratados com EHTA (125, 250 e 500mg/Kg) a mielossupressão induzida pela infecção foi revertida, com a recuperação dos níveis normais de CFU-GM.

Em relação à produção de fatores estimuladores de colônias de células hematopoéticas, observamos uma maior atividade estimuladora da produção de CFU-GM no soro dos animais infectados. Os grupos tratados com EHTA (125, 250 e 500mg/Kg) e infectados com *Listeria* aumentou significativamente a atividade estimuladora de colônias do soro, na indução do número de CFU-GM em relação aos resultados encontrados em animais infectados e não tratados. Em contraste ao aumento no peso do baço em animais infectados, nos animais previamente tratados com EHTA apresentaram uma normalização no peso desse órgão.

O tratamento com EHTA (125, 250 e 500mg/Kg/dia) aumentou a resistência dos animais infectados com *Listeria*, em 15, 30 e 30% respectivamente.



ABSTRACT

In this work, we investigated the effects of *Tabebuia avellanedae* extract (TAHE) on the growth and differentiation of bone marrow and spleen hematopoietic progenitors in *Listeria monocytogenes* infected mice. Serum colony stimulating activity, weight changes of spleen and resistance of the animals as they faced infection were also evaluated.

For a period of 7 days BALB/c mice were treated daily with 125, 250, 500 and 1000mg/Kg/day of TAHE by gavage. At the end of this period, the animals were infected intraperitoneally with a sublethal dose (4x10⁴ bacteria/animal) and sacrificed 24, 48 or 72 hours after infection

Our results demonstrated a significant decrease on the number of bone marrow hematopoietic progenitors in *Listeria monocytogenes* infected mice at 48 and 72 hours after infection when compared with control. Moreover, extramedullar hematopoiesis was also observed in the infected group at 48 and 72 hours after infection. However, when these animals were treated with TAHE (125, 250 and 500mg/Kg), the myelosuppressive effects produced by infection were reverted, resulting in normal levels of CFU-GM.

Regarding the production of colony-stimulating factor, we observed that serum from infected animals presented a higher stimulatory activity on the CFU-GM generation. Treatment of infected groups with TAHE significantly increased the serum colony-stimulating activity, since in the CFU-GM number was induced in relation to the only infected groups.

In contrast to the increased spleen weight found in infected animals, TAHE-treated mice presented normal spleen weights.

Treatment with TAHE (125, 250 and 500 mg/Kg) also increased resistance of infected animals, as 15, 30 and 30 % of survivors were obtained in these groups, respectively.



1. INTRODUÇÃO

O aproveitamento de recursos naturais vem assumindo valor estratégico para governos e instituições privadas. Como resultado desse fenômeno, o trabalho de prevenção e estudo de espécies vegetais ganha uma nova expressão no cenário científico. Pau D'Arco, Ipê Roxo, Peúva e Lapacho são nomes populares concedidos a uma árvore da família das Bignoneaceae conhecida por *Tabebuia avellanedae* Lor. Ex Griseb. Possui madeira pesada (densidade 1,03 g/cm), dura, resistente e de grande durabilidade, mesmo em condições favoráveis ao apodrecimento. As árvores da família das Bignoneaceae são quase exclusivas de regiões tropicais de ambos hemisférios. (DINNEN & BISUZAKI, 1977; ACCORSI, 1988; UEDA, 1993; LORENZI, 2000).

Há séculos é utilizada pelos índios Tupi-Guaranis, assim como foi pela população dos Incas no tratamento de diversas afecções. (BORINO, 1981; MÜLLER, 1999). Atualmente na Europa e Américas é usada como anti-inflamatório, anti-parasitário, antimicrobiano, antifúngico e por suas propriedades antitumorais. (SANTANA, 1968; GONÇALVES DE LIMA, 1971; DUKE, 1985; ALMEIDA, 1990; GUIRAUD, 1994; DINNEN, 1997).

A análise qualitativa do extrato hidroalcoólico de *Tabebuia Avellanedae* (EHTA), mostra a presença de taninos, saponinas e traços de lapachol. A ocorrência de naftoquinonas em várias espécies do gênero *Tabebuia* são bastante conhecidas. Lapachol é uma naftoquinona muito desenvolvida em pesquisas científicas, devido às inúmeras propriedades medicinais observadas. (GONÇALVES de LIMA, 1956, 1962, 1971; GUIRAUD, 1994).

Um estudo utilizou-se de fenilbutazona e lapachol na mesma concentração de 150mg/Kg, demonstrou que este último obteve uma ação anti-inflamatória superior ao primeiro, 4 horas após a inoculação de Carrageenan nas patas de ratos. (OGA, 1969; ALMEIDA, 1990).

A atividade anti-parasitária do lapachol tem sido observada contra *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* (HUDSON et al., 1985; CARVALHO et al., 1988), *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania donovani* (BISCARDI et al., 1994; CROFT et al., 1992). Essa atividade parece estar relacionada a uma efetiva inibição do transporte de elétrons em protozoários (SAIZARBITORIA et al., 1997).

Em um outro estudo, administrando-se o extrato aquoso de *Tabebuia avellanedae* via intraperitoneal, na dose de 200 mg/Kg, obteve-se uma inibição de 44% no carcinoma de Walker 256 e 32% de inibição na dose de 500 mg/Kg quando administrado por via oral. (SANTANA & GONÇALVES DE LIMA, 1968)

A atividade antimicrobiana desta planta é encontrada tanto para cepas Gram-positivas quanto para Gram-negativas. Testes realizados para determinação da mínima concentração inibitória (MIC) obtiveram resultados positivos para um grande número de microorganismos patogênicos. Igualmente foi determinado através do método de difusão em ágar, onde o lapachol isolado dessa planta apresenta alta atividade antimicrobiana e antifúngica (ANESINI 1993 ; PORTILLO 2001). O lapachol demonstrou atividade antifúngica superior ao cetoconazole. (GUIRAUD, 1994)

Além dos efeitos terapêuticos do lapachol em relação a diversas enfermidades, também tem sido desenvolvido estudos para avaliação da toxicidade. Um resultado significativo foi a ocorrência de uma marcante anemia durante as duas primeiras semanas de administração de lapachol. A continuidade do tratamento após esse período inicial não agravou a anemia instalada, aliás houve melhora quadro, trazendo o número de células sanguíneas próximo dos valores normais. A elevação do tempo de protrombina observada com a administração de altas doses em cães, foi efetivamente controlada através do tratamento com uma única dose de vitamina K. Não foi observada hemorragia em cães ou ratos. (MORRISON, 1970). Mais recentemente avaliou-se o potencial teratogênico do lapachol em ratos Wistar, administrado em altas concentrações no período entre o 8º e 12º dia de gestação. Os resultados demonstraram que as fêmeas em período gestacional não foram afetadas, no entanto a taxa de mortalidade fetal de 99,2%, indicou um intenso efeito abortivo do lapachol em ratos. (GUERRA, 1999).

A presença de taninos e saponinas é freqüentemente observada em plantas medicinais. E eles são os principais constituintes do Extrato hidroalcoólico de *Tabebuia avellanedae*, segundo a análise qualitativa.

A atividades antimicrobianas dos taninos são bastante documentadas. O crescimento de muitos fungos, bactérias e vírus são inibidos por taninos. A presença de taninos em frutas favorece um mecanismo de defesa natural contra infecções microbianas.

Relata-se também exercer outros efeitos fisiológicos, como: aceleração da coagulação sanguínea, redução da pressão arterial e modulação da resposta imune. (CHUNG et al. 1998)

Um estudo desenvolvido com uma cultura de células esplênicas de animais imunizados com Ovalbumina (OVA) e tratados com saponinas, observou através da estimulação antigênica secundária *in vitro*, aumentos nos níveis de IL-2 e IFN-gama. (ESTRADA et al., 2000). Utilizando-se de um composto herbal de saponinas (HOT), foi avaliado em um estudo, que este composto aumentou a resistência de camundongos à infecção por *Pseudomonas aeruginosa*. O tratamento com HOT produziu um aumento na expressão de IL-3, GM-CSF e IFN-gama em células do baço, medula e fígado. Os aumentos de IFN-gama observados em camundongos tratados com o composto de saponinas (HOT), pode contribuir para efeitos protetores contra infecções bacterianas, através de ativação de macrófagos. (KANEKO et al., 1999).

Modelo experimental de infecção com *Listeria monocytogenes*:

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

Listeria monocytogenes é um bacilo gram-positivo, pertencente a um grupo de microorganismos de ação intracitoplasmática. O processo envolvido na resistência a esta bactéria é caracterizado inicialmente pela imunidade inata do hospedeiro, seguida por uma resposta imune específica, garantindo a total erradicação do patógeno.

Ao entrar em contato com o organismo, bactéria deixa a corrente sanguínea, alojando-se em células fagocitárias, preferencialmente células hepáticas e macrófagos, iniciando o processo infeccioso, que envolve além de fagócitos, células T e citocinas (KAUFMANN, 1993). Após ser fagocitada, *Listeria monocytogenes* produz uma toxina denominada Listeriolisina O (LLO) que lisa o fagolisossomo permitindo sua saída para o citoplasma, onde ocorre sua proliferação e conseqüente migração para a célula adjacente,

dando início a sua disseminação (NISHIBORI et al., 1996; SOUTHWICK & PURICH, 1996). Assim sendo, a migração de células fagocitárias como macrófagos, granulócitos e células natural killer (NK) para o local de replicação da bactéria, é um componente essencial para a sobrevivência do animal durante a fase inicial da infecção (NORTH, 1970; BENNET & BAKER, 1977; LEPAY et al., 1985; ROSEN, GORDON, NORTH, 1989).

Estas células fagocitárias, são originárias das células primitivas pluripotenciais da medula óssea, denominadas células formadoras de colônias (CFCs), as quais podem dar origem a qualquer células sanguínea dependendo do estímulo recebido (METCALF, 1984; QUEIROZ, 1988). O crescimento e a diferenciação dessas células são modulados pelos fatores estimuladores de colônias (CSFs) (METCALF, 1984, 1989). Elevados níveis desses fatores aparecem no soro e tecidos dos animais infectados no período inicial da infecção com *Listeria monocytogenes* (WING, 1984, 1985, 1987; YOUNG & CHEERS, 1986).

Os macrófagos são as principais células atuantes nessa fase e ao serem infectados, liberam algumas citocinas pró-inflamatórias: IL-1, IL-6, TNF-alfa e IL-12 que estimulam as células NK a secretarem IFN-gama (LIU & CHEERS, 1993; MIELKE, EHLERS, HAHN, 1993; TRIP, WOLF, UNANUE, 1993; KOPF et al., 1994; DALRYMPLE et al., 1995; HUNTER, CHIZZONITE, REMINGTON, 1995). Altas concentrações de IFN-gama promovem a ativação do macrófago, conduzindo a uma maior expressão das moléculas da classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC classe II). Este complexo apresenta a bactéria a um segundo sistema de defesa do organismo, que atuará de maneira específica na erradicação da infecção, através da ação de células T CD4⁺CD8⁺ alfa/beta e CD4⁺CD8⁻ gama/delta (MOMBAERTS et al., 1993). Diante da importância das células fagocíticas na fase inicial da infecção pela *Listeria monocytogenes*, a avaliação do crescimento e diferenciação destas células, através da técnica de cultura clonal de precursores hematopoéticos da medula óssea para granulócitos e macrófagos (CFU-GM), é um indicador fiel do grau de comprometimento do organismo dos animais infectados pelo microorganismo em questão.

Diante do exposto, avaliamos os efeitos do EHTA sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea e baço para a série granulócitos e macrófagos (CFU-GM), no modelo experimental de infecção por *Listeria monocytogenes* em camundongos BALB/c. Também foram avaliados a produção de

fatores estimuladores de colônias de células hematopoéticas , as alterações no peso do baço e a resistência dos animais à infecção, quando tratados com o EHTA.



2. OBJETIVOS

Avaliando as repercussões da infecção por *Listeria monocytogenes* sobre o sistema hematopoético, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos protetores na administração do EHTA em camundongos infectados com esta bactéria, através dos seguintes parâmetros:

- Número de precursores hematopoéticos da medula e baço.
- Produção de fatores estimuladores de colônias de células hematopoéticas.
- Resistência do animal a uma dose letal de *Listeria monocytogenes*.
- Peso do baço.



3. MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais:

Para realização dos experimentos foram utilizados camundongos BALB/c machos, com idade entre 8 e 10 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP. Após obtenção, os animais foram divididos (6 animais por grupo) e submetidos ao tratamento de acordo com o protocolo experimental, a saber:

- a) animais controle, sem tratamento;
- b) animais tratados com extrato de *Tabebuia avellanedae* (EHTA) (125, 250, 500 E 1000 mg/kg) durante 7 dias;
- c) animais infectados com *Listeria monocytogenes*;
- d) animais tratados com EHTA e infectados;

As doses de *Listeria monocytogenes* utilizadas neste trabalho, foram estabelecidas baseadas em estudos preliminares realizados em nosso laboratório (BINCOLLETO & QUEIROZ, 1996).

