

SAMARA EBERLIN

***AVALIAÇÃO DO EXTRATO DE *Uncaria tomentosa* NA
RESPOSTA HEMATOPOÉTICA EM CAMUNDONGOS
INFECTADOS COM *Listeria monocytogenes****

CAMPINAS

2004

SAMARA EBERLIN

***AVALIAÇÃO DO EXTRATO DE *Uncaria tomentosa* NA
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 obtenção do título de Mestre
em Fisiopatologia Médica, área de Medicina
Experimental.*

ORIENTADORA: Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

CAMPINAS

2004

CHAMADA
UNICAMP
EX
MEDI. Nº 583 43
DOC. 14/11/04
CLT 013
MCO 12/11/04
DATA 26/5/04
CFO

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

000197115-6

IBID 316926

Eb37a Eberlin, Samara
Avaliação do extrato de *Uncaria tomentosa* na resposta
hematopoética em camundongos infectados com *Listeria*
monocytogenes / Samara Eberlin . Campinas, SP : [s.n.], 2004.

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

1.Hematopoeese. 2. Listeriose. I. Mary Luci de Souza Queiroz. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Orientadora:

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Membros:

Profa. Dra. Denise Fecchio

Profa. Dra. Marize Campos Valadares

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

Data: 19/02/2004

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo Seu grande amor e presença constante em minha vida.

À minha mãe, Ana Maria, pelos traços de caráter que me transmitiu, revestindo minha existência de amor, carinho e dedicação. Por estar sempre pronta para uma palavra amiga, distribuindo confiança quando eu já desistia, acolhendo com um abraço a aflição de um momento, vibrando e se orgulhando a cada desafio vencido.

Ao meu pai, Valter, pelas oportunidades, pelo incentivo e consolo nos momentos difíceis, por compartilhar suas experiências, pelas críticas e sugestões que foram de grande valia para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, orientadora deste trabalho, por essa oportunidade ímpar, pela confiança, estímulo e apoio ao meu desenvolvimento científico.

Aos meus irmãos, Samer e Samir e ao meu namorado André, que sempre me incentivaram e auxiliaram nos momentos em que precisei.

Aos meus avós, Carmem, Teresa e Zico, pelas orações e palavras de conforto.

Aos colegas do laboratório, que no convívio diário compartilharam momentos importantes de aprendizagem e tornaram nosso trabalho mais alegre e compensador.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao departamento de Fisiopatologia Médica, departamento de Farmacologia e Hemocentro que possibilitaram a realização deste trabalho.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para mais esta etapa vencida na minha vida.

“...O Senhor faz sair da terra os medicamentos, não os rejeita o homem sensato. Foi ele quem deu aos homens a ciência, para que se glorifiquem pelos prodígios do Senhor. Pelos medicamentos se realiza a cura e a dor desaparece, com eles prepara-se o farmacêutico. Composições agradáveis, unguentos saudáveis e diversificação de seu trabalho de mil maneiras. Assim suas obras não ficam inacabadas e o bem-estar se espalha sobre a terra...”

(Eclesiástico 38, 4-8)

	<i>Pág</i>
RESUMO	<i>xii</i>
ABSTRACT	<i>xiv</i>
INTRODUÇÃO	16
<i>Uncaria tomentosa</i>	17
Modelo experimental de infecção por <i>Listeria monocytogenes</i>	20
OBJETIVOS	23
MATERIAL E MÉTODOS	25
1 - Animais.....	26
2 - <i>Listeria monocytogenes</i>	26
3 - Tratamento com o extrato de <i>Uncaria tomentosa</i>	27
4 - Cultura clonal de precursores hematopoéticos de medula óssea e baço de camundongos (CFU-C).....	28
4.1 - Medula óssea.....	28
4.2 - Baço.....	29
4.3 - Preparação das placas de cultura da medula óssea e baço em meio semi-sólido.....	29
5 - Preparação do meio condicionado de células esplênicas (SCM).....	30

6 - Obtenção do soro dos animais para detecção da atividade dos fatores estimuladores de colônias.....	31
7 - Realização da curva de sobrevivência.....	32
8 - Peso do baço dos animais submetidos aos referidos tratamentos.....	32
9 - Análise estatística.....	32
RESULTADOS.....	33
1 - Efeitos do EUT sobre o número de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos da medula óssea e do baço de camundongos (CFU-C).....	34
1.1 - Medula óssea.....	34
1.2 - Baço.....	36
2 - Efeitos do EUT sobre a produção de fatores estimuladores de colônias (CSFs).....	38
3 - Efeitos do EUT sobre o peso do baço dos animais.....	40
4 - Efeitos do EUT na sobrevivência de animais infectados com uma dose letal de <i>Listeria monocytogenes</i>	42
DISCUSSÃO.....	44
CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
APÊNDICES.....	61

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1 - Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) em presença de células de medula óssea de camundongos BALB/c.....	30
Tabela 2 - Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais tratados com extrato de <i>Uncaria tomentosa</i>	62
Tabela 3 - Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais tratados com extrato de <i>Uncaria tomentosa</i> e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> . Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.....	62
Tabela 4 - Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais tratados com extrato de <i>Uncaria tomentosa</i> e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> . Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.....	63
Tabela 5 - Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais tratados com extrato de <i>Uncaria tomentosa</i> e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> . Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.....	63
Tabela 6 - Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais tratados com extrato de <i>Uncaria tomentosa</i>	64
Tabela 7 - Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais tratados com extrato de <i>Uncaria tomentosa</i> e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> . Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.....	64

Tabela 8 - Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais tratados com extrato de <i>Uncaria tomentosa</i> e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> . Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.....	65
Tabela 9 - Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais tratados com extrato de <i>Uncaria tomentosa</i> e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> . Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.....	65
Tabela 10 - Fatores estimuladores de colônias no soro de animais tratados com extrato de <i>Uncaria tomentosa</i>	66
Tabela 11 - Fatores estimuladores de colônias no soro de animais tratados com extrato de <i>Uncaria tomentosa</i> e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> . Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.....	66
Tabela 12 - Fatores estimuladores de colônias no soro de animais tratados com extrato de <i>Uncaria tomentosa</i> e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> . Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.....	67
Tabela 13 - Fatores estimuladores de colônias no soro de animais tratados com extrato de <i>Uncaria tomentosa</i> e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> . Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.....	67
Tabela 14 - Peso do baço de animais tratados com extrato de <i>Uncaria tomentosa</i>	68
Tabela 15 - Peso do baço de animais tratados com extrato de <i>Uncaria tomentosa</i> e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> . Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.....	68

Tabela 16.- Peso do baço de animais tratados com extrato de <i>Uncaria tomentosa</i> e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> . Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.....	69
Tabela 17 - Peso do baço de animais tratados com extrato de <i>Uncaria tomentosa</i> e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> . Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.....	69
Tabela 18 - Avaliação da sobrevivência de animais tratados durante 7 dias com extrato de <i>Uncaria tomentosa</i> e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i>	70

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1 - Curva da capacidade estimuladora do crescimento de colônias expressa em unidades/mL.....	31
Figura 2 - Efeitos do extrato de <i>Uncaria tomentosa</i> (10, 50 e 100 mg/Kg/dia) administrados durante 7 dias consecutivos sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais normais e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> (1x10 ³ bac/animal).....	35
Figura 3 - Efeitos do extrato de <i>Uncaria tomentosa</i> (10, 50 e 100 mg/Kg/dia) administrados durante 7 dias consecutivos sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais normais e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> (1x10 ³ bac/animal).....	37
Figura 4 - Efeitos do extrato de <i>Uncaria tomentosa</i> (10, 50 e 100 mg/Kg/dia) administrados durante 7 dias consecutivos sobre a produção de fatores estimuladores de colônias no soro de animais normais e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> (1x10 ³ bac/animal).....	39
Figura 5 - Efeitos do extrato de <i>Uncaria tomentosa</i> (10, 50 e 100 mg/Kg/dia) administrados durante 7 dias consecutivos sobre o peso do baço de animais normais e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> (1x10 ³ bac/animal).....	41
Figura 6 - Efeitos do extrato de <i>Uncaria tomentosa</i> (10, 50 e 100 mg/Kg/dia) administrados durante 7 dias consecutivos na sobrevivência de animais infectados com uma dose letal de <i>Listeria monocytogenes</i> (2x10 ⁵ bac/animal).....	43



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.

Neste trabalho, investigamos o efeito do extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea e do baço e a atividade estimuladora de colônias (CSA) do soro de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes*. A eficácia de EUT frente a uma dose letal da bactéria também foi avaliada.

Demonstramos que o EUT protegeu os animais contra uma dose letal de *L. monocytogenes*, quando administrado profilaticamente nas doses de 50 e 100 mg/kg durante 7 dias, com taxas de sobrevivência de 15 e 35%, respectivamente.

Este tratamento também preveniu a mielossupressão e hematopoese extramedular causadas por uma dose sub-letal de *L. monocytogenes*, devido a um aumento no número de CFU-GM na medula óssea. Além disso, observamos uma resposta dose-dependente na estimulação da mielopoese. Animais somente tratados (não infectados) com uma dose de 100mg/Kg também apresentaram números elevados de CFU-GM na medula óssea em relação ao grupo controle.

Adicionalmente, a investigação da produção de fatores estimuladores de colônias no soro dos animais revelou um aumento da CSA nos grupos normais e infectados quando estes foram pré-tratados com EUT, sugerindo que a estimulação da mielopoese pelo extrato seja mediada pela produção de fatores de crescimento.

Estes resultados favorecem a nossa hipótese de que a habilidade da *Uncaria tomentosa* em induzir uma alta reserva de progenitores na medula óssea seja o maior determinante da resistência à infecção.



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 that *Uncaria tomentosa* extract (UTE) protects mice from a lethal dose of *Listeria monocytogenes* when administered prophylactically at 50 and 100 mg/kg for 7 days, with survival rates of 15 and 35%, respectively.

These doses also prevented the myelosuppression and the splenomegaly due to increased numbers of granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM) caused by a sublethal infection with *L. monocytogenes*. Moreover, stimulation of myelopoiesis occurred in a dose-dependent manner. Non-infected mice treated with 100 mg/kg UTE also presented higher numbers of CFU-GM in the bone marrow than the controls.

Furthermore, investigation of the production of colony-stimulating factors revealed increased colony-stimulating activity in the serum of normal and infected mice pre-treated with UTE, suggesting that stimulation of myelopoiesis by UTE is mediated by its effects on the production of growth factors.

These results favour our hypothesis that the ability of *Uncaria tomentosa* to induce a higher reserve of myeloid progenitors is of major significance in determining early resistance to infection.