2. *Listeria monocytogenes*:

A bactéria *Listeria monocytogenes* utilizada para infectar os animais, é um cocobacilo gram-positivo, anaeróbio facultativo, móvel por flagelos peritríquios a temperatura ambiente, facilmente cultivável em ágar-sangue.

Esta cepa foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica (Hospital das Clínicas - UNICAMP). 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 *Rhodococcus equi* - negativo

Para a manutenção da patogenicidade desta bactéria, a mesma foi periodicamente repassada por vinte e cinco vezes em camundongos, através da inoculação intraperitoneal da *Listeria monocytogenes* em solução salina 0,9%. Quarenta e oito horas após a inoculação deste microrganismo, os baços dos camundongos foram isolados em ambiente estéril, macerados e mantidos em BHI por 24-48 horas. Para obtenção das colônias, a *Listeria monocytogenes* foi plaqueada em ágar-sangue e incubada por 24 horas em estufa a 37°C. Após o isolamento das colônias de bactérias, estas foram diluídas até atingir a concentração apropriada para o uso.

No momento da infecção dos 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 avaliação dos parâmetros propostos após a infecção.

Dessa forma, a bactéria foi incubada em meio de cultura BHI por 24-48 horas a 37°C. As colônias obtidas das 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 o estudo dos parâmetros imunológicos e hematológicos foi utilizada a dose subletal de 4×10^4 bactérias/animal. Para a avaliação da sobrevivência dos animais foi necessário utilizar uma concentração letal de 4×10^6 bactérias/animal, a qual foi inoculada intraperitonealmente.

A resposta hematopoética foi avaliada 24, 48 e 72 horas após a infecção.

3. Tratamento:

3.1. *Tabebuia avellanedae*:

O extrato hidroalcoólico de *Tabebuia avellanedae* foi gentilmente cedido por “Lab. Fármaco Botânico Prof. Walter Radamés Accorsi LTDA”

Para o tratamento dos animais, o EHTA, que possui 15% de teor alcoólico e 27% de princípio ativo (P.A) , foi diluído em água destilada onde se obteve o extrato nas concentrações de 125, 250, 500 e 1000mg/Kg. As concentrações foram obtidas através dos seguintes parâmetros:

– Peso médio dos camundongos (25 g) ; quantidade do extrato administrada por gavagem ao dia (0,2 ml) ; e princípio ativo (P.A) do extrato (27%).

$$250 \text{ mg} \quad \text{_____} \quad 1000\text{g}$$

$$\times \quad \text{_____} \quad 25 \text{ g}$$

A concentração de 250 mg/ Kg em um camundongo é de 0,00625 g do P.A do extrato.

Em 100 ml há 27 g ; em 0,1 ml há 0,0027 g de P.A.

$$0,1 \text{ ml} \quad \text{_____} \quad 27 \text{ g}$$

$$\times \quad \text{_____} \quad 0,00625 \text{ g do P.A}$$

O volume de EHTA que contém 0,00625 g do P.A é de 0,0231 ml do extrato em um animal

$$0,2 - 0,0231 = 0,177 \text{ ml (água destilada)}.$$

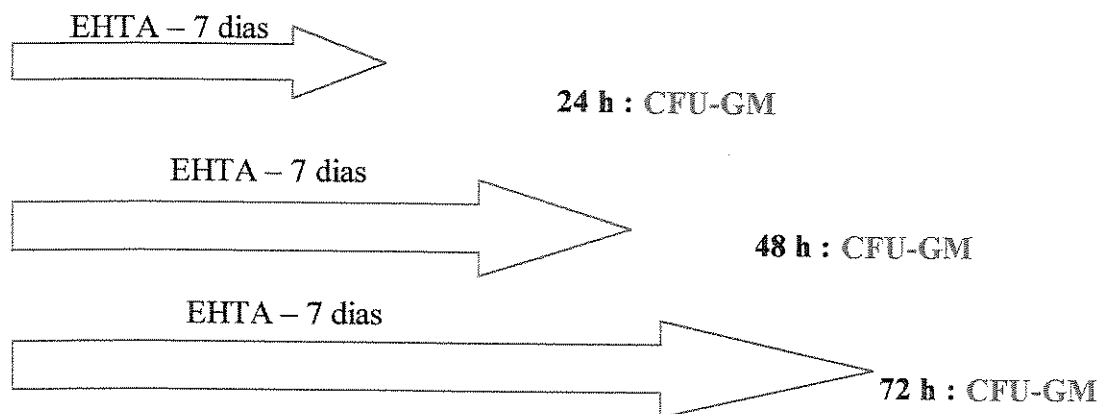
Em 0,2 ml do extrato administrado por gavagem na concentração de 250 mg/Kg , há 0,0231 ml de EHTA e 0,177 ml de água destilada.

As demais concentrações foram obtidas através dos mesmos parâmetros.

3.2. Protocolo de tratamento

3.2.1. Animais Tratados

Os animais foram tratados com EHTA nas doses de 125, 250, 500 e 1000 mg/Kg/dia, durante 7 dias. Foi realizada a cultura clonal de precursores hematopoéticos da medula óssea e baço, 24, 48 e 72 horas após a finalização do tratamento.



3.2.2. Animais Tratados e Infectados

Os animais foram tratados com EHTA nas doses de 125, 250, 500 e 1000 mg/Kg/dia, durante 7 dias. Ao final do tratamento os animais foram infectados com *Listeria monocytogenes* e sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção, para a realização da cultura clonal de precursores hematopoéticos da medula óssea e baço

3.3. Obtenção do Extrato

- 1- Pau D'Árco pó ----- 1000 g
- 2- Água/álcool ----- esgotar a planta

Procedimento:

- 1- Umedece-se o pó com água fervente;
- 2- Deixa-se macerar por 2 horas;
- 3- Passa-se por tamis nº 10 e acomoda-se o pó no interior do percolador;

- 4- Após acrescenta-se mais 3000 ml de água fervente;
- 5- Deixa-se em repouso por mais 2 horas;
- 6- Após percola-se com água fervente até esgotamento completo do pó, aproximadamente 9000 ml;
- 7- Concentra-se o líquido extraído em banho maria;
- 8- Coloca-se álcool, 15%, e mantém-se em repouso por 24 horas em recipiente fechado;
- 9- Após filtra-se e envasa-se.

4. Cultura clonal de precursores hematopoéticos da 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 a superposição de colônias na placa de petri e permitir a identificação de cada colônia. Também é importante que o fator estimulador de colônias (SCM) seja utilizado em condições supermáximas. Além disso, a escolha do soro bovino fetal deve ser feita cuidadosamente devido a variação na atividade dos vários lotes e marcas.

4.1. Medula óssea:

Após sacrificar o animal por deslocamento cervical, realizou-se assepsia da 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 RPMI-1640 (Cultilab).

O número de células na suspensão foi contado em câmara hematocitométrica após diluição (1:10) das células em eosina 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 a obtenção de uma suspensão celular.

O número de células na suspensão foi contado em câmara hematocitométrica após diluição (1:20) das células em azul de tripan 1% e a concentração ajustada para 2×10^5 células/mL.

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

Preparou-se o meio mais ágar (Bacto-ágar-Difco) o qual consistia de:

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

A seguir, adicionou-se ao meio descrito acima, o volume apropriado de células (1×10^5 células/mL para a medula óssea e 2×10^5 células/mL para o baço) e distribuiu-se volumes de 2 mL em cada placa de petri (35 mm), já contendo 100 μ L do estímulo apropriado (SCM). 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 dissecção em aumento de 40x.

Para estudo morfológico, as colônias foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (v/v) e coradas com Luxol Fast Blue/Leishman. A figura 1 mostra o aspecto microscópico de uma colônia de células de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongo normal, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM).

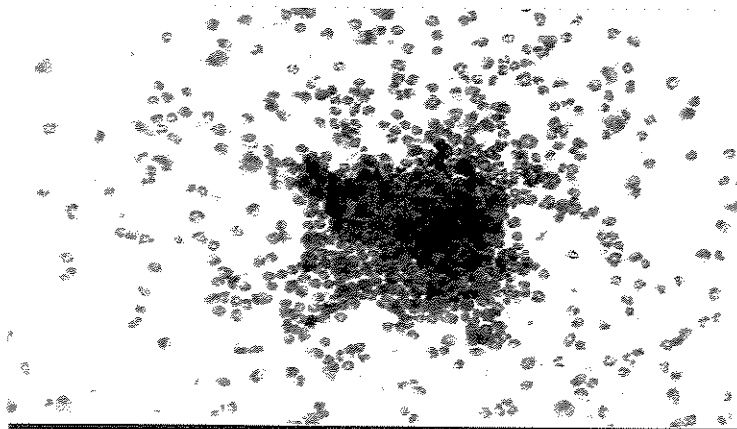


Figura 1. Colônia de células precursoras hematopoéticas da medula óssea de um camundongo normal, em um aumento de 250x.

5. Preparação do meio condicionado de células esplênicas (SCM):

Baços de 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 (Sigma) contendo 10% de soro bovino fetal.

Adicionou-se ao meio 5×10^{-5} moles/L de 2-mercaptoetanol e 1,65 µg/mL de “pokeweed mitogen”.

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 membranas de 0,45 µm (Millipore).

A atividade funcional do CSF foi determinada através dos estímulos produzidos sobre o crescimento clonal de células progenitoras hematopoéticas em meio semi-sólido.

A titulação deste lote de SCM demonstrou que uma diluição de até 1:4 forneceu resultados que estão dentro dos níveis de resposta supermáxima. Os resultados em duplicata da titulação realizada em cultura de 7 dias estão apresentados na tabela abaixo.

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

DILUIÇÃO SCM	CFU-C x 10 ² *
1:1	109,2 ± 4,2
1:2	102 ± 3,5
1:4	105,6 ± 5,1
1:8	75,6 ± 4,2
1:16	57,6 ± 4,0
1:32	34,8 ± 3,0
1:64	7,2 ± 1,2
1:168	0

* Número total de células por fêmur

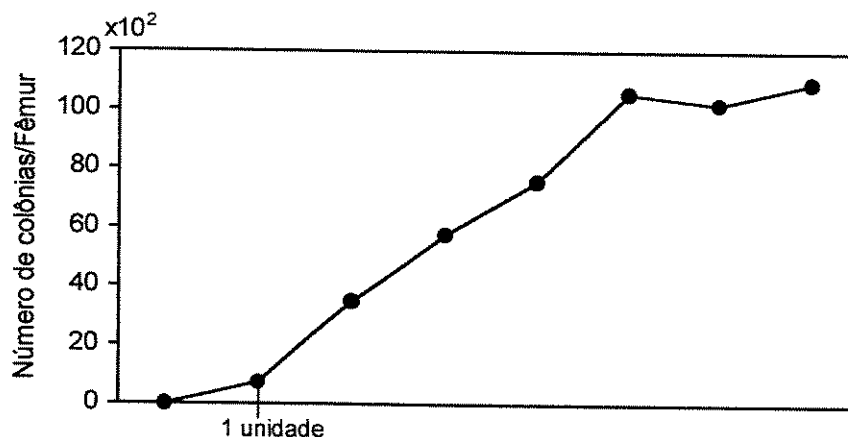
Resultados obtidos em duplicata por diluição

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

O sangue dos animais dos 8 grupos experimentais, foi obtido através de punção do plexo ocular, sendo separado em “pools”, centrifugado para obtenção do soro e armazenado a -20°C. A presença de fatores estimuladores de colônias no soro dos animais em questão, foi determinada pela sua capacidade promotora do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de animais normais.

A atividade estimuladora de colônias foi expressa em unidades por mL e determinada a partir da curva de titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) ilustrada abaixo. De acordo com VAN DEN ENGH & BOL (1975), a menor

concentração capaz de estimular o crescimento de clones é considerada como 1 unidade de CSF/mL.



7. Realização da curva de sobrevida:

Para o estudo dos efeitos do tratamento com o EHTA na sobrevida dos animais infectados com *Listeria monocytogenes*, os animais foram divididos em dois grupos experimentais: infectados; tratados com EHTA/infectados; (n=20/grupo). Todos os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* (4×10^6 bactérias/animal) 3 horas após a última dose de EHTA. A seguir, os animais foram observados por um período de 30 dias.

8. Peso do baço e dos animais submetidos aos referidos tratamentos:

8.1. Peso do Baço:

Após remoção do baço (como descrito no item 4.2), seu peso foi mensurado em gramas para posterior análise.

9. Análise estatística:

A Análise de Variância foi utilizada para avaliar as variáveis CFU-C/fêmur; CFU-C/baço; fatores estimuladores de colônias e pesos do baço . O teste de Tukey foi utilizado quando a análise de variância detectava diferenças significativas entre os grupos.

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

Em todos os grupos estudados, considerou-se estatisticamente significativo aquele cujos valores de P foram $<0,05$.



4. RESULTADOS

1. Efeitos do EHTA sobre o número de precursores hematopoéticos da medula óssea e do baço de camundongos (CFU-C):

1.1. Medula óssea:

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados nas figuras 1 e 3; tabelas 1 e 3.

A infecção com *Listeria monocytogenes* produziu uma redução significativa no número de CFU-C em relação ao controle, nas 48 e 72 hs. (n=6, $P < 0,05$ – ANOVA, Tukey).