INTRODUÇÃO

O desencanto com a síntese química, a ineficiência e seus efeitos colaterais despertam a busca de mecanismos alternativos de combate e prevenção de estados patológicos. Dentre estes mecanismos, os produtos naturais derivados de plantas são os que mais se destacam (RATES, 2001).

O uso das plantas como remédio é provavelmente tão antigo quanto a própria história da humanidade (GRAVES, 1945). Hoje são usadas para uma variedade de doenças e sua popularidade vem aumentando, tanto que, centenas de produtos naturais estão disponíveis para o consumidor vendidos na forma de suplemento em farmácias e drogarias (SANTA MARIA *et al.*, 1997).

Contudo, o problema a cerca do aumento da utilização de plantas medicinais é a falta de informações sobre as maneiras e doses a serem utilizadas, bem como, seus mecanismos de ação e possíveis efeitos tóxicos (SANDOVAL *et al.*, 2000).

Relatos contidos em farmacopéias e papiros, da experimentação e do instinto dos povos serviram de base para pesquisa de seus sugestivos valores terapêuticos, contribuindo substancialmente para o processo de desenvolvimento de drogas (GRAHAM, 2000).

O grande número de trabalhos sobre a descoberta de compostos bioativos, publicado nos últimos anos, destacam substâncias com propriedades anti-tumorais, antibióticas, antiinflamatórias, imunomoduladoras, contra doenças renais, psiquiátricas e tropicais (RATES, 2001).

Uncaria tomentosa

Uma das regiões mais promissoras em espécies com potenciais terapêuticos é a América do Sul, particularmente a floresta tropical, sendo uma das espécies mais utilizadas, a *Uncaria tomentosa* (KEPLINGER *et al.*, 1999; WILLIAMS, 2001; MUHAMMAD *et al.*, 2001).

A *Uncaria tomentosa* (Wild.) D.C., conhecida popularmente como unha de gato é uma trepadeira pertencente a família Rubiaceae nativa da floresta tropical amazônica. No Peru, é considerada uma das espécies botânicas mais valiosas sendo tradicionalmente utilizada na medicina popular, há cerca de 2000 anos, para o tratamento de várias doenças como, infecções virais, câncer, úlcera gástrica, artrite e outras desordens inflamatórias (MUHAMMAD *et al.*, 2001; AGUILAR *et al.*, 2002).

Para tribos indígenas peruanas, a *Uncaria tomentosa* é considerada uma planta sagrada que serve para “regular os mundos físico e espiritual” (KEPLINGER *et al.*, 1999). Tradicionalmente suas raízes e cascas são fervidas e tomadas em forma de chá (WILLIAMS, 2001).

O grande número de informações etnobotânicas do uso desta espécie estimulou a partir dos anos 80 a realização de ensaios a fim de se investigar cientificamente algumas de suas propriedades biológicas.

A *Uncaria tomentosa* revela diversas classes de metabólitos secundários bioativos, incluindo alcalóides oxindólicos tetracíclicos e pentacíclicos, triterpenos, glicosídeos, flavonóides e procianidinas (LAUS *et al.*, 1997; KEPLINGER *et al.*, 1999).

Os alcalóides pentacíclicos são considerados os marcadores bioquímicos da *Uncaria tomentosa* e são responsáveis, pelo menos em parte, pela ação imunomoduladora desta planta (MUHAMMAD *et al.*, 2001; WILLIAMS, 2001).

Estudos com extratos aquosos e etanólicos, sendo alguns comercializados e também com alcalóides isolados das cascas e raízes da *Uncaria tomentosa* demonstraram atividade antiinflamatória (AQUINO *et al.*, 1991; SANDOVAL-CHACÓN *et al.*, 1998; AGUILAR *et al.*, 2002; MUR *et al.*, 2002), antioxidante (RIZZI *et al.*, 1993; SHENG *et al.*, 2000a; SANDOVAL *et al.*, 2000), antiviral (AQUINO *et al.*, 1989) e antiproliferativa para algumas linhagens de células tumorais (SHENG *et al.*, 1998; RIVA *et al.*, 2001).

O extrato da *Uncaria tomentosa*, na concentração de até 100mg/mL, não mostrou efeitos citotóxicos *in vitro*, quando incubado com células ovarianas de hamster (SANTA-MARIA *et al.*, 1997). Não foram registrados sinais de toxicidade aguda (8g/Kg)

ou crônica (1g/Kg/28 dias) em ratos com a administração de *Uncaria tomentosa*, sendo observados parâmetros hematológicos, peso corporal, análise microscópica dos rins, fígado, adrenais, coração e baço (KEPLINGER *et al.*, 1999; SHENG *et al.*, 2000a)

A *Uncaria tomentosa* é considerada uma planta adaptógena, ou seja, tem a capacidade de estimular o sistema imunológico, aumentando a resistência a doenças quando o organismo estiver imunossuprimido devido ao estresse desnutrição ou sob efeito de alguma medicação (PAULSEN, 1998).

Neste contexto, e em particular interesse, ensaios propuseram alguns mecanismos imunomodulatórios.

Ensaio *in vitro*, utilizando alcalóide isolado, demonstraram aumento da fagocitose por granulócitos (WAGNER *et al.*, 1985); proliferação de linfócitos utilizando-se o sobrenadante da cultura de células endoteliais tratadas, sugerindo um efeito indireto sobre a linfoproliferação, provavelmente devido a presença de fatores mitogênicos no sobrenadante (WURM *et al.*, 1998). Foi relatado também um aumento da liberação de IL-1 e IL-6 por macrófagos alveolares de ratos estimulados com 2 tipos de extratos comercializados no Peru (0,025-0,1mg/mL) na presença e ausência de LPS (LEMAIRE *et al.*, 1999).

Experimentos realizados *in vivo*, utilizando 40 e 80mg/kg do extrato comercial, demonstraram leucocitose em ratos saudáveis (SHENG *et al.*, 2000a) e também a leucopenia induzida pelo antineoplásico doxorubicina foi revertida com a administração posterior da *Uncaria tomentosa* (SHENG *et al.*, 2000b).

Estudos clínicos realizados, utilizando 20mg/dia do extrato de *Uncaria tomentosa* durante 2 à 5 meses, em pacientes portadores do HIV, não recebendo nenhuma outra terapia demonstraram um aumento do número total linfócitos periféricos, sem alterações significativas na proporção TCD4⁺ e TCD8⁺ (KEPLINGER *et al.*, 1999). Voluntários saudáveis recebendo 350mg/dia do extrato durante 9 semanas apresentaram leucocitose e nenhum dos seguintes efeitos colaterais foram relatados – perda de peso, diarreia, constipação, dores de cabeça, náuseas, vômitos, rash, edema e dores (SHENG *et al.*, 2000a).

A avaliação da atividade terapêutica de princípios ativos isolados das plantas pode levar a exclusão de outros ativos com relevante potencial. Isto pode ocorrer quando o efeito não é causado por um simples composto, mas sim, por uma combinação de vários outros, atuando de modo sinérgico – fitocomplexo (RATES, 2000). Além do que o uso do extrato bruto se aproxima mais do uso tradicional relatado pelos povos (KEPLINGER *et al.*, 1999).

Diante dos relatos do uso desta planta na medicina popular e dos estudos sugerindo uma atividade imunomoduladora, nos propomos a estudar os efeitos do extrato da *Uncaria tomentosa* na resposta hematopoética em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*.

MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO POR *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* (LM) é um bacilo Gram positivo, de replicação intracelular (NORTH *et al.*, 1997). Tornou-se um dos mais importantes patógenos veiculados por alimentos na década de 80, devido a eclosão de diversos surtos de listeriose (SCHLECH, 1996). Os indivíduos com risco potencial de infecção são gestantes, recém-nascidos, idosos e imunossuprimidos (MCLAUCHLIN, 1996).

A listeriose tem sido o modelo experimental de infecção mais utilizado em camundongos para identificar e estudar os mecanismos envolvidos na defesa antimicrobiana não humoral. 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 (MACKANESS, 1962; MACKANESS, 1964; MIKI e MACKANESS, 1964; MACKANESS, 1969; KAUFMANN, 1995; UNANUE, 1997a; COSSART e BIERNE, 2001), além de não produzir risco potencial para o manipulador (CZUPRYNSKI e HAAK-FRENDSCHO, 1997).

Ao entrar em contato com o organismo, a bactéria deixa rapidamente a corrente sanguínea, alojando-se preferencialmente em células hepáticas e macrófagos (CZUPRYNSKI e HAAK-FRENDSCHO, 1997; MOCCI *et al.*, 1997; GULERIA e

POLLARD, 2001). Após ser fagocitada, a LM produz uma listeriolisina O (LLO), que rompe o fagossoma da célula, permitindo sua saída para o citoplasma, onde ocorre a replicação e consequente migração para a célula adjacente, dando início a sua disseminação (BEUCHAT, 1996; MILON, 1997; COSSART e BIERNE, 2001; NOMURA *et al.*, 2002).

O primeiro componente envolvido na resistência à LM é o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção, promovendo a lise de células infectadas abortando o espalhamento célula-célula da LM no fígado (CONLAN e NORTH, 1994; EDELSON e UNANUE, 2000). A destruição destes hepatócitos infectados serve para garantir a exposição da LM para o compartimento extracelular e assim, torna-se susceptível para o ataque dos próprios neutrófilos e macrófagos (UNANUE, 1997b; MOCCI *et al.*, 1997).

Os macrófagos residentes e outras células infectadas liberam GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-12 e TNF α (UNANUE, 1997c; KUHN e GOEBEL, 1997). Estas duas últimas citocinas atuam sinergicamente estimulando a liberação de IFN γ pelas células NK. O IFN γ promove a ativação dos macrófagos, tornando-os listericidas, através da síntese de óxido nítrico (NO) (CZUPRYNSKI e HAAK-FRENDSCHO, 1997).

A destruição da LM pelos macrófagos resulta na apresentação de antígenos às células T, através do complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC classe II), aumentando a atividade antimicrobiana, e promovendo eventualmente a imunidade de extermínio (JENSEN *et al.*, 1997; BOUWER *et al.*, 1997; PAMER *et al.*, 1997; FLESCHE *et al.*, 1998; RESCIGNO *et al.*, 1999).

As células TCD8⁺ (linfócitos T citotóxicos) lisam estas células infectadas, liberando a bactéria para o ambiente extracelular, favorecendo a fagocitose desta. As TCD8⁺ são citolíticas e exercem esta função através de enzimas – perforina e granzima – liberadas contra a célula alvo (EDELSON e UNANUE, 2000). Exercem também um mecanismo de interação com a proteína Fas-ligante com Fas (APO1 ou CD95), na célula alvo, induzindo apoptose destas (KAGI *et al.*, 1996).