No entanto, quando foi instituído o tratamento com EHTA prévio à infecção, observamos uma recuperação dos níveis de CFU-C, nesses mesmos tempos, com as doses de 125, 250 e 500 mg/Kg/dia, indicando que este extrato foi capaz de reverter a mielossupressão induzida pela infecção. (n=6, $P < 0,05$ – ANOVA, Tukey).

O tratamento de animais normais com o EHTA não produziu alterações na resposta hematopoética, quando comparado ao controle. (n=6, $P > 0,05$ – ANOVA, Tukey).

1.2. Baço:

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados nas figuras 2 e 4; tabelas 2 e 4.

A infecção com *Listeria monocytogenes* produziu uma acentuada hematopoese extramedular, nas 48 e 72 hs após a infecção, através do aumento do número de CFU-C em relação ao controle (n=6, $P < 0,05$ – ANOVA, Tukey).

No entanto, o tratamento prévio à infecção com o EHTA, pode prevenir o desenvolvimento da hematopoese extramedular, nesses mesmos tempos, com as doses de 125, 250 e 500 mg/Kg/dia. (n=6, $P < 0,05$ – ANOVA, Tukey).

O tratamento de animais normais com o EHTA não produziu alterações na resposta hematopoética, quando comparado ao controle. (n=6, $P > 0,05$ – ANOVA, Tukey).

2. Efeitos do EHTA sobre a produção de fatores estimuladores de colônias:

A produção de fatores estimuladores de colônias foi expressa em unidade por mL, conforme descrito no item 6 do material e métodos.

Na vigência da infecção por *Listeria* observou-se que o soro do animal induziu um aumento significativo na formação de colônias em relação ao controle normal, nas 24, 48 e 72hs após a infecção. (n=6, $P<0,05$ – ANOVA, Tukey).

Também observamos que o tratamento prévio com EHTA potencializou a atividade estimuladora de colônias (n=6, $P<0,05$ – ANOVA, Tukey).

Na dose de 125mg, houve indução na formação do número de precursores em relação ao controle normal e em relação ao controle infectado 72h.

Na dose de 250mg também houve a indução na formação de precursores em relação ao controle e ao controle infectado 24, 48 e 72h após a infecção.

Na dose de 500mg o tratamento induziu a formação de precursores em relação ao controle normal em todos os tempos, e em 48 e 72h após a infecção essa dose induziu a formação de colônias comparado ao controle infectado.

A exceção foi com a dose de 1000mg/Kg/dia, que não foi capaz de induzir a formação de precursores hematopoéticos.

Avaliamos que o aumento na formação de colônias, foi possível somente na vigência de infecção. O soro dos animais tratados com EHTA e não infectados, portanto, não foi capaz de induzir o aumento na formação de precursores hematopoéticos. (n=6, $P>0,05$ – ANOVA, Tukey).

3. Efeitos do EHTA sobre o peso do baço dos animais:

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados nas figuras 6 e 7; tabelas 6 e 7.

Avaliando o peso do baço após a infecção, observamos que o peso desse órgão não se altera significativamente 24hs após a infecção. No entanto em 48 e 72hs esse aumento foi observado no peso desse órgão. (n=6, $P<0,05$ - ANOVA, Tukey).

O peso do baço foi normalizado em animais tratados com EHTA e infectados com *Listeria* nas doses de 250 e 500 mg do extrato em todos os tempos após a infecção. A dose de 125mg/Kg/dia mostrou atividade apenas em relação ao controle infectado em 24 e 48h. (n=6, $P < 0,05$ - ANOVA, Tukey).

O tratamento com EHTA em animais normais não produziu alterações no peso desse órgão, comportando-se dessa maneira, igualmente ao controle. (n=6, $P > 0,05$ - ANOVA, Tukey).

4. Efeitos do EHTA na sobrevida de animais infectados com uma dose letal de *Listeria monocytogenes*:

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na figura 8.

Observamos que a inoculação de 4×10^6 bactérias/animal nos animais controle, promoveu uma mortalidade de 100% até o 8º dia de infecção.

No entanto o tratamento prévio à infecção com a dose de 125 mg/Kg/dia, promoveu um aumento na sobrevida desses animais, onde 15% sobreviveu até o 30º dia de avaliação. Com 250mg esse aumento foi de 30% e na dose de 500 mg 30% dos animais sobreviveu até o 30º dia de avaliação. Não houve sobrevida de animais tratados com a dose de 1000mg. Esses dados no conjunto corroboram achados prévios de nosso grupo de pesquisa de que restaurações das alterações hematopoéticas no compartimento de granulócitos-macrófagos está associada à maior efetividade da terapêutica.

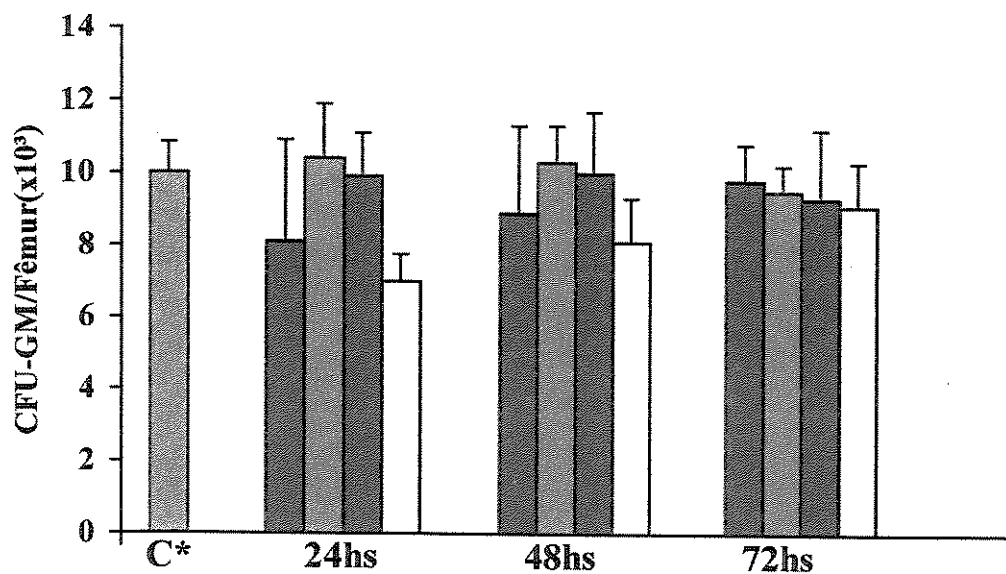
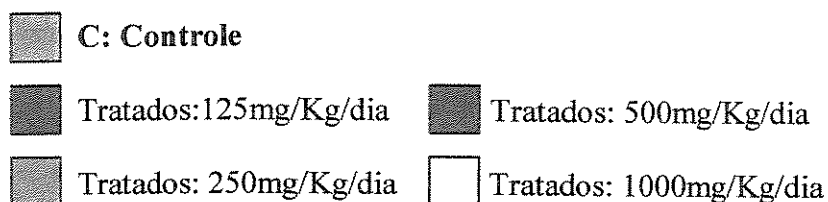


Figura 1- Estudo dos efeitos do Extrato de *Tabebuia avellanedae* sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c, tratados com as doses : 125, 250, 500 e 1000 mg/kg/dia, por 7 dias e sacrificados 24,48 e 72 horas após a infecção. n=6 , P>0,05 ANOVA-Tukey.



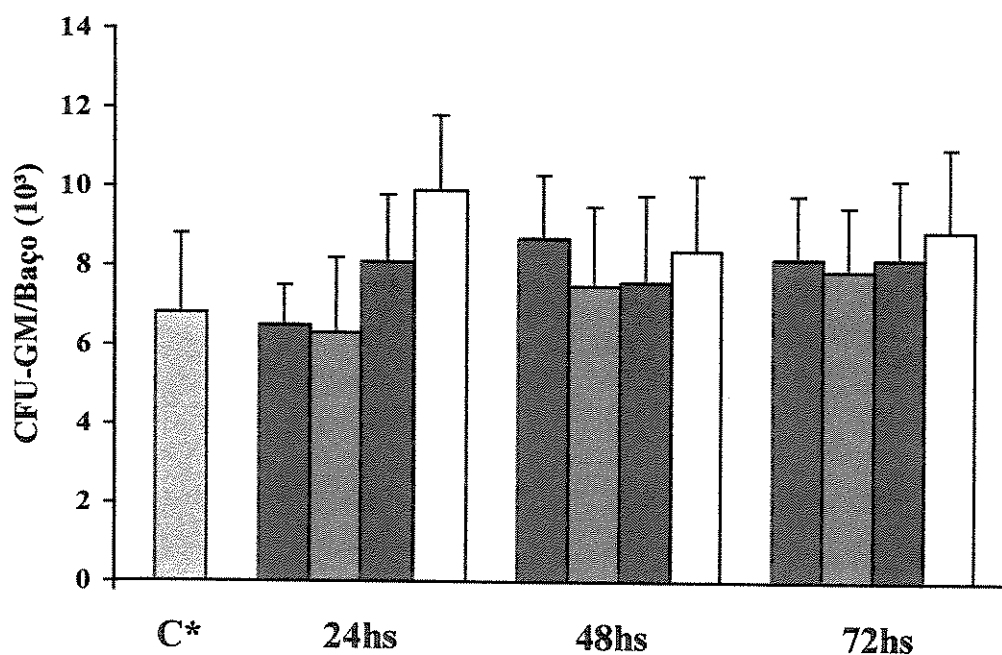
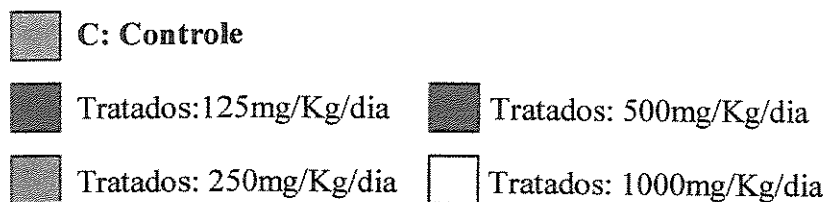


Figura 2- Estudo dos efeitos do EHTA sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de camundongos BALB/c, tratados com as doses de 125, 250, 500 e 1000 mg/Kg/dia, por 7 dias consecutivos. Os camundongos foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após o tratamento. n=6, P> 0,05.



* Significativo em relação ao C ¢ Significativo em relação a I-24h
 # Significativo em relação a I-48h £ Significativo em relação a I-72h

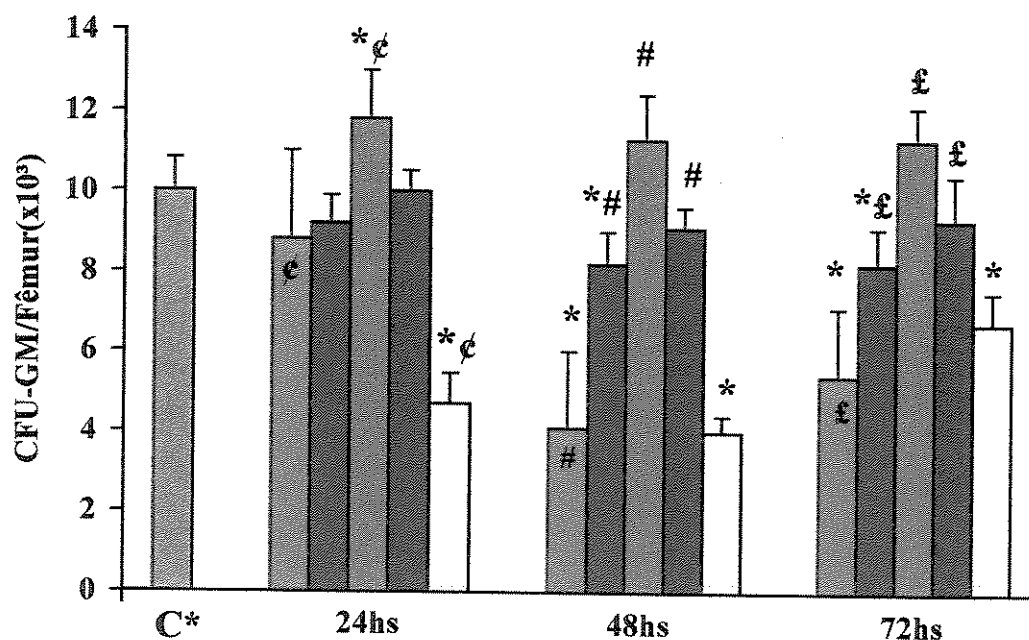
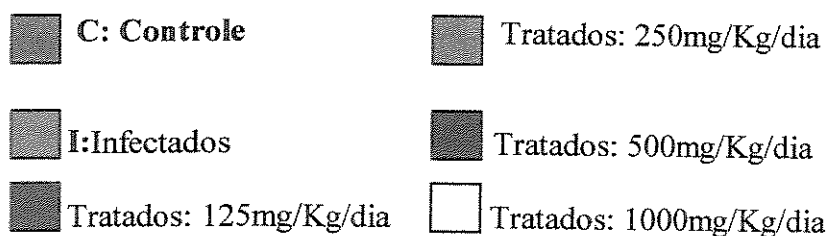


Figura 3- Estudo dos efeitos do EHTA sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c, tratados com as doses de 125,250, 500 e 1000 mg/kg/dia, por 7 dias e infectados com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes*(4×10^4 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção n=6 , P<0,05 ANOVA-Tukey



* Significativo em relação ao C ‡ Significativo em relação a I-24h
 # Significativo em relação a I-48h £ Significativo em relação a I-72h

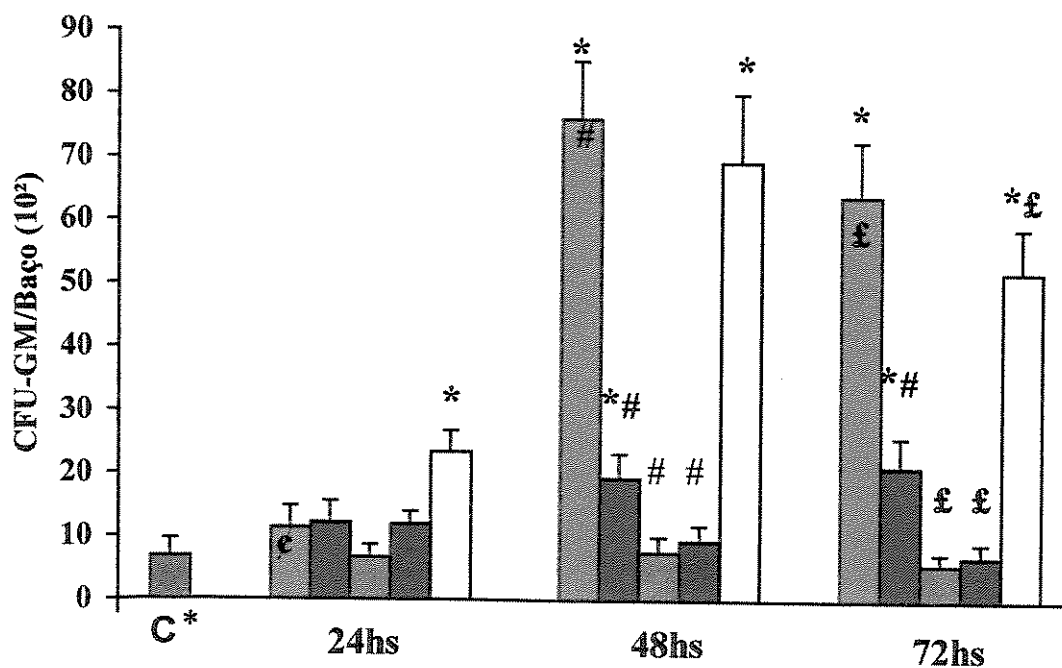


Figura 4- Estudo dos efeitos do EHTA sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de camundongos BALB/c, tratados com as doses: 125, 250, 500 e 1000 mg/Kg/dia, por 7 dias e infectados com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção n=6, P<0,05 ANOVA-Tukey.

■ C: Controle
 ■ I: Infectados
 ■ Tratados: 125mg/Kg/dia
 ■ Tratados: 250mg/Kg/dia
 ■ Tratados: 500mg/Kg/dia
 ■ Tratados: 1000mg/Kg/dia

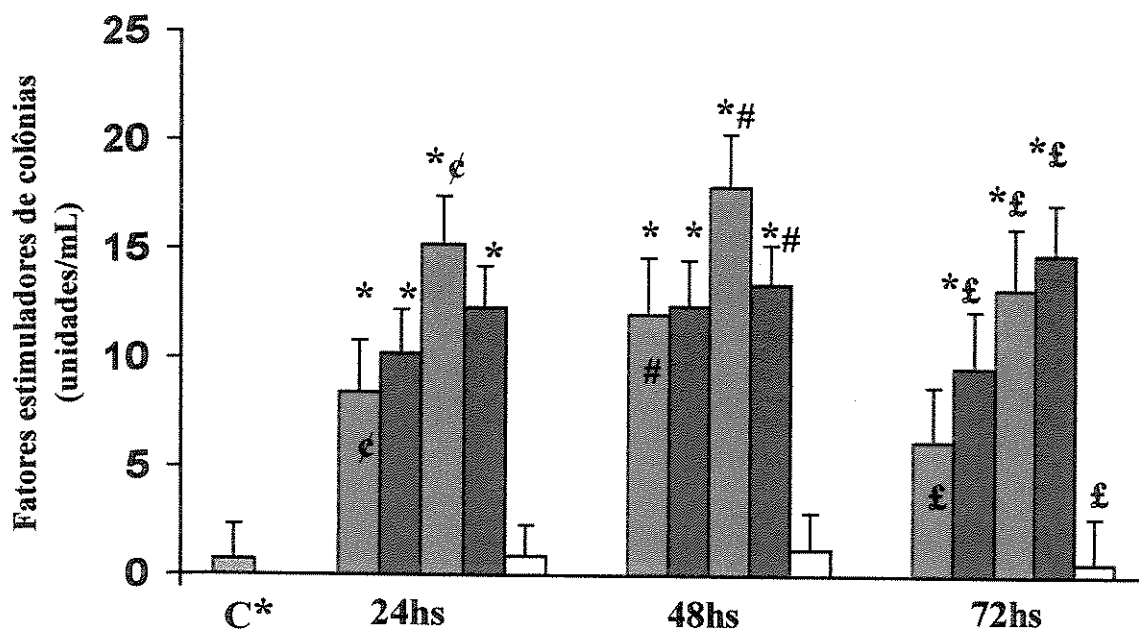
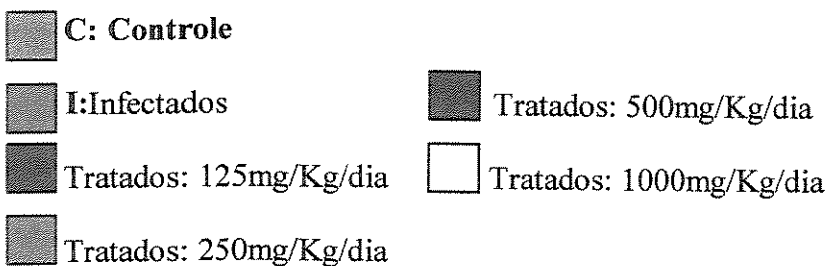


Figura 5- Estudo dos efeitos do EHTA sobre a produção de fatores estimuladores de colônias em camundongos BALB/c tratados com as doses: 125, 250, 500 e 1000 mg/Kg/dia por 7 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal – i.p). O soro foi coletado 24, 48 e 72 horas após a infecção. n=6, P<0,05 ANOVA-Tukey.



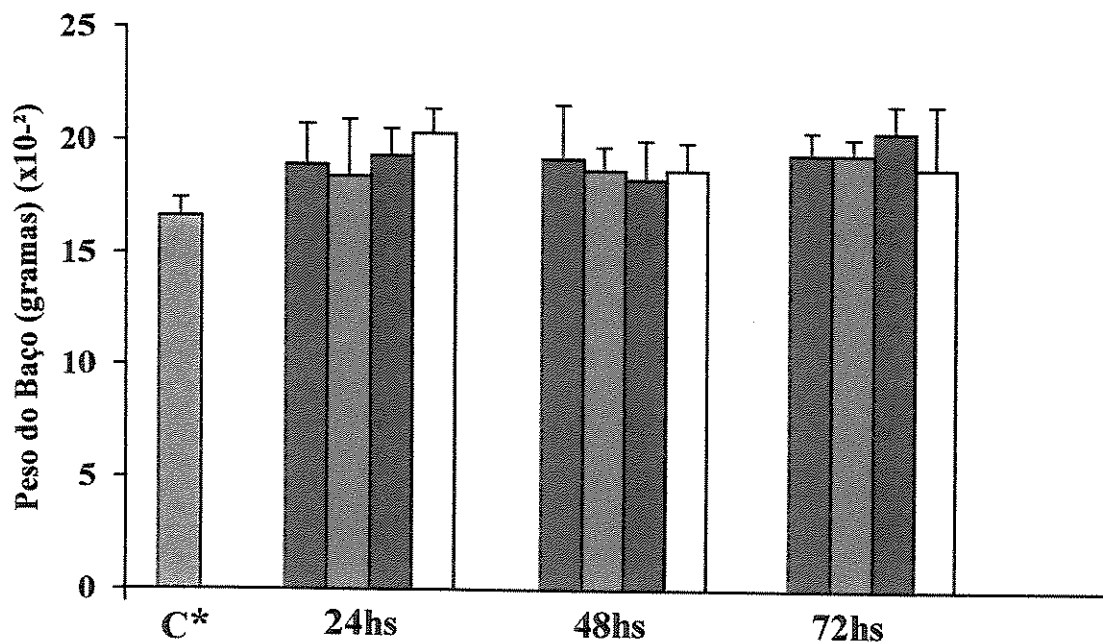
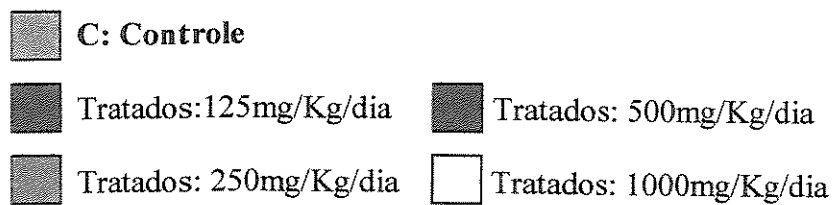


Figura 6- Estudo dos efeitos do Extrato de *Tabebuia avellanedae* sobre o peso do baço de camundongos BALB/c tratados com as doses: 125, 250, 500 e 1000 mg/Kg/dia por 7 dias e sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. n=6 , P>0,05 ANOVA-Tukey.



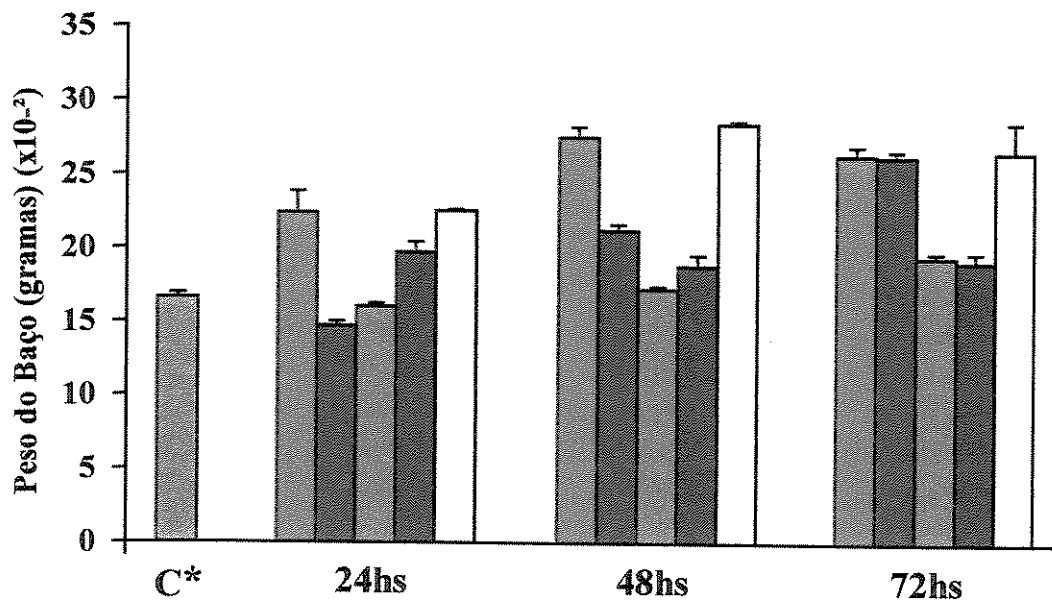
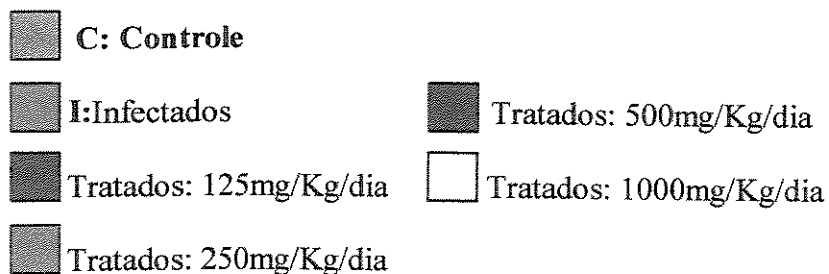


Figura 7- Estudo dos efeitos do Extrato de *Tabebuia avellanedae* sobre o peso do baço de camundongos BALB/c tratados com as doses: 125, 250, 500 e 1000 mg/kg/dia por 7 dias e infectados com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal -i.p.) e sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. n=6, $P > 0,05$ ANOVA-Tukey.