A resposta das células TCD4⁺ é do tipo Th1, induzida pelo IFN γ liberado pelas células NK e também pela IL-12 (SONG *et al.*, 1995; UNANUE, 1997c; GULERIA e POLLARD, 2001). As células Th1 sintetizam mais IFN γ , amplificando a resposta dos

macrófagos, IL-2, TNF α , GM-CSF e moléculas de adesão como integrinas, selectinas, VCAM-1 e I-CAMI (NORTH *et al.*, 1997; MIELKE *et al.*, 1997; KAUFMANN *et al.*, 1997).

O sucesso para resolução da listeriose requer a participação dos mecanismos de imunidade celular inata e adquirida, envolvendo neutrófilos, macrófagos, células NK, linfócitos T e uma grande seleção de citocinas (HARTY *et al.*, 1996; JENSEN *et al.*, 1997).

Na fase inicial da infecção, a migração de fagócitos da medula óssea para o sítio da replicação da bactéria é crucial para a sobrevivência do animal, limitando a multiplicação bacteriana (WING *et al.*, 1985).

Os neutrófilos e monócitos/macrófagos são células derivadas dos progenitores pluripotenciais da medula óssea (CFCs – células formadoras de colônias), onde a produção e mobilização destes, depende da presença de fatores de crescimento específicos (CSFs) que regulam sua produção, maturação e função (BURGESS e METCALF, 1980; WING *et al.*, 1984; METCALF, 1986; KAYASHIMA *et al.*, 1993).

A habilidade do tecido hematopoético em produzir e mobilizar fagócitos é um fato crítico para sobrevivência do animal (WING *et al.*, 1984). Uma maneira de avaliar a capacidade proliferativa destas células é através da técnica da cultura clonal em meio semi-sólido que permite avaliar o crescimento e diferenciação destas células hematopoéticas *in vitro*, na presença de fatores estimuladores de colônias específicos (METCALF, 2001). O crescimento destas colônias é um indicador das alterações hematopoéticas que ocorrem durante uma infecção, em particular com uma bactéria intracelular facultativa como a *Listeria monocytogenes* (CHEERS *et al.*, 1988; KAUFMANN, 1995). 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 (ZHAN *et al.*, 1998).



OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos protetores da administração do extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) 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 do EUT frente a uma dose letal da LM
- peso do baço.



***MATERIAL E
MÉTODOS***

1 - ANIMAIS

Para realização dos experimentos foram utilizados camundongos BALB/c machos, com idade entre 6 e 8 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram divididos em grupos, e cada grupo foi submetido ao tratamento de acordo com o protocolo experimental, a saber:

- a) animais controle, sem tratamento;
- b) animais tratados com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100mg/Kg durante 7 dias;
- c) animais infectados com *L. monocytogenes*, recebendo veículo (água);
- d) animais tratados com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100mg/Kg durante 7 dias e infectados com *L. monocytogenes*.

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP), sob protocolo nº 514-1.

2 - *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 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 foi utilizada a dose subletal de 1×10^3 bactérias/animal. Para a avaliação da sobrevivência dos animais foi necessário utilizar uma concentração letal de 4×10^4 bactérias/animal, a qual foi inoculada intraperitonealmente no sétimo dia de tratamento.

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

3 - TRATAMENTO COM O EXTRATO DE *Uncaria tomentosa*

O extrato da *Uncaria tomentosa* (EUT) foi gentilmente fornecido por Galena Química e Farmacêutica Ltda (Campinas-SP, Brasil). O lote da matéria-prima utilizado neste trabalho foi o de número 0200049128 e foi submetido a realização de análises organolépticas, fitoquímicas e microbiológicas para determinação da qualidade e doseamento em 1% de alcalóides totais.

A administração do EUT foi realizada por gavagem nas doses de 10, 50 e 100mg/Kg, utilizando-se água estéril como veículo de administração. O tratamento ocorreu durante 7 dias consecutivos, antes da inoculação com a *Listeria monocytogenes*.

As doses do EUT foram selecionadas com base nos trabalhos da literatura (KEPLINGER *et al.*, 1999; SHENG *et al.*, 2000a; SHENG *et al.*, 2000b).

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 (SCM) seja utilizado em concentrações supermáximas. Além disso, a escolha do soro fetal bovino deve ser feita cuidadosamente devido a 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 (Gibco).

O número de células na suspensão foi contado em câmara hematocitométrica 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 (Gibco). A seguir o baço dos animais foi macerado para obtenção de uma suspensão celular.

O número de células na suspensão foi contado em câmara hematócitométrica 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 100 µL 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 dissecação com aumento de 40x (METCALF, 1984).

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 contendo 10% de soro fetal bovino. Adicionou-se ao meio 5×10^{-5} moles/L de 2-mercaptoetanol e 1,65% $\mu\text{g/mL}$ de “pokeweed mitogen” (Gibco). Incubou-se por 7 dias a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO_2 no ar. Centrifugou-se o sobrenadante e filtrou-se em membranas de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore).

A atividade funcional do SCM 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 supramáxima. Os resultados em duplicata da titulação realizada em cultura de 7 dias, de células da medula óssea de animais normais, estão apresentados na tabela abaixo.

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

DILUIÇÃO SCM	CFU-C x 10^2 *
1:1	109,2 \pm 4,2
1:2	102 \pm 3,5
1:4	105,6 \pm 5,1
1:8	75,6 \pm 4,2
1:16	57,6 \pm 4
1:32	34,8 \pm 3
1:64	7,2 \pm 1,2
1:128	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 4 grupos experimentais, foram obtidos através de punção do plexo cardíaco, sendo separado em “pools”, centrifugado 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 meio condicionado de células esplênicas (SCM) 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.

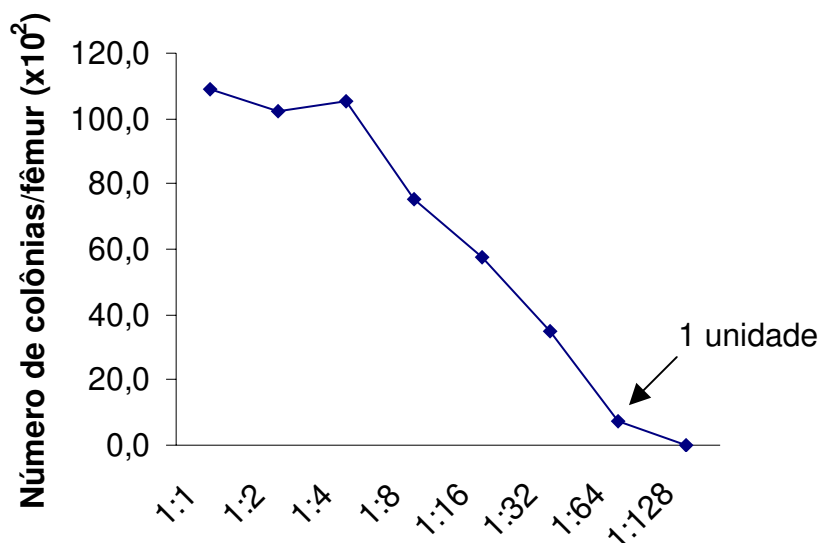


Figura 1 - Curva da capacidade estimuladora do crescimento de colônias expressa em unidades/mL.

7 - REALIZAÇÃO DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

Com o intuito de observar uma possível proteção dos animais tratados com o EUT, realizou-se uma curva de sobrevivência. Foram considerados dois grupos experimentais: animais somente infectados com *Listeria monocytogenes* 4×10^4 bactérias/animal e, animais tratados com EUT nas doses de 10, 50 e 100mg/Kg por 7 dias e infectados 3 horas após, com a mesma concentração de bactéria. Os animais foram observados por um período de 30 dias.

8 - PESO DO BAÇO DOS ANIMAIS SUBMETIDOS AOS REFERIDOS TRATAMENTOS

Após remoção do baço (conforme 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 peso do baço. 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, 1958 (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 DO EUT SOBRE O NÚMERO DE PRECURSORES HEMATOPOÉTICOS PARA GRANULÓCITOS E MACRÓFAGOS DA MEDULA ÓSSEA E DO BAÇO DE CAMUNDONGOS (CFU-C)

1.1 - Medula óssea

Os resultados do pré-tratamento por 7 dias com EUT na atividade hematopoética da medula óssea em animais normais e infectados com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bactérias/animal) estão representados na figura 2; tabela 2, 3, 4 e 5 (apêndice).

O tratamento de animais normais (não infectados) com 100mg/Kg do EUT produziu um aumento no número de CFU-GM medular quando comparado com o grupo controle ($P < 0,001$). A infecção com *Listeria monocytogenes* provocou uma redução no número de CFU-GM que foi observado 48 e 72 horas após a inoculação comparado ao grupo controle ($P < 0,001$). No entanto, quando os animais foram previamente tratados com 50 e 100mg/Kg do EUT e infectados, houve uma prevenção da mielossupressão ($P < 0,01$). A dose de 100mg/Kg do EUT produziu um aumento no número de CFU-GM estatisticamente maior que a dose de 50mg/Kg ($P < 0,001$). A administração de 10mg/Kg do EUT antes da infecção não produziu alterações no número de CFU-GM comparada com o grupo controle e com o somente infectado.