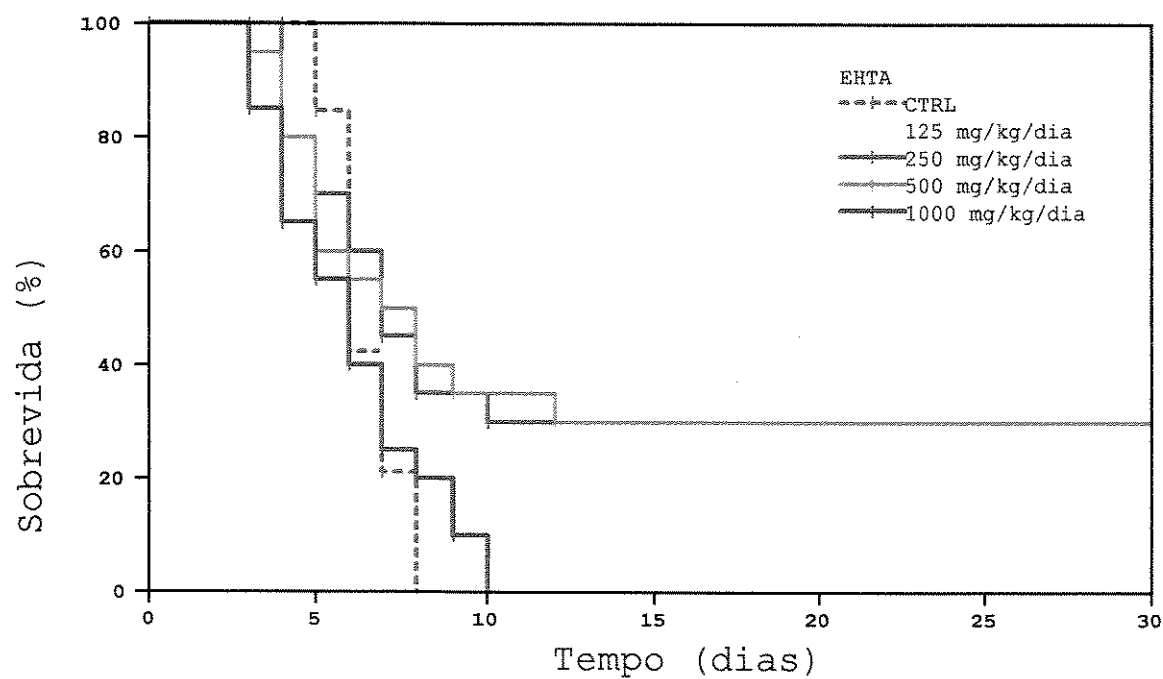


Figura 8. Avaliação dos efeitos do EHTA nas concentrações de 125, 250, 500 e 1000mg/Kg/dia, durante 7 dias, no tratamento prévio à infecção por *Listeria monocytogenes* (4×10^6 bactérias/animal). (n=20, Curva de Kaplan-Maier, Log-Rank; $P < 0,01$ em relação ao grupo infectado).



5. DISCUSSÃO

Poucos são os estudos desenvolvidos com o extrato de *Tabebuia avellanedae*. Um trabalho onde ratos albinos foram inoculados com carcinoma de Yoshida e tratados com uma dose diária desse extrato, por via oral, durante 9 dias, demonstrou um aumento de 85% na sobrevivência desses animais. (SANTANA & GONÇALVES DE LIMA, 1968).

A análise da cromatografia de camada delgada do Extrato hidroalcoólico de *Tabebuia avellanedae* (EHTA) demonstrou a presença de taninos e saponinas. Traços de lapachol foram observados a partir da análise espectrofotométrica.

Estes compostos são frequentemente desenvolvidos em trabalhos científicos e apresentam repercussões significativas sobre a resposta imunológica de organismos e culturas de células comprometidas com tumores ou bactérias. (VUCK-PAVLOVIC et al., 1990; FELDMAN, 1999; KANEKO et al., 1999; ESTRADA et al., 2000)

Um estudo *in vitro* desenvolvido com uma cultura de monócitos e linfócitos, foi estimulada com taninos. Uma outra cultura não estimulada, foi usada como controle. As duas culturas foram incubadas com indutores de IL-1 (Con A) e LPS de *E. coli*. Os resultados sugerem que a estimulação com taninos aumentou a secreção de IL-1-beta mensurada no sobrenadante da cultura de monócitos e linfócitos. O estudo da dose resposta também sugere que a extensão da liberação de IL-1-alfa é dependente da dose de taninos administrada e que aumentos na produção de IL-1-beta por monócitos precedem o aumento na proliferação de linfócitos T. (VUK-PAVLOVIC et al., 1990) Num outro trabalho onde células mononucleares humanas do sangue periférico foram expostas a taninos, observou-se um aumento na secreção de IL-1 e TNF-alfa. (FELDMAN et al., 1999)

Outro estudo desenvolvido com uma cultura de células esplênicas de animais imunizados com Ovalbumina (OVA) e tratados com saponinas, observou através da estimulação antigênica secundária *in vitro*, aumentos nos níveis de IL-2 e IFN-gama. (ESTRADA et al., 2000). Utilizando-se de um composto herbal de saponinas (HOT), foi avaliado em um estudo, que este composto aumentou a resistência de camundongos à infecção por *Pseudomonas aeruginosa*. O tratamento com HOT produziu um aumento na expressão de IL-3, GM-CSF e IFN-gama em células do baço, medula e fígado. Os aumentos de IFN-gama observados em camundongos tratados com o composto de

saponinas (HOT), pode contribuir para efeitos protetores contra infecções bacterianas, através de ativação de macrófagos. (KANEKO et al. , 1999).

A uma ausência de estudos *in vivo* na literatura científica para os efeitos do EHTA sobre a resposta imunológica. Nesse sentido , este trabalho demonstra resultados importantes do EHTA sobre a resposta hematopoética em animais infectados com *Listeria monocytogenes*.

Listeria monocytogenes tem sido extensivamente utilizada como modelo experimental bacteriano intracelular no estudo da resposta imune. (MILON, 1997; NORTH, 1997). Estudos revelam que linfócitosT e a produção de citocinas, possuem um papel fundamental na determinação da evolução da resposta inata do hospedeiro contra a infecção bacteriana. (DAUGELAT & KAUFMANN, 1996; ROMAGNANI, 1996). Entretanto, antes da resposta imune específica, a intensidade da resposta inflamatória produzida por macrófagos e leucócitos polimorfonucleares ao local da infecção é de extrema importância para a sobrevivência do hospedeiro na fase inicial da infecção. (CZUPRYNSKI et al., 1984; RENNICK et al., 1987; CZUPRINSKY et al, 1997; MOCCI et al., 1997). Os polimorfonucleares, os monócitos teciduais e as células NK atuam no local da infecção através de fatores liberados pelos próprios fagócitos infectados como IFN-gama, il-1, IL-6, IL-12 e TNF-alfa, formando o foco infeccioso (ROGERS et al, 1992, 1994 ; LIU & CHEERS, 1993 ; MIELKE et al., 1993 ; TRIPP et al., 1993 ; KOPF et al., 1994 ; DALRYMPLE et al., 1995 ; HUNTER, 1997). Dessa forma a migração das células fagocíticas originárias da medula óssea, ao local da replicação da bactéria , é um componente essencial à resposta primária da infecção por *Listeria monocytogenes*. (NORTH, 1970 ; BENNET & BAKER, 1977 ; LEPAY et al.,1985 ; ROSEN et al., 1989)

O envolvimento das células maduras da série monocítica e granulocítica, é portanto, fundamental para resposta inicial do animal à *Listeria monocytogenes*. A medula óssea, dessa maneira, serve de sítio primário na geração e maturação de precursores hematopoéticos. O crescimento e diferenciação das células formadoras de colônias (CFU-GM) é acelerado em resposta à *Listeria*, ocorrendo também um aumento dos níveis de fatores estimuladores do crescimento celular no soro destes animais.

Em nosso trabalho, ao estudarmos os efeitos do EHTA sobre o crescimento e diferenciação dessas células formadoras de colônias, observamos que esse extrato não possui ação sobre os precursores da medula óssea de animais não infectados. Porém quando os camundongos foram tratados com EHTA e infectados com *Listeria*, os mesmos apresentaram um aumento de precursores hematopoéticos de granulócitos-macrófagos (CFU-GM), 48 e 72 horas após a infecção, com as doses de 125, 250 e 500mg/Kg em relação aos animais infectados. A capacidade diminuída na mobilização de células progenitoras da medulla óssea, parece estar relacionada com um alto grau de mortalidade. (GERVAIS et al., 1986; ROSEN et al., 1989;). Essa recuperação do número de precursores da medula óssea parece ser de particular importância para a resistência dos animais à infecção por *Listeria*. (QUADROS, SOUZA-BRITO & QUEIROZ, 1999; MELO, JUSTO & QUEIROZ, 2001)

Os animais infectados não tratados apresentaram um número diminuído de precursores de granulócitos-macrófagos da medula, 48 e 72 horas após a infecção, em relação ao controle normal. Esta diminuição está bem documentada na literatura. (WING et al., 1984, 1985; CHEERS, 1988; DANTAS & QUEIROZ, 1999; QUADROS, SOUZA-BRITO & QUEIROZ, 1999). O efeito parece estar relacionado com o aumento da diferenciação destas células primitivas em células maduras, e com a migração de células primordiais da medula óssea para outros tecidos hematopoéticos secundários como o baço. (NORTH, 1970, LEPAY et al, 1985 ; ROSEN et al., 1989 ; ROGERS et al., 1994; QUESNIAUX et al, 1996; MURRAY et al., 1998; DEGUCHI et al., 1999). Dessa maneira, observamos que na vigência da infecção por *Listeria*, houve a ocorrência de importante proliferação do número de precursores hematopoéticos do baço, em 48 e 72 horas após a infecção.

Igualmente observamos, que o tratamento com EHTA em animais não infectados, assim como na medula óssea, também não produziu alterações sobre o número de precursores hematopoéticos do baço. No entanto, quando os animais foram tratados e infectados com *Listeria monocytogenes*, observou-se uma prevenção da hematopoese extramedular em 48 e 72 horas após a infecção.

Os fatores estimuladores de colônias tem um papel importante no crescimento e diferenciação das células precursoras da medula óssea. (METCALF, 1984 ; 1989). Outro achado importante é que o soro dos grupos tratados com EHTA (125,250,500mg/Kg) e infectados com *Listeria* apresentaram uma maior atividade estimuladora de colônias em relação aos animais infectados não tratados em 24, 48 e 72 horas após a infecção. O soro dos animais controle (não tratados), não apresentou atividade estimuladora de colônias, quando usado como fonte de CSFs frente às células precursoras da medula óssea dos animais normais. Da mesma forma o soro dos animais tratados e não infectados, também não apresentou nenhuma atividade estimuladora de colônias, comportando-se igualmente ao controle não tratado. Avalia-se portanto que o tratamento com EHTA apresenta estimulação sobre os precursores hematopoéticos da medula óssea, somente na vigência de infecção.

É demonstrado freqüentemente que animais infectados pela *Listeria monocytogenes* apresentam níveis aumentados destes fatores durante a infecção. A ausência dos mesmos parece afetar a granulocitopoese e a monocitopoese na listeriose (ZHAN et al. , 1988). O EHTA demonstrou aumentar o número de precursores hemtopoéticos da medula óssea, na vigência de infecção. Estes parâmetros podem estar associados com a sobrevivência do animal.

A resistência foi avaliada através da realização de uma curva de sobrevida . Os camundongos tratados por 7 dias e infectados com uma dose letal de 4×10^6 bactérias / animal, apresentaram um aumento na sobrevida de 15, 30 e 30% , com as doses de 125, 250 e 500 mg/Kg.

O tratamento com a dose de 1000mg/Kg não apresentou resultados importantes sobre a resposta hematopoética de animais infectados. Um estudo com esse extrato na avaliação de sua atividade antitumoral, ressaltou que aumentando a dose do extrato administrada, não verificou-se um aumento significativo da ação antineoplásica. (SANTANA, GOÇALVES DE LIMA et al., 1968)

Os resultados desse trabalho, que apresentam a recuperação da resposta hematopoética em camundongos infectados e tratados com EHTA, sugerem que o tratamento com o EHTA, aumenta a resistência dos animais a *Listeria monocytogenes*, através da modulação da resposta imunológica em sua fase inespecífica.

Esses dados no conjunto corroboram achados prévios de nosso grupo de pesquisa de que restaurações das alterações hematopoéticas no compartimento de granulócitos-macrófagos, está associada à maior efetividade da terapêutica.



6. CONCLUSÕES

O tratamento com o EHTA pode prevenir a hematopoese extramedular em animais infectados com *Listeria monocytogenes* de forma dose-dependente nas doses de 125, 250 e 500mg/Kg/dia.

O tratamento promove aumento da atividade estimuladora do soro em animais tratados com EHTA e infectados com *Listeria*, nas doses de 125, 250 e 500mg/Kg/dia.

O peso do baço foi normalizado em animais tratados com EHTA e infectados com *Listeria* nas doses de 125, 250 e 500 mg/Kg/dia.

Foi promovido pelo tratamento com as três doses citadas aumentos na curvas de sobrevida de 15, 30 e 30% respectivamente.

O tratamento com EHTA promoveu um efeito recuperador no número de precursores hematopoéticos que estavam reduzidos com a listeriose de forma dose-dependente.

Esses dados no conjunto corroboram com achados prévios de nosso grupo de pesquisa, de que restaurações das alterações hematopoéticas no compartimento de granulócitos-macrófagos está associada à maior efetividade da terapêutica instituída.



7. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCORSI, W.R. – In Taheebo. **Zero Planning, Kobe**: 28, 1988.
- ALMEIDA, E.R. ; SILVA FILHO, A.A. ; SANTOS, E.R. ; CORREIA LOPES, C.A. – Antinflammatory action of lapachol. **J. Ethnopharmacology**, **29**: 239-241, 1990
- ANESINI, C. ; PEREZ, C. - Screening of plants use in argentine folk medicine for antimicrobial activites. **J. Ethnopharmacology**, **39**: 119-128, 1993.
- BENNETT, M. & BAKER, E.E. – Morrow – dependent cell function in early stages of infection with list mon. **Cell Immun.**, **33** : 203 – 210, 1997.
- BINCOLETTTO, C. & QUEIROZ, M.L.S. – The effect of lead on the bone marrow stem cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Vet. Human Toxicol.**, **38**: 186-190, 1996.
- BINUTU, O.A. & LAJUBUTU, B.A. – Antimicrobial potenciales of some plant species of the bignoniaceae family. **Afr. J. Med. Med. Sci.**, **23**: 269-273, 1994.
- BISCARDI, A.M. ; VILLAMIL, S.H.F. ; STOPPANI, A.O.M. – **R. Arg. Microbiología**, **26**: 72-86, 1994.
- BORINO, B. – 1000-year-old Inca cancer cure works. **Globe**, **15**: 28-37, 1981.
- BURNETT, A .R. & THOMSON, R .H. Naturally Occurring Quinones. Part X. The Quinonoid Constiuints of *Tabebuia avellaneda*(Bignoniaceae). **J. Chem. Soc. (C)**: 2100-2104, 1967.
- CARVALHO, L.H. ; ROCHA, E.M.M. ; RASLAN, D.S. ; OLIVEIRA, A.B. ; KRETTLI, A.U. – In vitro activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of *Plasmodium Falciparum*. **Brazilian J Med. Bio. Res.**, **21**: 485-487, 1988.
- CHEERS, C.; HAIGH, A.M.; METCALF, D.; STANLEY, E.R.; ET AL – Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separated determinations of macrophages; granulocyte; granulocyte-macrophage and CSFs. **Infect Immun**, **56** : 247 – 25, 1988.
- CHEERS, C.; STANLEY E.R. – Macrophage production duning murine lesteriosis : colony – sti nm lating factor 1 (CSF-1) and CSF-1-binding cells in genetically resistant and susceptible mice. **Infect Immun.** : **56** : 2972 – 2978, 1988

CHUNG K.T. ; WONG T.Y. ; WEI C.I. ; HUANG Y.W ; LIN Y. – Tannins and human health: a review. **Crit. Rev. Food Sci Nutr**; **38 (6)**: 421-64, 1998.

COLLET, D. – Modeling survival data in medical research. In: _____ - **Texts in Statistical Science**. London, Chapman & Hall, 1994. p.1-13.

CROFT, S.L.; HOGG, J.; GUTTERIDGE, W.E.; HUDSON A.T. and RANDALL A.W. – The activity of hidroxynaphthoquinones against *Leishmania donovani*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **30**: 827-832, 1992.

CZUPRYNSKI, C.J.; HENSON, P.M.; CAMPBELL, P.A. – Killing of listenia monocytogenes by inflammatory neutophilis and mononuclear phagocytes from immune and non-immune mice. **J. Leukocyte Biol**, **35** : 193 – 208,1984.

DALRYMPLE, S.A.; LUCIAN, L.A.; SLATTERY, R.; Mc NEIL, T.; AUD. D.M.; FUCHINO, S.; LEE, F.; MURRAY, R. – Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to listeria monocytog. Infection : correlation with inefficient neutrophilia. **Infect. Immun.**, **63** : 2262 – 68, 95.

DANTAS, D.C.M.; QUEIROZ, M.L.S. – Effects of Chlorella vulgaris on bone marrow progenitor cells of mice infected with Listeria monocytogenes. **Int J Immunopharmacol.**,**21** : 499 – 508, 1999.

DAUGELAT, S.; KAUFMANN, S.H.E. – Role of Th1 on Th2 cell in bacterial infections. **Chem Immunol .**,**63** : 66 – 97, 1996.

DEGUCHI, K.; IAGI, H.; INADA, M.; YOSHIZAKI, K.; KISHIMOTO, T.; KOMORI, T. “Excessive extra medullary hemato poiesis in Cbfa 1 – deficient mice with a congenital lock of bone marrow”. **Bichem. Biophys. Res. Commun.**, **255 (2)** : 352 – 359, 1999.

DINNEN, R. ; EBISUZAKI, K. – The search for novel anticancer agents: a differentiation based assay and análise of a folklore product. **Anticancer Research**, **17**: 1027-1034, 1997.

DUKE, J.A. Handbook of medicinal herbs. Ed. **CRC Press Boca Raton, FL(99)**: 470-471, 1985.

ESTRADA, A; KATSELIS, G.S; LAARVELD, B; BARL, B. – Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. **Comp. Immunol Microbiol. Infect Dis.**; 23(1): 27-43, 2000 Jan.

FELDMAN, K.S ; SAHASRABUDHE, K et al. – Immunostimulation by plant polyphenols: a relationship between tumor necrosis factor-alpha production and tannin structure. **Bioorg. Med. Chem. Lett**; 9(7): 985-990, 1999.

FIESER, L.F. & RICHARDSON A.P. - Naphthoquinone antimalarials II. Correlations of structure and activity against *p. lophurae* in ducks. **J. Am. Chem. Soc.**, 70: 3156-3165, 1948.

GERVAIS, A.; MORRIS-HOOKE, A.; TRAN, T.A.; SHAMENE, E. – Analysis of macrophage bacterial function in genetically resistant and susceptible mice using the temperature-sensitive mutant of *Listeria monocytogenes*. **Infect Immun**, 54 : 315-321, 1986.

GONÇALVES DE LIMA, O. ; D'ALBUQUERQUE, I.L. ; MACHADO, M.P. - Uma nova substância antibiótica isolada do Pau D'Arco, *Tabebuia* sp. **Na. Soc. Biol. Pe.**, 14: 136-140, 1956.

GONÇALVES DE LIMA, O. ; D'ALBUQUERQUE, I.L. ; GONÇALVES DE LIMA C. & MAIA, M.H.D. – Sustâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XX.. **Rev. Inst. Antibiot., Recife**, 4: 3-17, 1962.

GONÇALVES DE LIMA, O. ; COELHO J.S.B. ; D'ALBUQUERQUE, I.L. ; MELLO, J.F; MARTINS, A.L.L. & MORAES E SOUZA, M.A. – Sustâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XXXV. **Ver. Inst. Antibiot., Recife**, 11: 21-26, 1971.

GOULART, M.O.F. ; ZANI, C.L. ; TONHOLO, J. et al. – Trypanocidal activity and redox potencial of heterocyclic and 2-hydroxy-naphthoquinones. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** ,7: 2043-2048, 1997.

GUIRAUD, P. ; STEIMAN, R. ; CAMPOS TAKAKI, G.M. ; SEIGLE MURANDI, F.S. ; BUOCHBERG, M.S. – Comparison of antibacterial and Antifungal activities of lapachol and B-lapachone. **Planta Med.** , 60: 373-374, 1994.

- GUERRA, M.O. ; MAZONI, A.S.B. ; BRANDÃO, M.A. ; PETERS, V.M. – Toxicology of lapachol in rats: Embryoethality. **Rev. Brasil. Biol.** , **61(1)**: 171-174, 2001.
- HAHN, H. & KAUFMANN, S.H.E. – The role cell-mediated immunity in bacterial infections. **Rev. Infect. Dis.**, **3**: 1221-1250, 1981.
- HUDSON, A. T. ; RANDALL, A.W., FRY, M., GINGER, C.D., HILL, B., LATTER, V.S. et al. – Nove l anti-malarial hydroxynaphthoquinones with potent broad spectrum anti-protozoal activity. **Parasitology**, **90**: 45-55, 1985.
- HUNTER, C.A.; CHIZZONITE, R.; REMINGTON, J.S. – IL – 1B is required for 1L – 12 to induce production of IFN- γ by NK cells. **J. Immunol**, **155** : 4347 – 4354, 1995.
- KANEKO, M; KAWAKITA, T; KUMAZAWA, Y; TAKIMOTO, H; NOMOTO, K; YOSHIKAWA, T. – Accelerated recovery from cyclophosphamide-induced leucopenia in mice administered a Japanese ethical herbal drug, Hochu-ekki-to. **Immunopharmacology**; **44(3)**: 223-31, 1999.
- YOSHIKAWA, T. – Accelerated recovery from cyclophosphamide-induced leucopenia in mice administered a Japanese ethical herbal drug, Hochu-ekki-to. **Immunopharmacology**; **44(3)**: 223-31, 1999.
- KAUFMANN, S.H.E. – Immunity to intracellular bacteria. **Annu. Rev. Immunol.**, **11**: 129-163, 1993.
- KOPF, M.; BAUMANN, H.; FREER, G.; FREUDENBERG, M.; LAMBERS, M.; KISHIMOTO, T.; ZINKERNAGEL, R.; BLUETHMANN, H.; KOHLER, G. – Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6 deficient mice. **Nature**, **368** : 339 – 342, 1994.
- LEPAY, D.A.; STEINMAN, R.M.; NATHAN, C.F.; MURRAY, H.W.; ET AL – Liver macrophages in murine listeriosis. Cell-mediated immunity is correlated with on influx of macrophages capable of generating reactive oxygen intermediates. **J Exp Med**, **161** : 1503 – 1512, 1985.
- LIU, Z. & CHEERS, C. – The cellular source of interleukin – 6 during listeria infection. **Infect. Immun.**, **61** : 2626 – 2631, 1993.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras, Vol.I:** 46, 2000.

MACFARLANE, A.S.; HUANG, D.; SCHWACHA, M.G.; MEISSLER, J.J. ; GAUGHAN, J.P. & EISENSTEIN, T.K. – Nitric oxide mediates immunosuppression induced by *Listeria monocytogenes* infection: quantitative studies. **Microbiol. Pathogenesis**, **25**: 267-277, 1998.

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

MELLO, A.; JUSTO G.Z. and SOUZA QUEIROZ, M.L. – Stimulation of myelopoiesis in *Listeria monocytogenes*-infected mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **Human & Experimental Toxicology** (20): 1-8, 2001.

METCALF, D. – Hematopoietic growth factors 1. **Lancet**, **8642** : 825- 827, 1989.

METCALF, D. – The bioassay of coloni-stimulating factors. In: _____ - **The hemopoietic colony stimulating factors**. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier, pp. 187 – 212, 1984.

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

MILON, G. – *Listeria monocytogenes* in laboratory mice: a model of short-term infections and pathogenic process controllable by regulated protective immune responses. **Immunol Rev.**, **158** : 27-46, 1997.

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

MOCCI, S.; DALRYMPLE, A.S.; NISHIMAKAMURA, R.; MURRAY, R. – The cytokine stew and innate resistance to *Listeria monocytogenes*. **Immunol Rev.**, **158** : 107 – 114, 1997.

MORRISON, R.K. ; BROWN, D.E. ; OLESON, J.J. ; COONEY, D.A. - Oral toxicology studies with lapachol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, **17**: 1-11, 1970.

MÜLLER, K. ; SELLMER, A. ; WIEGREBE, W. - Potencial antipsoriatic agents: Lapachol compounds as potent inhibitions of HaCaT cell growth. **J. Nat. Prod.**, **62**: 1134-1136, 1999.

- 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.
- NISHIBORI, T.; XIONG, H; KAWAMURA, I.; ARAKAWA, M.; MITSUYAMA, M. – Induction of cytokine gene expression by Listeriolysin O and roles of macrophages and NK cells. **Infect. Immune.**, **64**: 3188-3195, 1996.
- NORTH, R.J. – The relative importance of blood monocytes and fixed macrophages the expression of cell – mediated immunity to infection. **J. Exp Med.**, **132**: 521 – 534, 1970.
- NORTH, R.J.; DUNN, P.L.; CONLAN, J.W. – Murine listeriosis as a model of antimicrobial defense. **Immunol Rev.**, **158** : 27 – 36, 1997.
- OGA, S.& SEKINO, T.– Toxicidade e atividade antiinflamatória de *Tabebuia avellanedae* Lorentz e Griesebach (ipê-rôxo). **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica de São Paulo**, **7**(1): 47-53, 1969.
- PORTILLO, A. ; VILA, R. ; FREIXO, B; ADZET, T. ; CANIGUERAL, S. – Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **J. Ethnopharmacol.** , **76**(1): 93-98, 2001.
- QUADROS, M.R.; SOUZA – BRITO A.R.; QUEIROZ, M.L.S. – *Petiveria alliacea* L. extract protects mice against *Listeria monocytogenes* infection – effects on bone marrow progenitor cells. **Immunopharmacol Immunotoxicol.**, **21** : 109 – 124,1999
- QUEIROZ, M.L.S. – Células pluripotenciais em cultura : revisão bibliográfica. **Ciência e Cultura**, **40** : 421 – 426, 1988.
- 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.
- RENNICK, D.; YANG, C.; GEMMEL, L. – Control of hemopoiesis by bone marrow stromal cell clone : lipopolysaccharide and interleukin-1 inducible production of colony – Stimulating factors. **Blood**, **69** : 682 – 691,1987.
- ROGERS, H.W.; UNAMAUE, E.R. – Neutrophils are involved in acute, non-specific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. **Infect Immun.**, **61** : 5090 – 5096, 1993.