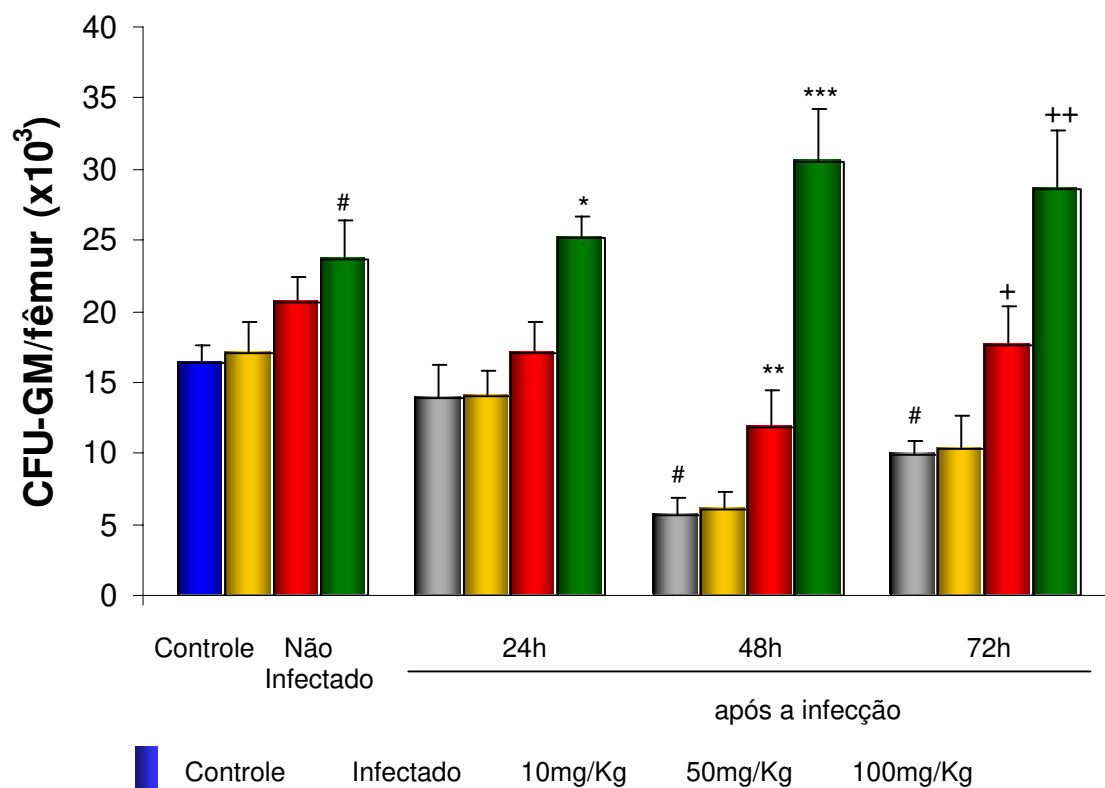


Figura 2 - Efeitos do extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) (10, 50 e 100 mg/Kg/dia) administrados durante 7 dias consecutivos sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^3 i.p. bac/animal). 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 controle; * $P < 0,001$, em relação ao controle, infectado 24 h e infectado 24 h + EUT 50mg/kg; ** $P < 0,01$, em relação ao infectado 48 h; *** $P < 0,001$, em relação ao controle, infectado 48 h e infectado 48 h + EUT 50mg/Kg; + $P < 0,001$, em relação ao infectado 72 h; ++ $P < 0,001$, em relação ao controle, infectado 72 h e infectado 72 h + EUT 50mg/Kg. ANOVA – Teste Tukey.

1.2 - Baço

Os resultados do pré-tratamento por 7 dias com EUT na atividade hematopoética extramedular em animais normais e infectados com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bactérias/animal) estão representados na figura 3; tabelas 6, 7, 8 e 9 (apêndice).

Não observamos qualquer alteração na formação de colônias esplênicas nos animais normais (não infectados) tratados com EUT. Um aumento no número de CFU-GM foi observado, sendo evidente 48 e 72 horas após a infecção ($P < 0,001$). Quando os animais foram pré-tratados com o EUT e inoculados com a bactéria, não observamos atividade hematopoética extramedular, uma vez que o número de CFU-GM não mostrou diferença significativa em relação ao grupo controle não infectado nos três tempos após a infecção.

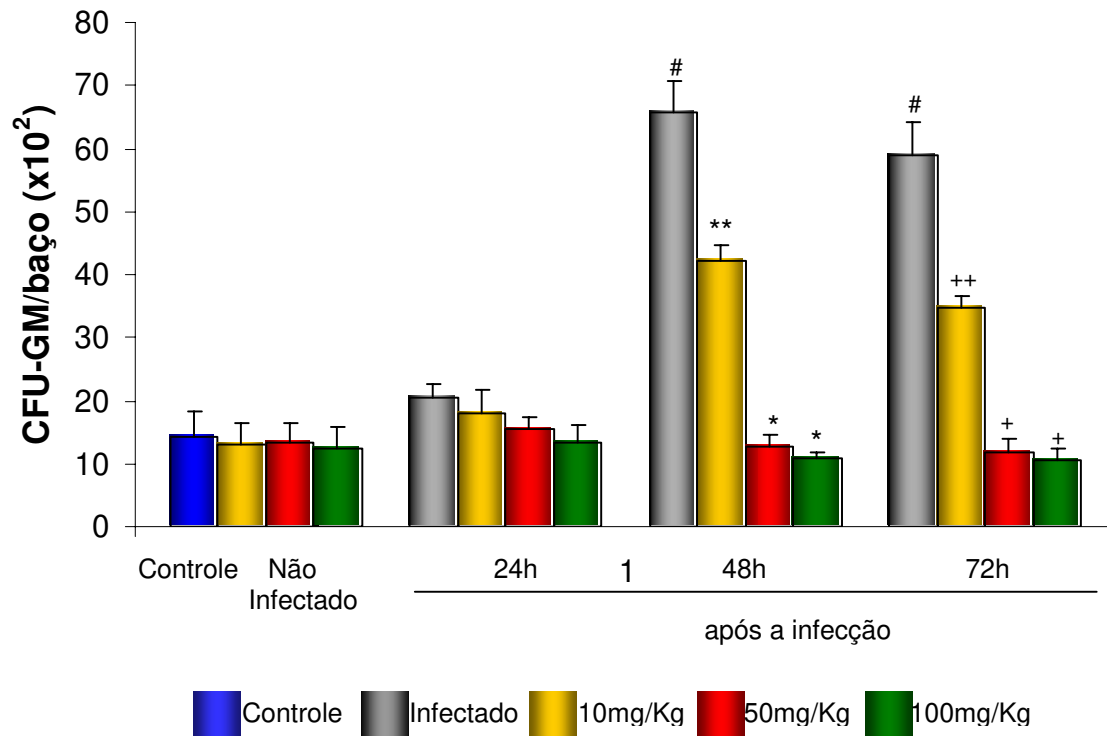


Figura 3 - Efeitos do extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) (10, 50 e 100 mg/Kg/dia) administrados durante 7 dias consecutivos sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^3 i.p. bac/animal). 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 controle; ^{*} $P < 0,001$, em relação ao infectado 48h; ^{**} $P < 0,001$, em relação ao controle e infectado 48h; ⁺ $P < 0,001$, em relação ao infectado 72h; ⁺⁺ $P < 0,001$, em relação ao controle e infectado 72h. ANOVA – Teste Tukey.

2 - EFEITOS DO EUT SOBRE A PRODUÇÃO DE FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS (CSFS)

Os resultados do pré-tratamento por 7 dias com EUT sobre a produção de fatores estimuladores de colônias no soro de animais normais e infectados com uma dose subletal de *Listeria monocitogenes* (1×10^3 bactérias/animal) estão representados na figura 4; tabelas 10, 11, 12 e 13 (apêndice).

Nos animais normais (não infectados) tratados com 50 e 100mg/kg do EUT observamos um aumento nos níveis séricos de CSFs ($P < 0,01$). A presença da infecção produziu um aumento agudo nos níveis séricos de CSFs nos três períodos estudados ($P < 0,001$). O pré-tratamento com 50 e 100mg/Kg de EUT potencializou a produção de CSFs, pois essa foi maior em relação aos animais apenas infectados ($P < 0,001$). Os resultados obtidos com a dose de 100mg/Kg do EUT foram estatisticamente maior do que os obtidos com 50mg/Kg, sugerindo uma resposta dose-dependente ($P < 0,001$). A administração de 10mg/Kg do EUT não produziu alteração nos níveis de CSFs comparada com o grupo controle e com o somente infectado.

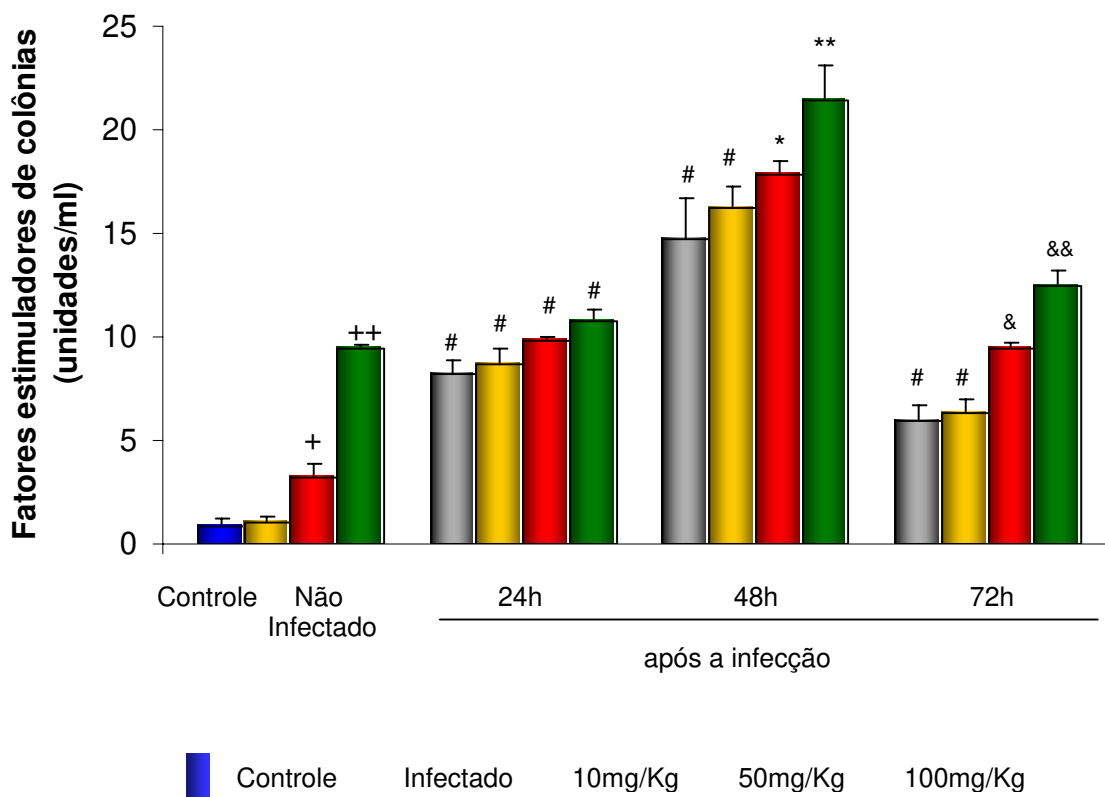


Figura 4 - Efeitos do extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) (10, 50 e 100 mg/Kg/dia) administrados durante 7 dias consecutivos sobre a produção de fatores estimuladores de colônias no soro de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bac/animal). Os animais foram sacrificados 24, 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. $^+P < 0,01$, em relação ao controle; $^{++}P < 0,001$, em relação ao controle e EUT 50mg/Kg; $^{\#}P < 0,001$, em relação ao controle; $^*P < 0,001$, em relação ao controle e infectado 48 h; $^{**}P < 0,001$, em relação ao controle, infectado 48 h e infectado 48 h + EUT 50mg/kg; $^{\&}P < 0,001$, em relação ao controle e infectado 72 h; $^{\&\&}P < 0,001$ em relação ao controle, infectado 72 h e infectado 72 h + EUT 50mg/kg. ANOVA – Teste Tukey.