ROGERS, H.W.; TRIOO C.S; SCHREIBER, R.D; UNAMAUE, E.R. – Endogenous IL-1 is required for neutrophil recruitment and macrophage activation during murine listeriosis. **J. Immunol.**, **153**: 2093-2101, 1994.

ROMAGNANI, S. – Role of cytokines in development of TH1 and Th2 cells. **Chem Immunol**, **63** : 1 – 13, 1996.

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

SAIZARBITORIA, T.C. ; ANDERSON, J.E. ; ALFONSO, D. McLAUGHLIN, J. – Bioactive furonaphthoquinones from *Tabebuia barbata* (Bignoniaceae) **Acta. Cient. Venezuelana**, **48**: 42-46, 1997.

SANTANA, C.F. ; GONÇALVES DE LIMA, O. ; D'ALBUQUERQUE, L. ; LACERDA, A.L. & MARTINS, G. - Observações sobre as propriedades antitumorais e toxicológicas do extrato do Pau D'Arco (*Tabebuia avellanedae*). **Rev. Inst. Ant. , Recife**, **8(1/2)**: 89-94, 1968.

SOUTHWICK, F.S. & PURICH, DL. – Intracellular pathogenesis of listeriosis. **New Engl. J. Med.**, **334**: 770-776, 1996.

TRIPP, C.S.; WOLFE, S.F.; UNANUE, E.R. – Interleukin 12 and TNF – alpha one costimulations of IFN-gamma moderation by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice listeriosis, and IL-10 is a physiologic antagonist. **Proc Natl Acad Sci USA**, **90** : 3725- 3729, 1993.

VAN DEN ENGH, G.J. & BOL, S – The presence of a CSF enhancing activity in the serum of endotoxin treated mice. **Cell. Tiss. Kinet.**, **8**: 579-587, 1975

WING, E.J.; BARCZYNSKI, L.K; WAHEEDA; SHODDUCK, R.K. – Effect of listeria monoc. Infection on serum levels of colony stimulating factor and number of progenitor cells in immune and non-immune animals. **Infect Immun.**, **49** : 325 – 328, 1985.

WING, E.J.; WAHEED, A.; SHADDUCK, R.K. – Changes in serum colony-stimulating factor and monocytic progenitor cells during List. Mon. infection in mice. **Infect Immun.**, **45** : 180 – 184, 1984.

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

ZHAN, Y.F.; LIESCHKE, G.J.; GRAIL, D.; DUNN, A.R.; ET AL – Essential roles for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF in sustained hemtopoietic response of *Listeria monocytogenes* – infected mice. **Blood**, **91** : 863 – 886, 1988.



8. *APÊNDICE*

Tabela 1. Estudo dos efeitos do EHTA sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c, tratados com as doses de 125, 250, 500 e 1000 mgKg/dia, durante 7 dias e sacrificados 24 horas após o tratamento.

Animal	Ctrl*	CFU-GM/Fêmur ($\times 10^{-3}$)			
		T. avellaneda (24hs)			
		125	250	500	1000
1	11,30	10,8	9,45	9,72	6,88
2	10,26	8,93	10,26	8,16	7,03
3	9,97	10,11	10,88	11,30	7,28
4	10,29	9,78	12,44	10,45	7,98
5	9,01	8,64	8,24	11,30	7,47
6	9,26	9,44	11,64	9,01	5,76
X	10,11	9,18	10,5	10,08	7,15
DP	0,82	3,67	1,51	1,26	0,74

Ctrl* - Controle

125 – Tratados com EHTA 125mg/Kg/dia

250 - Tratados com EHTA 250mg/Kg/dia

500 - Tratados com EHTA 500mg/Kg/dia

1000 - Tratados com EHTA 1000mg/Kg/dia

Tabela 2. Estudo dos efeitos do EHTA sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c, tratados com as doses de 125, 250, 500 e 1000 mgKg/dia, durante 7 dias e sacrificados 48 horas após o tratamento

CFU-GM/Fêmur ($\times 10^{-3}$)					
Animal	Ctrl*	T. avellaneda (48hs)			
		125	250	500	1000
1	11,30	10,03	9,18	12,32	7,22
2	10,26	10,53	10,80	10,88	8,16
3	9,97	9,59	11,21	9,45	7,36
4	10,29	10,17	9,02	10,96	7,88
5	9,01	9,43	10,35	7,39	10,53
6	9,26	9,28	11,61	9,20	7,48
X	10,11	10,10	10,57	10,16	7,68
DP	0,82	0,56	1,02	1,72	1,23

Ctrl* - Controle

125 – Tratados com EHTA 125mg/Kg/dia

250 - Tratados com EHTA 250mg/Kg/dia

500 - Tratados com EHTA 500mg/Kg/dia

1000 - Tratados com EHTA 1000mg/Kg/dia

Tabela 3. Estudo dos efeitos do EHTA sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c, tratados com as doses de 125, 250, 500 e 1000 mgKg/dia, durante 7 dias e sacrificados 72 horas após o tratamento.

Animal	CFU-GM/Fêmur ($\times 10^{-3}$)				
	Ctrl*	T. avellanedae (72hs)			
		125	250	500	1000
1	11,30	8,92	9,18	11,88	7,60
2	10,26	10,26	10,08	11,21	10,23
3	9,97	9,40	9,86	10,71	8,75
4	10,29	9,18	8,91	9,76	9,63
5	9,01	11,68	9,94	9,60	10,62
6	9,26	9,94	8,73	12,15	8,08
X	10,11	9,67	9,52	10,96	9,19
DP	0,82	1,00	0,77	4,32	1,20

Ctrl* - Controle

125 – Tratados com EHTA 125mg/Kg/dia

250 - Tratados com EHTA 250mg/Kg/dia

500 - Tratados com EHTA 500mg/Kg/dia

1000 -Tratados com EHTA 1000mg/Kg/dia

Tabela 4. Estudo dos efeitos do EHTA sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de camundongos BALB/c, tratados com as doses de 125,250,500 e 1000 mg/Kg/dia, durante 7 dias e sacrificados 24 horas.após o tratamento.

CFU-GM/Baço ($\times 10^{-2}$)					
Animal	Ctrl*	T. avellanadae (24hs)			
		125	250	500	1000
1	11,34	6,21	5,67	7,92	7,20
2	7,56	7,56	4,32	6,84	13,23
3	4,32	4,68	7,02	14,58	6,75
4	7,92	7,20	5,67	6,21	7,20
5	3,42	6,48	1,89	3,60	15,12
6	6,75	7,29	2,52	9,72	10,26
X	7,15	6,84	4,99	7,38	8,73
DP	2,82	1,04	1,99	3,74	3,54

Ctrl* - Controle

125 – Tratados com EHTA 125mg/Kg/dia

250 - Tratados com EHTA 250mg/Kg/dia

500 - Tratados com EHTA 500mg/Kg/dia

1000 -Tratados com EHTA 1000mg/Kg/dia

Tabela 5. Estudo dos efeitos do EHTA sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de camundongos BALB/c, tratados com as doses de 125,250,500 e 1000 mg/Kg/dia, durante 7 dias sacrificados 48 horas após o tratamento.

Animal	CFU-GM/Baço ($\times 10^{-3}$)				
	Ctrl*	T. avellaneda (48hs)			
		125	250	500	1000
1	11,34	9,36	10,08	10,80	9,00
2	7,56	10,35	6,21	5,13	10,35
3	4,32	6,75	4,68	3,78	6,84
4	7,92	9,45	1,89	9,36	3,78
5	3,42	5,04	1,98	11,88	12,96
6	6,75	11,70	4,68	5,40	7,92
X	7,15	9,40	7,38	4,68	8,46
DP	2,82	2,44	3,25	3,04	3,12

Ctrl* - Controle

125 – Tratados com EHTA 125mg/Kg/dia

250 - Tratados com EHTA 250mg/Kg/dia

500 - Tratados com EHTA 500mg/Kg/dia

1000 - Tratados com EHTA 1000mg/Kg/dia

Tabela 6. Estudo dos efeitos do EHTA sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de camundongos BALB/c, tratados com as doses de 125,250,500 e 1000 mg/Kg/dia, durante 7 dias e sacrificados 72 horas após o tratamento.

CFU-GM/Baço ($\times 10^{-2}$)					
Animal	Ctrl*	T. avellanedae (72hs)			
		125	250	500	1000
1	11,34	6,75	4,14	4,68	6,48
2	7,56	3,60	4,32	4,50	15,12
3	4,32	11,88	7,83	9,36	14,04
4	7,92	9,45	4,68	10,80	4,32
5	3,42	9,00	6,75	7,92	7,56
6	6,75	8,64	3,96	12,42	5,94
X	7,15	8,82	4,50	8,64	7,02
DP	2,82	2,80	1,61	3,22	4,52

Ctrl* - Controle

125 – Tratados com EHTA 125mg/Kg/dia

250 - Tratados com EHTA 250mg/Kg/dia

500 - Tratados com EHTA 500mg/Kg/dia

1000 -Tratados com EHTA 1000mg/Kg/dia

Tabela 7 Estudo dos efeitos do EHTA sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal – i.p.). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.

CFU-GM/Fêmur ($\times 10^{-3}$)						
Animal	Ctrl*	Listeria (24hs)	T. avellanedae + Listeria (24hs)			
			125	250	500	1000
1	11,30	8,67	10,30	9,69	9,76	6,08
2	10,26	9,21	8,08	11,30	10,92	4,64
3	9,97	8,56	8,33	12,16	10,26	4,80
4	10,29	9,40	9,54	12,06	9,69	4,77
5	9,01	9,18	8,92	13,58	9,90	3,69
6	9,26	8,32	9,52	12,35	9,52	4,59
X	10,11	8,92	9,22	12,1	9,83	4,70
DP	0,82	0,43	0,69	1,2	0,51	0,76

Ctrl* - Controle

Listeria 24,48 e 72hs – Controle infectado e sacrificado 24h após respectivamente.

125 – Tratados com EHTA 125mg/Kg/dia

250 - Tratados com EHTA 250mg/Kg/dia

500 - Tratados com EHTA 500mg/Kg/dia

1000 - Tratados com EHTA 1000mg/Kg/dia

Tabela 8. Estudo dos efeitos do EHTA sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal – i.p.). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.

CFU-GM/Fêmur ($\times 10^{-3}$)						
Animal	Ctrl*	Listeria (48hs)	T. avellaneda + Listeria (48hs)			
			125	250	500	1000
1	11,30	4.46	7.56	11.79	9.45	4.23
2	10,26	4.08	7.57	9.63	8.37	3.89
3	9,97	4.32	9.60	11.97	9.90	3.15
4	10,29	3.18	7.84	12.92	8.56	4.16
5	9,01	3.82	9.18	10.64	9.44	4.46
6	9,26	5.22	7.92	10.92	9.18	4.28
X	10,11	4,20	7,88	11,35	9,31	4,19
DP	0,82	0,68	0,88	1,15	0,58	0,46

Ctrl* - Controle

Listeria 24,48 e 72hs – Controle infectado e sacrificado 24, 48 e 72h após respectivamente.

125 – Tratados com EHTA 125mg/Kg/dia

250 - Tratados com EHTA 250mg/Kg/dia

500 - Tratados com EHTA 500mg/Kg/dia

1000 - Tratados com EHTA 1000mg/Kg/dia

Tabela 9. Estudo dos efeitos do EHTA sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal – i.p.). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.

CFU-GM/Fêmur ($\times 10^{-3}$)						
Animal	Ctrl*	Listeria (72hs)	T. avellanadae + Listeria (72hs)			
			125	250	500	1000
1	11,30	5.61	7,99	11,73	9,27	7,04
2	10,26	4.32	7,82	12,63	9,01	6,84
3	9,97	5.79	9,18	11,16	10,45	7,79
4	10,29	5.01	8,07	11,21	9,63	6,12
5	9,01	5.85	9,44	9,99	7,31	5,51
6	9,26	6.12	6,88	11,53	10,44	7,47
X	10,11	5,70	8,03	11,3	9,45	6,94
DP	0,82	0,66	0,94	0,86	1,16	0,85

Ctrl* - Controle

Listeria 24,48 e 72hs – Controle infectado e sacrificado 72h após .

125 – Tratados com EHTA 125mg/Kg/dia

250 - Tratados com EHTA 250mg/Kg/dia

500 - Tratados com EHTA 500mg/Kg/dia

1000 -Tratados com EHTA 1000mg/Kg/dia

Tabela 10. Estudo dos efeitos do EHTA sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de animais BALB/c, tratados com as doses de 125, 250, 500 e 1000 mg/Kg/dia, durante 7 dias e posteriormente infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal – i.p.). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.

CFU-GM/Baço ($\times 10^{-2}$)						
Animal	Ctrl*	Listeria (24hs)	T. avellanadae + Listeria (24hs)			
			125	250	500	1000
1	11,34	13,68	17,64	8,64	11,34	20,88
2	7,56	12,60	11,70	9,36	11,70	20,70
3	4,32	9,72	8,90	7,02	15,84	22,68
4	7,92	10,80	10,44	5,04	9,56	21,06
5	3,42	9,45	15,12	6,48	10,80	26,46
6	6,75	11,88	9,00	3,96	12,60	28,71
X	7,15	11,34	11,0	6,75	11,52	21,87
DP	2,82	1,66	3,53	2,06	2,14	3,38

Ctrl* - Controle

Listeria 24 hs Controle infectado e sacrificado 24 hs após.

125 – Tratados com EHTA 125mg/Kg/dia

250 - Tratados com EHTA 250mg/Kg/dia

500 - Tratados com EHTA 500mg/Kg/dia

1000 - Tratados com EHTA 1000mg/Kg/dia

Tabela 11. Estudo dos efeitos do EHTA sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de animais BALB/c, tratados com as doses de 125, 250, 500 e 1000 mg/Kg/dia, durante 7 dias e posteriormente infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal – i.p.). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.

		CFU-GM/Baço ($\times 10^{-2}$)				
Animal	Ctrl*	Listeria (48hs)	T. avellanadae + Listeria (48hs)			
			125	250	500	1000
1	11,34	85,50	15,8	10,80	9,36	73,26
2	7,56	80,91	16,2	4,68	12,42	52,92
3	4,32	83,25	22,6	6,75	7,92	67,86
4	7,92	62,37	15,1	6,21	10,80	71,82
5	3,42	76,59	23,4	10,44	5,67	85,68
6	6,75	67,86	22,7	7,29	10,80	64,17
X	7,15	78,75	19,4	7,02	10,08	69,8
DP	2,82	9,15	3,98	2,43	2,41	10,8

Ctrl* - Controle

Listeria 48 hs - Controle infectado e sacrificado 48 hs após.

125 – Tratados com EHTA 125mg/Kg/dia

250 - Tratados com EHTA 250mg/Kg/dia

500 - Tratados com EHTA 500mg/Kg/dia

1000 - Tratados com EHTA 1000mg/Kg/dia

Tabela 12. Estudo dos efeitos do EHTA sobre o crescimento e diferenciação de Precusores hematopoéticos do baço de animais BALB/c, tratados com as doses de 125, 250, 500 e 1000 mg/Kg/dia, durante 7 dias e posteriormente infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal – i.p.). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.

CFU-GM/Baço ($\times 10^{-3}$)						
Animal	Ctrl*	Listeria (72hs)	T. avellanadae + Listeria (72hs)			
			125	250	500	1000
1	11,34	74,25	22,68	4,32	5,04	45,36
2	7,56	53,82	27,72	3,96	9,45	57,96
3	4,32	70,20	16,20	6,48	3,96	47,61
4	7,92	57,60	17,01	7,56	7,02	63,00
5	3,42	57,42	18,81	4,68	7,92	48,60
6	6,75	70,47	24,82	7,92	9,00	49,14
X	7,15	63,90	20,7	5,58	7,47	48,87
DP	2,82	8,64	4,60	1,72	2,18	6,92

Ctrl* - Controle

Listeria 72hs Controle infectado e sacrificado 72hs após, respectivamente.

125 – Tratados com EHTA 125mg/Kg/dia

250 - Tratados com EHTA 250mg/Kg/dia

500 - Tratados com EHTA 500mg/Kg/dia

1000 - Tratados com EHTA 1000mg/Kg/dia

Tabela 13. Estudo dos efeitos do EHTA sobre a produção de fatores estimuladores de colônias em camundongos BALB/c, tratados com as doses de 125, 250, 500 e 1000mg/Kg/dia, durante 7 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/ animal -i.p.). O soro dos animais foi coletado 24 horas após a infecção.

Atividade Estimuladora de Colônias (CSA) U/ml						
Animal	T. avellanedae + Listeria (24hs)					
	Ctrl*	Listeria (24hs)	125	250	500	1000
1	0,35	8,51	10,46	15,25	12,00	0,92
2	0,56	6,17	10,24	14,92	12,83	0,71
3	1,41	9,22	9,86	15,58	13,24	0,84
4	0,82	9,54	10,55	15,37	11,96	1,09
5	0,5	7,42	9,91	15,29	11,22	1,16
6	0,73	9,81	10,47	14,88	12,17	0,95
X	0,64	8,86	10,3	15,27	12,08	0,93
DP	0,37	1,4	0,30	0,26	0,71	0,20

Ctrl* - Controle

Listeria 24 hs Controle infectado e sacrificado 24 hs após, respectivamente.

125 – Tratados com EHTA 125mg/Kg/dia

250 - Tratados com EHTA 250mg/Kg/dia

500 - Tratados com EHTA 500mg/Kg/dia

1000 - Tratados com EHTA 1000mg/Kg/dia

Tabela 14. Estudo dos efeitos do EHTA sobre a produção de fatores estimuladores de colônias em camundongos BALB/c, tratados com as doses de 125, 250, 500 e 1000mg/Kg/dia, durante 7 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/ animal - i.p.). O soro dos animais foi coletado 48 horas após a infecção.

Atividade Estimuladora de Colônias (CSA) U/ml						
Animal	Ctrl*	Listeria (48hs)	T. avellanedae + Listeria (48hs)			
			125	250	500	1000
1	0,35	11,46	12,3	17,94	13,72	1,31
2	0,56	12,72	12,8	17,56	14,16	0,89
3	1,41	12,89	11,7	17,82	14,21	0,97
4	0,82	11,23	12,4	18,25	13,25	1,42
5	0,5	12,51	13,1	17,91	13,10	1,53
6	0,73	11,74	12,1	18,31	12,33	1,18
X	0,64	12,12	12,3	17,92	13,48	1,24
DP	0,37	0,70	0,49	0,27	0,71	0,71

Ctrl* - Controle

Listeria 48 hs Controle infectado e sacrificado 48 hs após, respectivamente.

125 – Tratados com EHTA 125mg/Kg/dia

250 - Tratados com EHTA 250mg/Kg/dia

500 - Tratados com EHTA 500mg/Kg/dia

1000 - Tratados com EHTA 1000mg/Kg/dia

Tabela 15. Estudo dos efeitos do EHTA sobre a produção de fatores estimuladores de colônias em camundongos BALB/c, tratados com as doses de 125, 250, 500 e 1000mg/ Kg/dia, durante 7 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal – i.p.). O soro dos animais foi coletado 24, 48 e 72horas após a infecção

Atividade Estimuladora de Colônias (CSA) U/ml						
Animal	Ctrl*	T. avellanedae + Listeria (72hs)				
		Listeria (72hs)	125	250	500	1000
1	0,35	7,31	9,55	13,22	14,80	0,60
2	0,56	6,25	10,27	12,93	15,23	0,94
3	1,41	6,44	9,64	13,74	15,77	0,37
4	0,82	5,62	9,22	13,16	14,24	0,42
5	0,5	5,87	10,18	12,85	15,10	0,63
6	0,73	5,79	9,16	13,36	14,12	0,65
X	0,64	6,06	9,59	13,19	14,95	0,61
DP	0,37	0,61	0,46	0,32	0,61	0,20

Ctrl* - Controle

Listeria 24,48,72hs Controle infectado e sacrificado 24,48 e 72hs após,respectivamente.

125 – Tratados com EHTA 125mg/Kg/dia

250 - Tratados com EHTA 250mg/Kg/dia

500 - Tratados com EHTA 500mg/Kg/dia

1000 -Tratados com EHTA 1000mg/Kg/dia

Tabela 16. Estudo dos efeitos do EHTA sobre o peso do baço de animais BALB/c .Os animais foram sacrificados 24 horas após a finalização do tratamento

PESO DO BAÇO (gramas) Parâmetros x 10⁻²					
Animal	Ctrl	125	250	500	1000
1	16,9	15,2	17,2	20,6	21,7
2	16,1	16,2	15,7	18,9	22,9
3	17,3	14,5	15,5	20,2	21,7
4	16,4	15,4	16,9	19,4	23,4
5	15,7	13,6	15,9	19,1	22,6
6	17,2	13,9	14,8	20,1	23,1
X	16,6	18,9	18,4	19,3	20,3
DP	0,6	1,0	1,0	1,1	1,0

Ctrl*: controle

EHTA: tratados com EHTA (125, 250, 500 e 1000 mg/kg) durante 7 dias , e sacrificados 24h após.

Tabela 17. Estudo dos efeitos do EHTA sobre o peso do baço de animais BALB/c. Os animais foram sacrificados 48 horas após a finalização do tratamento

PESO DO BAÇO (gramas) Parâmetros x 10⁻²					
Animal	Ctrl*	125	250	500	1000
1	16,9	22,0	16,1	18,5	27,6
2	16,1	19,9	18,7	19,6	28,0
3	17,3	19,5	16,3	18,3	29,1
4	16,4	21,3	18,1	19,8	27,4
5	15,7	22,3	18,0	18,9	29,0
6	17,2	22,6	16,2	18,0	29,4
X	16,6	19,2	18,7	18,3	18,7
DP	0,6	0,9	1,11	0,9	1,0

Ctrl*: controle

EHTA : tratados com EHTA (125, 250, 500 e 1000 mg/kg) durante 7 dias e sacrificados 48 horas após.

Tabela 18. Estudo dos efeitos do EHTA sobre o peso do baço de animais BALB/c. Os animais foram sacrificados 72 horas após a finalização do tratamento.

PESO DO BAÇO (gramas)					
Parâmetros x 10 ⁻²					
Animal	Ctrl	125	250	500	1000
1	16,9	25,6	21,8	24,6	25,1
2	16,1	25,8	20,7	19,3	29,4
3	17,3	27,2	19,5	20,9	26,4
4	16,4	26,9	21,1	20,3	27,8
5	15,7	25,3	16,2	19,7	25,6
6	17,2	26,7	17,5	19,8	25,0
X	16,6	19,4	19,1	20,3	18,8
DP	0,6	1,0	0,5	0,7	0,8

Ctrl*: controle

EHTA : tratados com EHTA (125, 250, 500 e 1000 mg/kg) durante 7 dias e sacrificados 72 horas após.

Tabela 19. Estudo dos efeitos do EHTA sobre o peso do baço de animais BALB/c, infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal-i.p.). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção

PESO DO BAÇO (gramas)						
Parâmetros $\times 10^{-2}$						
Animal	Ctrl*	I/24hs	125	250	500	1000
1	16,9	23,2	15,2	17,2	20,6	21,7
2	16,1	21,8	16,2	15,7	18,9	22,9
3	17,3	22,5	14,5	15,5	20,2	21,7
4	16,4	21,7	15,4	16,9	19,4	23,4
5	15,7	23,3	13,6	15,9	19,1	22,6
6	17,2	21,9	13,9	14,8	20,1	23,1
X	16,6	22,4	14,8	16,0	19,6	22,5
DP	0,6	0,7	0,9	0,8	0,7	0,7

Ctrl*: controle

I : Infectados (24hs)

EHTA + I : tratados com EHTA (125, 250, 500 e 1000 mg/kg) durante 7 dias ; infectados e sacrificados 24h após.

Tabela 20. Estudo dos efeitos do EHTA sobre o peso do baço de animais BALB/c, infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal-i.p.). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.

PESO DO BAÇO (gramas)						
Parâmetros $\times 10^{-2}$						
Animal	Ctrl*	I/48hs	125	250	500	1000
1	169	27,8	22,0	16,1	18,5	27,6
2	161	26,9	19,9	18,7	19,6	28,0
3	173	26,1	19,5	16,3	18,3	29,1
4	164	28,0	21,3	18,1	19,8	27,4
5	157	28,5	22,3	18,0	18,9	29,0
6	172	27,6	22,6	16,2	18,0	29,4
X	16,6	27,4	21,2	17,2	18,8	28,4
DP	0,6	0,8	1,2	1,5	0,7	0,8

Ctrl*: controle

I : Infectados (48 h)

EHTA + I : tratados com EHTA (125, 250, 500 e 1000 mg/kg) durante 7 dias ; infectados e sacrificados 48 hs após.

Tabela 21. Estudo dos efeitos do EHTA sobre o peso do baço de animais BALB/c, infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal-i.p.). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.

PESO DO BAÇO (gramas)						
Parâmetros $\times 10^{-2}$						
Animal	Ctrl	I/72hs	125	250	500	1000
1	16,9	27,9	25,6	21,8	24,6	25,1
2	16,1	25,4	25,8	20,7	19,3	29,4
3	17,3	26,8	27,2	19,5	20,9	26,4
4	16,4	26,2	26,9	21,1	20,3	27,8
5	15,7	27,1	25,3	16,2	19,7	25,6
6	17,2	24,9	26,7	17,5	19,8	25,0
X	16,6	26,3	26,2	19,9	20,7	26,5
DP	0,6	1,1	0,7	1,6	1,9	1,7

Ctrl*: controle

I : Infectados 72h

EHTA + I : tratados com EHTA (125, 250, 500 e 1000 mg/kg) durante 7 dias ; infectados e sacrificados 72hs após.