3 - EFEITOS DO EUT SOBRE O PESO DO BAÇO DOS ANIMAIS

Os resultados do pré-tratamento por 7 dias com EUT sobre o peso do baço de animais normais e infectados com uma dose subletal de *Listeria monocitogenes* (1×10^3 bactérias/animal) estão representados na figura 5; tabelas 14, 15, 16 e 17 (apêndice).

O peso do baço dos animais apenas tratados com o EUT não apresentou diferença significativa em relação ao controle. Nos grupos infectados, observamos um aumento deste órgão, sendo mais evidente nas 48 e 72 horas após a infecção ($P < 0,001$). Quando os animais foram previamente tratados com 50 e 100mg/Kg do EUT, a esplenomegalia foi prevenida, sendo que os valores permaneceram similares aos do grupo controle.

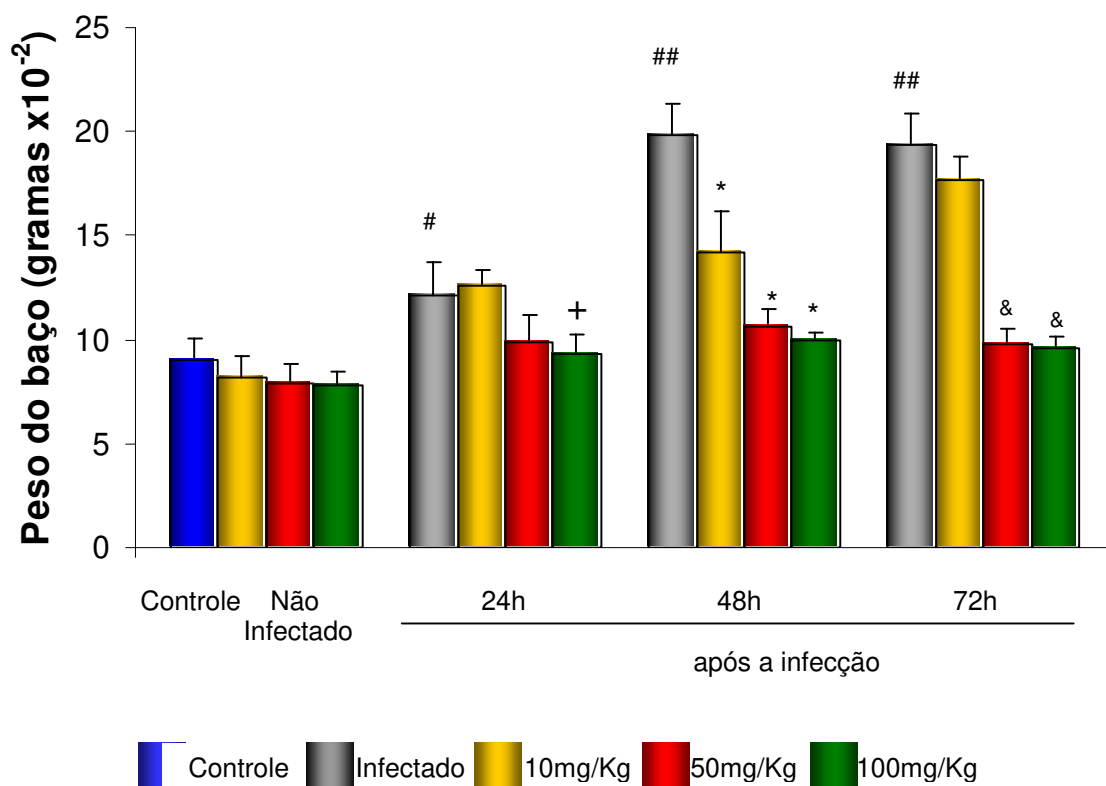


Figura 5 - Efeitos do extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) (10, 50 e 100 mg/Kg/dia) administrados durante 7 dias consecutivos sobre o peso do baço de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bac/animal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72h após a infecção. O grupo controle recebeu água. Os dados representam a média \pm desvio padrão obtidos de 6 animais por grupo. # $P < 0,01$, em relação ao controle; ## $P < 0,001$, em relação ao controle; + $P < 0,01$, em relação ao infectado 24 h; * $P < 0,001$, em relação ao infectado 48h; & $P < 0,001$, em relação ao infectado 72h. ANOVA – Teste Tukey.

4 - EFEITOS DO EUT NA SOBREVIDA DE ANIMAIS INFECTADOS COM UMA DOSE LETAL DE *Listeria monocytogenes*

Os resultados obtidos na avaliação da eficácia do EUT na sobrevida de animais infectados com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* (2×10^5 bactérias/animal) estão representados na figura 6; tabela 18 (apêndice).

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 as doses de 50 e 100mg/Kg do EUT aumentou a resistência dos animais à *Listeria monocytogenes*, resultando em aproximadamente 15 e 35% de sobrevida, respectivamente ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre as doses de 50 e 100mg/Kg do EUT. A dose de 10mg/Kg do EUT não demonstrou proteção do animal.

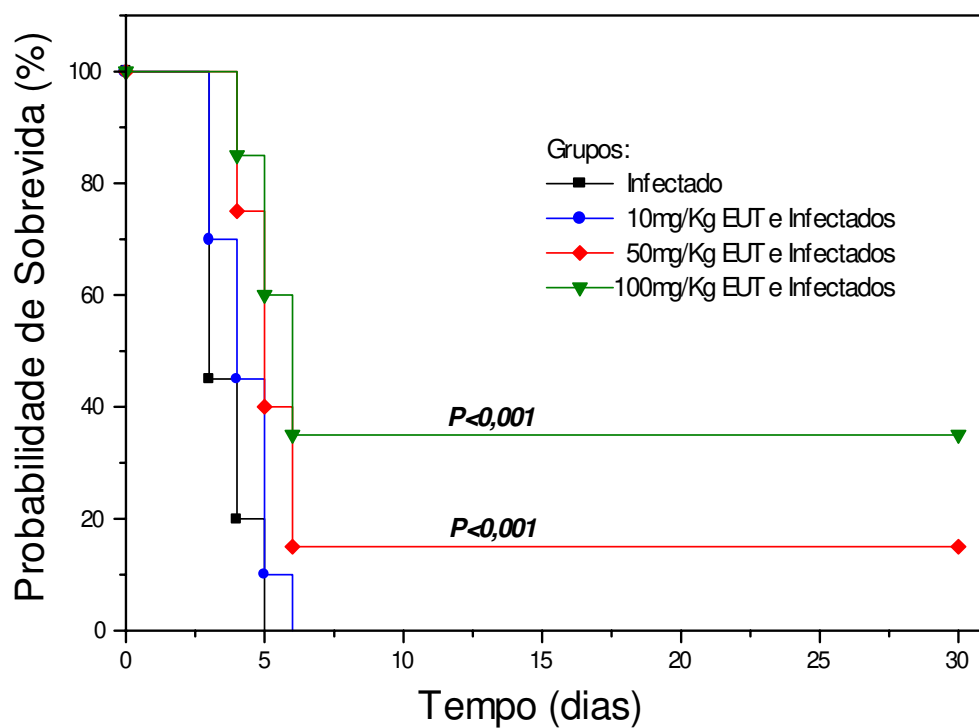


Figura 6 - Efeitos do extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) (10, 50 e 100 mg/Kg/dia) administrados durante 7 dias consecutivos na sobrevivência de animais infectados com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* (2×10^5 bac/animal). $P < 0,001$, para as doses de 50 e 100mg/Kg em relação ao grupo somente infectado (tratado com água estéril). $n = 20$, Curva de Kaplan-Maier, Teste Log-Rank.



DISCUSSÃO

A necessidade de desenvolver terapias mais efetivas, induziu um grande número de investigadores a explorar novas fontes de compostos farmacologicamente ativos. Plantas com propriedades imunomoduladoras desempenham um papel importante nestas pesquisas, uma vez que, são capazes de aumentar os mecanismos de resposta imunológica do hospedeiro proporcionando proteção contra infecções oportunistas, freqüentes em pacientes imunossuprimidos, como transplantados, em tratamento com drogas imunossupressoras, quimioterapia e AIDS (PAULSEN, 1998; SHENG, 2000b; MASIHI, 2000).

Os granulócitos e macrófagos são vitais para a defesa contra infecções bacterianas (CHEERS *et al.*, 1988). Vários trabalhos tem demonstrado que na listeriose, a habilidade dos tecidos hematopoéticos em produzir e mobilizar fagócitos para o sítio da infecção é de central importância na resposta imunológica primária e consequentemente na sobrevivência do animal (WING *et al.*, 1985; CHEERS *et al.*, 1988; KAYASHIMA *et al.*, 1993; ZHAN *et al.*, 1998). Durante esta fase, antes da imunidade específica, esses fagócitos infiltram os tecidos infectados limitando a multiplicação bacteriana (WING *et al.*, 1984).

Em nosso laboratório, diversos trabalhos definiram a listeriose como um fácil e eficaz modelo para o estudo de diversos tipos de compostos naturais, nos vários componentes da resposta imunológica do hospedeiro envolvidos na defesa contra a *Listeria monocytogenes*, com ênfase na habilidade de tecido hematopoético de produzir e mobilizar fagócitos (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).

Já está bem documentado na literatura que, durante a fase inicial da infecção com *Listeria monocytogenes* ocorre uma redução no número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea relacionada com uma massiva migração destas células para o baço, com esplenomegalia, e também um elevado nível de fatores estimuladores de colônias no soro (CSFs) é encontrado (WING *et al.*, 1984; WING *et al.*, 1985; CHEERS *et al.*, 1988; CHEERS e STANLEY, 1988).

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 contra bactérias intracelulares (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 bacteriana no fígado e baço aproximam-se de zero [WING *et al.*, 1984; 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 observamos, com a administração de uma dose subletal de 1×10^3 *Listeria monocytogenes* por animal, uma significativa redução do número de CFU-GM da medula óssea, com aumento no baço em 48 e 72 horas após a infecção, e, um aumento agudo na concentração de CSFs 24, 48 e 72 horas após a infecção. A administração de 50 e 100mg/Kg do extrato da *Uncaria tomentosa* (EUT) durante 7 dias antes da inoculação da bactéria, não só preveniu a redução do número de CFU-GM da medula óssea com a dose de 50mg/Kg, como elevou os índices acima aos dos animais controles não infectados, com a dose de 100mg/Kg. A hematopoese extramedular também foi prevenida, sendo que, os números de CFU-GM permaneceram nos patamares dos animais controles (não-infectados). A potencialização da atividade estimuladora de colônias, relacionada ao pré-tratamento com EUT, foi observada nos 3 tempos após a infecção. Além disso, os animais apenas tratados com EUT demonstraram aumento significativo do número de CFU-GM na medula óssea (100mg/Kg) e dos CSFs no soro (50 e 100mg/Kg). Esses resultados foram consistentes com o efeito protetor do EUT observado através de um experimento de sobrevida em animais infectados com uma dose letal de 4×10^4 *Listeria monocytogenes* por animal, onde as doses de 50 e 100mg/Kg resultaram respectivamente em 15 e 35% de sobrevida. Os resultados observados com a dose de 100mg/Kg foram estatisticamente mais acentuados do que com 50mg/Kg do EUT, sugerindo uma resposta dose dependente do EUT.

O preciso mecanismo pelo qual a *Uncaria tomentosa* aumenta a taxa de sobrevida dos animais infectados com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* não está totalmente elucidado, mas nós especulamos que em parte, é devido ao aumento no número

de CFU-GM na medula óssea, uma vez que, existem evidências que altos números destes precursores neste órgão favoreça a sobrevivência dos animais após a inoculação bacteriana (WING *et al.*, 1984; CHEERS *et al.*, 1988; CHEERS e STANLEY, 1988). O camundongo C57BL é geneticamente resistente à *Listeria monocitogenes* e contém pelo menos o dobro de CFU-GM na medula óssea que o Balb/c, antes e depois da infecção. A resposta inflamatória nesta infecção é o influxo de fagócitos para o sítio da infecção, sendo que isto ocorre precocemente no C57BL em consequência do alto número de precursores hematopoéticos na medula e baço desta linhagem resistente (CHEERS *et al.*, 1978; CHEERS e MCKENZIE, 1978; YOUNG e CHEERS, 1986; WOOD *et al.*, 1986). Além do que, a dose letal de *Listeria monocitogenes* no Balb/c é 100 vezes menor que no C57BL/10 (CHEERS *et al.*, 1988).

A produção adicional de CSFs no soro de animais pré-tratados com EUT, em comparação ao grupo somente infectado pode estar contribuindo para a produção e migração dos neutrófilos e macrófagos durante a infecção. Sheng *et al.* (2000), demonstraram que o tratamento com a *Uncaria tomentosa* recuperou todas as frações de células brancas sanguíneas de maneira proporcional quando a doxorubicina foi utilizada para induzir leucopenia em ratos. Esse antineoplásico é tóxico para as células precursoras hematopoéticas e causa depressão imediata e prolongada da medula óssea. Assim, o autor sugere que esta planta pode ter um efeito direto na mielopoese através da estimulação da produção de citocinas endógenas (SHENG *et al.*, 2000b). Outros trabalhos sustentam esta teoria, uma vez que a *Uncaria tomentosa* induz células endoteliais humanas a secretarem um fator estimulador da proliferação de linfócitos (WURM *et al.*, 1998) e estimula a liberação de interleucina-1 (IL-1) e IL-6 por macrófagos alveolares murinos (LEMAIRE *et al.*, 1999). A IL-1 é uma citocina importante que favorece a quimioatração de neutrófilos para o fígado, além de atuar sinergicamente com a IL-12 aumentando a produção de IFN γ , essencial para ativação dos macrófagos (UNANUE, 1997b; UTHAISANGSOOK, 2002). A IL-6 auxilia na produção de colônias de granulócitos e manutenção da viabilidade dos neutrófilos maduros (MOCCI *et al.*, 1997; HARTY *et al.*, 1996).

Nós podemos concluir que com os resultados promissores obtidos neste trabalho sobre a resposta hematopoética, a *Uncaria tomentosa* possa estar compartilhando estes mecanismos levando a liberação de citocinas biologicamente ativas e isto pode ser responsável pelo aumento da reserva de CFU-GM na medula óssea favorecendo a resposta à infecção.

Visto que, a *Uncaria tomentosa* não somente preveniu a mielossupressão induzida pela infecção, mas também, aumentou a resposta hematopoética em animais normais, nós podemos sugerir que a administração do seu extrato pode ser útil como adjuvante na profilaxia de infecções oportunistas e redução dos efeitos colaterais provocados por terapias imunossupressoras.



CONCLUSÃO

O presente estudo sobre os efeitos do extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT), demonstrou:

- Aumento do número de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea, prevenindo a mielossupressão causada pela infecção
 - Prevenção da hematopoese extramedular nos animais infectados
 - Aumento na atividade estimuladora de colônias no soro em animais normais e infectados
- Aumento na sobrevida de animais infectados



***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- AGUILAR, J.L.; ROJAS, P.; MARCELO, A.; PLAZA, A.; BAUER, R.; REININGER, E.; KLAAS, C.A.; MERFORT, I. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 81: 271-76, 2002.
- AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; CONTI, C.; STEIN, M.L. Plant metabolites: structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. **Journal of Natural Products**, 52(4): 679-85, 1989.
- AQUINO, R.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; CIRINO, G. Plant metabolites: new compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. **Journal of Natural Products**, 54(2): 453-9, 1991.
- BEUCHAT, L.R. *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. **Food Control**, 7(4/5): 223-8, 1996.
- BINCOLETTO, C.; QUEIROZ, M.L.S. The effect of lead on the bone marrow stem cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Veterinary and Human Toxicology**, 38: 186-90, 1996.
- BOUWER, H.G.A.; BARRY, R.A.; HINRICHS, D.J. Acquired immunity to an intracellular pathogen: immunologic recognition of *Listeria monocytogenes*-infected cells. **Immunological Reviews**, 158: 137-46, 1997.
- BURGESS, A.W.; METCALF, D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. **Blood**, 56(6): 947-58, 1980.
- CHEERS, C.; MCKENZIE, I.F.C. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: genetics of listeriosis. **Infection and Immunity**, 19(3): 755-62, 1978.
- CHEERS, C.; STANLEY, E.R. Macrophage production during murine listeriosis: colony-stimulating factor 1 (CSF-1) and CSF-1-binding cells in genetically resistant and susceptible mice. **Infection and Immunity**, 56(11): 2972-78, 1988.
- CHEERS, C.; HAIGH, A.M.; KELSO, A.; METCALF, D.; STANLEY, E.R.; YOUNG, A.M. Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage-, and multi-CSFs. **Infection and Immunity**, 56(1): 247-51, 1988.

CHEERS, C.; McKENZIE, I.F.C.; PAVLOV, H.; WAID, C.; YORK, J. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: course of listeriosis in resistant or susceptible mice. **Infection and Immunity**, 19(3): 763-70, 1978.

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

CONLAN, J.W.; NORTH, R.J. Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. **Journal of Experimental Medicine**, 179: 259-68, 1994.

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

CZUPRYNSKI, C.J.; HAAK-FRENDSCHO, M. Non-specific resistance mechanisms to listeriosis: implications for experimental and naturally occurring infection. **Immunological Reviews**, 158: 47-56, 1997.

DANTAS, C.M.; QUEIROZ, M.L.S. Effects of *Chlorella vulgaris* on bone marrow progenitor cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Immunopharmacology**, 21: 499-508, 1999.

DANTAS, D.C.M.; KANENO, R.; QUEIROZ, M.L.S. The effect of *Chlorella vulgaris* in the protection of mice infected with *Listeria monocytogenes*. Role of natural killer cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 21(3): 609-19, 1999.

EDELSON, B.T.; UNANUE, E.R. Immunity to *Listeria* infection. **Current Opinion in Immunology**, 12: 425-31, 2000.

FLESCHE, I.E.A.; COLLINS, H.; HESS, J.; KAUFMANN, S.H.E. Checkpoints in antibacterial immunity. **Research in Immunology**, 149: 693-97, 1998.

GRAHAM, J.G.; QUINN, M.L.; FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacology**, 73: 347-77, 2000.

GRAVES, A.H. Breve resumo histórico do uso das plantas na medicina. **Revista da Flora Medicinal**, 12(2): 43-65, 1945.

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

HARTY, J.T.; LENZ, L.L.; BEVAN, M.J. Primary and secondary immune responses to *Listeria monocytogenes*. **Current Opinion in Immunology**, 8: 526-30, 1996.

JENSEN, E.R.; SHEN, H.; WETTSTEIN, F.O.; AHMED, R.; MILLER, J.F. Recombinant *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vehicle and a probe for studying cell-mediated immunity. **Immunological Reviews**, 158: 147-57, 1997.

JIN, Y.; DONS, L.; KRISTENSSON, K.; ROTTENBERG, M.E. Colony-stimulating factor 1-dependent cells protect mice against systemic infection with *Listeria monocytogenes* but facilitate neuroinvasion. **Infection and Immunity**, 70(8): 4682-86, 2002.

KAGI, D.; LEDERMANN, B.; BURKI, K.; ZINKERNAGEL, R.M.; HENGARTNER, H. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. **Annual Reviews of Immunology**, 14: 207-32, 1996.

KAUFMANN, S.H.E.; EMOTO, M.; SZALAY, G.; BARSIG, J.; FLESCHE, I.E.A. Interleukin-4 and listeriosis. **Immunological Reviews**, 158: 95-105, 1997.

KAUFMANN, S.H.E. Immunity to intracellular microbial pathogens. **Immunology Today**, 16(7): 338-42, 1995.

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**, 80: 471-6, 1993.

KEPLINGER, K.; LAUS, G.; WURM, M.; DIERICH, M.P.; TEPPNER, H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. – ethnomedicinal use and ethnopharmacological, toxicological and botanical results. **Journal of Ethnopharmacology**, 64: 23-34, 1999.

KUHN, M.; GOEBEL, W. Responses by murine macrophages infected with *Listeria monocytogenes* crucial for the development of immunity to this pathogen. **Immunological Reviews**, 158: 57-67, 1997.

LAUS, G.; BRÖSSNER, D.; KEPLINGER, K. Alkaloids of peruvian *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry**, 45(4): 855-60, 1997.

LEMAIRE, I.; ASSINEWE, V.; CANO, P.; AWANG, D.V.; ARNASON, J.T. Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (Una de Gato). **Journal of Ethnopharmacology**, 64(2):109-15, 1999.

MACKANESS, G.B. Cellular resistance to infection. **Journal of Experimental Medicine**, 116: 381-407, 1962.

MACKANESS, G.B. The immunological basis of acquired cellular resistance. **Journal of Experimental Medicine**, 120: 105-20, 1964.

MACKANESS, G.B. The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, 129: 973-92, 1969.

MASIHI, K.N. Immunomodulators in infectious diseases: panoply of possibilites. **International Journal of Immunopharmacology**, 22: 1083-91, 2000.

MCLAUCHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. **Food Control**, 7(4/5), 187-93, 1996.

MELO, A.; JUSTO, G.Z.; QUEIROZ, M.L.S. Stimulation of myelopoiesis in *Listeria monocytogenes*-infected mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **Human & Experimental Toxicology**, 20: 38-45, 2001.

METCALF, D. Hematopoietic stem cells: old and new. **Biomed Pharmacother**, 55: 75-8, 2001.

METCALF, D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. **Blood**, 67(2): 257-67, 1986.

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

MIELKE, M.E.A.; PETERS, C.; HAHN, H. Cytokines in the induction and expression of T-cell-mediated granuloma formation and protection in the murine model of listeriosis. **Immunological Reviews**, 158: 79-93, 1997.

MIKI, K.; MACKANESS, G.B. The passive transfer of acquired resistance to *Listeria monocytogenes*. **Journal of Experimental Medicine**, 120: 93-103, 1964.

MILON, G. *Listeria monocytogenes* in laboratory mice: a model of short-term infectious and pathogenic processes controllable by regulated protective immune responses. **Immunological Reviews**, 158: 37-46, 1997.

MOCCI, S.; DALRYMPLE, S.A.; NISHINAKAMURA, R.; MURRAY, R. The cytokine stew and innate resistance to *Listeria monocytogenes*. **Immunological Reviews**, 158: 107-14, 1997.

MUHAMMAD, I.; DUNBAR, D.C.; KHAN, R.A.; GANZERA, M.; KHAN, I.A. Investigation of Una de Gato I.7-deoxyloganic acid and ¹⁵N NMR spectroscopic studies on pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry**, 57: 781-5, 2001.

MUR, E.; HARTIG, F.; EIBL, G.; SCHIRMER, M. Randomized double blind trial of an extract from the pentacyclic alkaloid-chemotype of *Uncaria tomentosa* for treatment of rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, 29(4): 678-81, 2002.

NOMURA, T.; KAWAMURA, I.; ISUCHIYA, K.; KOHDA, C.; BABA, H.; ITO, Y.; KIMOTO, T.; WATANABE, I.; MITUSYAMA, M. 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**. 70(3): 1049-55, 2002.

NORTH, R.J.; DUNN, P.L.; CONLAN, J.W. Murine listeriosis as a model of antimicrobial defense. **Immunological Reviews**, 158: 27-36, 1997.

PAMER, E.G.; SIJTS, A.J.A.M.; VILLANUEVA, M.S.; BUSCH, D.H.; VIJH, S. MHC class I antigen processing of *Listeria monocytogenes* proteins: implications for dominant and subdominant CTL responses. **Immunological Reviews**, 158: 129-36, 1997.

PAULSEN, S.M. Use of herbal products and dietary supplements by oncology patients. **Highlights in Oncology Practice**, 15(4): 94-106, 1998.

QUADROS, M.R.; SOUZA BRITO, A.R.M.; QUEIROZ, M.L.S. *Petiveria Alliacea* L. extract protects mice against *Listeria monocytogenes* infection – effects on bone marrow progenitor cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 21(1): 109-24, 1999.

QUEIROZ, M.L.S.; JUSTO, G.Z.; PEREIRA-DA-SILVA, F.R.R.; MULLER, A.H.; GUILHON, G.M.S.P. Stimulatory action of *Pluchea quitoc* extract on the hematopoietic response during murine listeriosis. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 22(4): 721-40, 2000a.

QUEIROZ, M.L.S.; JUSTO, G.Z.; VALADARES, M.C.; PEREIRA-DA-SILVA, F.R.R. Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 23(3): 367-82, 2001.

QUEIROZ, M.L.S.; QUADROS, M.R.; SANTOS, L.M.B. Cytokine profile and natural killer cell activity in *Listeria monocytogenes* infected mice treated orally with *Petiveria alliacea* extract. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 22(3): 501-18, 2000b.

QUEIROZ, M.L.S.; RODRIGUES, A.P.O.; BINCOLETTTO, C.; FIGUEIREDO, C.A.V.; MALACRIDA, S. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Internacional Immunopharmacology**, 3: 889-900, 2003.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. 39: 603-13, 2001.

RESCIGNO, M.; GRANUCCI, F.; CITTERIO, S.; FOTI, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. **Immunology Today**, 20(5): 200-03, 1999.

RIVA, L.; CORADINI, D.; Di FRONZO, G.; DE FEO, V.; TOMMASI, N.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C. The antiproliferative effects of *Uncaria tomentosa* extracts and fractions on the growth of breast cancer cell line. **Anticancer Research**, 21: 2457-62, 2001.

RIZZI, R.; RE, F.; BIANCHI, A.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; BIANCHI, L.; STIVALA, L.A. Mutagenic and antimutagenic activities of *Uncaria tomentosa* and its extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, 38(1): 63-77, 1993.

SANDOVAL, M.; CHARBONNET, R.M.; OKUHAMA, N.N.; ROBERTS, J.; KRENOVA, Z.; TRENTACOSTI, A.M.; MILLER, M.J.S. Cat's claw inhibits TNF α production and scavenges free radicals: role in ctoprotection. **Free Radical Biology & Medicine**, 29(1): 71-8, 2000.

SANDOVAL-CHACÓN, M.; THOMPSON, J.H.; ZHANG, X.T.; LIU, X.; MANNICK, E.E.; SADOWSKA-KROWICKA, H.; CHARBONNET, R.M.; CLARK, D.A.; MILLER, M.J.S. Antiinflamatory actions of cat's claw: the role of NF-[kappa]B. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, 12(12): 1279-89, 1998.

SANTA MARIA, A.; LOPEZ, A.; DIAZ, M.M.; ALBÁN, J.; GALÁN-DE-MERA, A.; VICENTE ORELLANA, J.A.; POZUELO, J.M. Evaluation of the toxicity of *Uncaria tomentosa* by bioassays *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, 57: 183-7, 1997.

SCHLECH, W.F. Overview of listeriosis. **Food Control**, 7(4/5): 183-6, 1996.

SHENG, Y.; BRYNGELSSON, C.; PERO, R.W. Enhance DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-Med-100TM, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, 69: 115-26, 2000a.

SHENG, Y.; PERO, R.W.; AMIRI, A.; BRYNGELSSON, C. Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*. **Anticancer Research**, 18(5A): 3363-68, 1998.

SHENG, Y.; PERO, R.W.; WAGNER H. Treatment of chemotherapy-induced leukopenia in a rat model with aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Phytomedicine**, 7(2): 137-43, 2000b.

SONG, F.; MATSUZAKI, G.; MITSUYAMA, M.; NOMOTO, K. In vitro generation of IFN γ -producing *Listeria* specific T cells in dependent on IFN γ production by non-NK cells. **Cellular Immunology**, 160: 211-16, 1995.

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

UNANUE, E.R. Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and T-cell response. **Immunological Reviews**, 158: 11-25, 1997c.

UNANUE, E.R. Why listeriosis? A perspective on cellular immunity to infection. **Immunological Reviews**, 158: 5-9, 1997a.

UTHAISANGSOOK, S.; NOORBIBI, K.D.; SAMI, L.B.; GOOD, R.A.; HARAGUCHI, S. Innate immunity and its role against infections. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, 88: 253-65, 2002.

VAN DEN ENGH, G.J.; BOL, S. The presence of a CSF enhancing activity in the serum of endotoxin treated mice. **Cell Tiss Kinet**, 8: 579-87, 1975.

WAGNER, H.; KREUTZKAMP, B.; JURCIC, K. The alkaloids of *Uncaria tomentosa* and their phagocytosis-stimulating action. **Planta Medica**, 50: 419-23, 1985.

WILLIAMS, J.E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the peruvian rainforest with a particular emphasis on Una de Gato and Sangre de Grado. **Alternative Medicines Review**, 6(6): 567-79, 2001.

WING, E.J.; BARCZYNSKI, L.C.; WAHEED, A.; SHADDUCK, R.K. Effect of *Listeria monocytogenes* infection on serum levels of colony-stimulating factor and number of progenitor cells in immune and nonimmune mice. **Infection and Immunity**, 49(2): 325-28, 1985.

WING, E.J.; WAHEED, A.; SHADDUCK, R.K. Changes in serum colony-stimulating factor and monocytic progenitor cells during *Listeria monocytogenes* infection in mice. **Infection and Immunity**, 45(1): 180-84, 1984.

WOOD, P.R.; SPANIDIS, V.; FRANGOS, K.; CHEERS, C. The in vitro bactericidal activity of peritoneal and spleen cells from *Listeria* -resistant and -susceptible mouse strains. **Cellular Immunology**, 99: 160-9, 1986.

WURM, M.; KACANI, L.; LAUS, G.; KEPLINGER, K.; DIERICH, M.P. Pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce human endothelial cells to release a lymphocyte-proliferation-regulating factor. **Planta Medica**, 64(8): 701-4, 1998.

YOUNG, A.M.; CHEERS, C. Colony-forming cells and colony-stimulating activity during listeriosis in genetically resistant or susceptible mice. **Cellular Immunology**, 97: 227-37, 1986.

ZHAN, Y.; LIESCHKE, G.J.; GRAIL, D.; DUNN, A.R.; 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**, 91(3): 863-69, 1998.



APÊNDICES

Tabela 2 - Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais tratados com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg. Os animais foram sacrificados 24 horas após o último tratamento. Os animais do grupo controle receberam água.

Parâmetros x10³

N	Controle	EUT 10	EUT 50	EUT 100
1	17,10	19,65	19,14	20,85
2	14,62	19,31	21,87	19,76
3	15,60	16,13	22,75	24,25
4	16,17	17,14	18,29	25,32
5	18,42	13,96	20,15	27,31
6	16,24	15,68	21,74	24,16
Média	16,36	16,98	20,66	23,61
DP	1,30	2,20	1,74	2,82

Tabela 3 - Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais tratados com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg e infectados com *Listeria monocytogenes* (LM) (1x10³ bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção. Os animais do grupo controle receberam água.

Parâmetros x10³

N	Controle	LM 24h	10 + LM	50 + LM	100 + LM
1	17,10	12,25	12,62	18,07	25,38
2	14,62	13,60	11,94	16,52	23,13
3	15,60	16,93	13,27	19,32	24,19
4	16,17	15,81	16,42	13,86	25,21
5	18,42	14,24	15,86	15,18	25,36
6	16,24	10,12	14,24	19,32	27,62
Média	16,36	13,82	14,06	17,04	25,15
DP	1,30	2,45	1,79	2,25	1,50

Tabela 4 - Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais tratados com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg e infectados com *Listeria monocytogenes* (LM) (1×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção. Os animais do grupo controle receberam água.

Parâmetros $\times 10^3$

N	Controle	LM 48h	10 + LM	50 + LM	100 + LM
1	17,10	4,32	6,35	9,73	36,90
2	14,62	4,25	6,90	14,90	31,57
3	15,60	5,82	5,26	11,31	28,31
4	16,17	7,47	7,98	10,78	30,36
5	18,42	5,25	4,87	9,14	25,62
6	16,24	6,60	4,55	15,04	30,15
Média	16,36	5,62	5,98	11,82	30,48
DP	1,30	1,27	1,32	2,56	3,76

Tabela 5 - Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais tratados com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg e infectados com *Listeria monocytogenes* (LM) (1×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção. Os animais do grupo controle receberam água.

Parâmetros $\times 10^3$

N	Controle	LM 72h	10 + LM	50 + LM	100 + LM
1	17,10	10,81	8,64	17,41	24,07
2	14,62	8,52	8,48	20,61	26,63
3	15,60	9,74	8,37	16,41	25,52
4	16,17	9,33	12,21	13,27	30,81
5	18,42	10,68	10,47	17,42	35,31
6	16,24	10,50	14,04	20,61	29,11
Média	16,36	9,93	10,37	17,62	28,57
DP	1,30	0,90	2,34	2,77	4,10

Tabela 6 - Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais tratados com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg. Os animais foram sacrificados 24 horas após o último tratamento. Os animais do grupo controle receberam água.

Parâmetros x10²

N	Controle	EUT 10	EUT 50	EUT 100
1	9,36	15,21	10,01	9,36
2	10,08	18,80	11,35	8,36
3	16,56	13,25	17,21	15,68
4	12,96	9,32	16,74	16,09
5	17,64	10,15	13,21	14,94
6	18,72	11,27	12,34	10,15
Média	14,22	13,00	13,48	12,43
DP	3,99	3,56	2,91	3,51

Tabela 7 - Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais tratados com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg e infectados com *Listeria monocytogenes* (LM) (1x10³ bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção. Os animais do grupo controle receberam água.

Parâmetros x10²

N	Controle	LM 24h	10 + LM	50 + LM	100 + LM
1	9,36	17,61	15,12	17,52	17,08
2	10,08	22,80	16,20	14,10	16,16
3	16,56	19,19	17,28	13,20	9,81
4	12,96	21,53	25,20	16,15	11,93
5	17,64	18,27	17,64	15,27	12,21
6	18,72	23,05	16,48	17,16	13,16
Média	14,22	20,41	17,99	15,57	13,39
DP	3,99	2,36	3,64	1,70	2,74

Tabela 8 - Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais tratados com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg e infectados com *Listeria monocytogenes* (LM) (1×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção. Os animais do grupo controle receberam água.

Parâmetros $\times 10^2$

N	Controle	LM 48h	10 + LM	50 + LM	100 + LM
1	9,36	60,48	38,93	14,64	11,56
2	10,08	63,72	40,54	10,24	11,68
3	16,56	72,84	43,90	11,15	10,27
4	12,96	68,96	44,31	11,68	11,35
5	17,64	67,36	39,27	13,19	10,91
6	18,72	61,33	45,20	15,10	9,74
Média	14,22	65,78	42,02	12,67	10,92
DP	3,99	4,79	2,76	1,96	0,77

Tabela 9 - Unidade formadora de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais tratados com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg e infectados com *Listeria monocytogenes* (LM) (1×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção. Os animais do grupo controle receberam água.

Parâmetros $\times 10^2$

N	Controle	LM 72h	10 + LM	50 + LM	100 + LM
1	9,36	68,04	35,64	12,40	10,07
2	10,08	56,15	33,04	11,60	8,64
3	16,56	54,48	33,04	9,96	12,93
4	12,96	61,56	33,12	15,51	11,71
5	17,64	54,04	36,27	9,37	9,16
6	18,72	58,76	37,39	12,15	11,21
Média	14,22	58,84	34,75	11,83	10,62
DP	3,99	5,32	1,93	2,17	1,63

Tabela 10 - Fatores estimuladores de colônias no soro de animais tratados com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg. Os animais foram sacrificados 24 horas após o último tratamento. Os animais do grupo controle receberam água.

Unidades por mL

N	Controle	EUT 10	EUT 50	EUT 100
1	0,85	0,85	3,50	9,68
2	1,42	1,14	4,47	9,40
3	1,14	0,57	2,92	9,11
4	0,57	1,42	3,11	9,68
5	0,28	1,14	2,72	9,11
6	0,85	0,86	2,53	9,40
Média	0,85	1,00	3,21	9,40
DP	0,40	0,30	0,70	0,25

Tabela 11 - Fatores estimuladores de colônias no soro de animais tratados com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg e infectados com *Listeria monocytogenes* (LM) (1×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção. Os animais do grupo controle receberam água.

Unidades por mL

N	Controle	LM 24h	10 + LM	50 + LM	100 + LM
1	0,85	8,54	7,69	10,11	10,25
2	1,42	7,12	8,83	9,92	10,53
3	1,14	8,26	9,96	9,72	11,10
4	0,57	7,97	8,26	9,53	10,25
5	0,28	9,11	8,54	9,92	10,53
6	0,85	8,26	8,83	9,72	11,67
Média	0,85	8,21	8,68	9,82	10,72
DP	0,40	0,66	0,76	0,20	0,56

Tabela 12 - Fatores estimuladores de colônias no soro de animais tratados com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg e infectados com *Listeria monocytogenes* (LM) (1×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção. Os animais do grupo controle receberam água.

Unidades por mL

N	Controle	LM 48h	10 + LM	50 + LM	100 + LM
1	0,85	15,37	16,51	17,99	23,06
2	1,42	13,38	13,95	16,96	19,08
3	1,14	18,22	17,08	17,47	19,93
4	0,57	14,80	16,51	17,73	23,06
5	0,28	13,67	16,80	18,24	22,21
6	0,85	12,81	16,23	18,76	21,35
Média	0,85	14,71	16,18	17,86	21,45
DP	0,40	1,96	1,13	0,62	1,65

Tabela 13 - Fatores estimuladores de colônias no soro de animais tratados com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg e infectados com *Listeria monocytogenes* (LM) (1×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção. Os animais do grupo controle receberam água.

Unidades por mL

N	Controle	LM 72h	10 + LM	50 + LM	100 + LM
1	0,85	5,70	6,55	9,24	12,81
2	1,42	5,98	5,98	9,48	11,39
3	1,14	5,12	5,41	9,48	13,10
4	0,57	6,55	6,83	9,00	12,24
5	0,28	7,12	7,12	9,97	13,38
6	0,85	5,41	6,26	9,48	11,96
Média	0,85	5,98	6,36	9,44	12,48
DP	0,40	0,74	0,61	0,32	0,75

Tabela 14 - Peso do baço de animais tratados com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg. Os animais foram sacrificados 24 horas após o último tratamento. Os animais do grupo controle receberam água.

Parâmetros x10⁻² (gramas)

N	Controle	EUT 10	EUT 50	EUT 100
1	8,36	7,05	9,24	7,32
2	8,98	7,74	8,25	7,21
3	9,80	7,97	7,64	7,66
4	8,27	9,81	7,94	7,46
5	10,62	7,65	6,55	8,32
6	8,18	8,90	7,95	8,91
Média	9,03	8,19	7,93	7,81
DP	0,99	1,00	0,87	0,66

Tabela 15 - Peso do baço de animais tratados com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg e infectados com *Listeria monocytogenes* (LM) (1x10³ bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção. Os animais do grupo controle receberam água.

Parâmetros x10⁻² (gramas)

N	Controle	LM 24h	10 + LM	50 + LM	100 + LM
1	8,36	14,84	11,74	10,08	10,58
2	8,98	12,92	12,06	7,14	8,95
3	9,80	11,76	12,44	10,32	9,82
4	8,27	10,91	13,55	10,14	8,62
5	10,62	11,75	13,39	10,66	7,89
6	8,18	10,56	12,52	10,71	9,95
Média	9,03	12,12	12,62	9,84	9,30
DP	0,99	1,56	0,72	1,35	0,99

Tabela 16 - Peso do baço de animais tratados com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg e infectados com *Listeria monocytogenes* (LM) (1×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção. Os animais do grupo controle receberam água.

Parâmetros $\times 10^{-2}$ (gramas)

N	Controle	LM 48h	10 + LM	50 + LM	100 + LM
1	8,36	19,69	16,19	9,59	10,14
2	8,98	20,49	14,27	12,67	9,87
3	9,80	17,56	15,73	10,70	13,99
4	8,27	19,21	14,74	12,20	9,41
5	10,62	20,52	10,49	15,20	10,37
6	8,18	21,74	13,54	14,32	11,18
Média	9,03	19,87	14,16	12,45	10,83
DP	0,99	1,42	2,04	2,12	1,66

Tabela 17 - Peso do baço de animais tratados com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg e infectados com *Listeria monocytogenes* (LM) (1×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção. Os animais do grupo controle receberam água.

Parâmetros $\times 10^{-2}$ (gramas)

N	Controle	LM 72h	10 + LM	50 + LM	100 + LM
1	8,36	21,92	18,59	14,45	14,27
2	8,98	18,60	16,66	14,41	13,89
3	9,80	20,06	18,94	17,92	15,90
4	8,27	17,65	18,19	17,41	12,41
5	10,62	19,62	16,20	13,06	14,96
6	8,18	18,35	17,56	18,31	14,79
Média	9,03	19,37	17,69	15,93	14,37
DP	0,99	1,52	1,09	2,22	1,18

Tabela 18 - Avaliação da sobrevida de animais tratados durante 7 dias com extrato de *Uncaria tomentosa* (EUT) nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg e infectados com *Listeria monocytogenes* (LM) (4×10^4 bactérias/animal). Análise de Kaplan-Meier seguido de teste de Log-Rank.

Dia	LM	10 + LM	50 + LM	100 + LM
1°				
2°				
3°	11	6		
4°	5	5	5	3
5°	4	7	7	5
6°		2	5	5
30°				