

Anderson Thiago Constantino

Avaliação dos efeitos do extrato de *Angelica sinensis* na resposta hematopoética de 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



Unicamp
Campinas, 2009

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

ANDERSON THIAGO CONSTANTINO

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

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Denise Fecchio	
Professor (a) Doutor (a) Sisi Marcondes Paschoal	
Professor (a) Doutor (a) Mary Luci De Souza Queiroz	

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

Data: 04/06/2009

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo insondável poder e amor.

Ao meu pai, Constantino, e minha mãe, Edna, pelo amor, pela educação, pelas oportunidades, pelas orações, porque mesmo sofrendo muitas vezes não puderam impedir minha queda, porém, nos momentos mais difíceis da minha vida estavam ao meu lado, em um hospital quando os médicos não tinham esperanças ou como amigos ajudando-me a enfrentar momentos de fracasso e desilusão.

A minha esposa, Michele, a minha filha Lara, pelo amor e pela amizade, dando-me forças e razão para continuar lutando.

Aos meus irmãos, André e Arom, por serem meus melhores amigos e me incentivarem a todo o momento ajudando-me a levantar quando eu caio.

A Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, orientadora deste trabalho, por essa oportunidade ímpar, pela confiança, estímulo e por não desistir de mim quando eu mesmo já tinha desistido.

Aos colegas do laboratório que compartilharam de momentos importantes e contribuíram para organização e bom andamento das atividades no laboratório. Em especial agradeço a Cristiane, Aline, Michele, Samara, Julia e Simone por contribuírem com seu conhecimento e informações de forma desprendida e amigável, pelo companheirismo, por me ensinarem e por me ajudarem no projeto, a Sueli e Rafael por me auxiliarem, pelos “puxões de orelha”, pelas brincadeiras que tornaram nossos dias descontraídos e menos árduos.

Aos meus amigos, em especial ao Bruno Luttiani e ao Mário Ogatta que contribuíram muito para que este trabalho se tornasse uma realidade.

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

SUMÁRIO

	PÁG.
LISTA DE FIGURAS.....	07
RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO.....	13
<i>Angelica sinensis</i> (AS).....	14
Modelo experimental de infecção por <i>Listeria monocytogenes</i>	18
OBJETIVOS.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	24
1. Animais.....	25
2. <i>Listeria monocytogenes</i>	25
3. Tratamento com o extrato de <i>Angelica sinensis</i> (EAS).....	26
4. Cultura clonal de precursores hematopoéticos da medula óssea e baço de camundongos (CFU-C).....	28
4.1. Medula óssea.....	29
4.2. Baço.....	29
4.3. Preparação das placas de cultura da medula óssea e baço em meio semi-sólido.....	30
5. Obtenção do soro de animais para detecção da atividade dos fatores estimuladores de colônias.....	30
6. Realização da curva de sobrevivência.....	31
7. Peso do baço.....	32
8. Dosagem de citocinas.....	32

RESULTADOS.....	34
1. Efeitos do EAS sobre o número de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos da medula óssea e do baço de camundongos (CFU-C).....	35
1.1. Medula óssea.....	35
1.2. Baço.....	37
2. Efeitos do EAS sobre a produção de fatores estimuladores de colônias (CSFs)	39
3. Efeitos do EAS sobre o peso do baço dos animais.....	41
4. Efeitos do EAS na sobrevivência de animais infectados com uma dose letal de <i>Listeria monocytogenes</i>	43
5. Efeitos do EAS sobre os níveis de produção das citocinas INF- γ e TNF- α em animais normais e infectados com uma dose letal de <i>Listeria monocytogenes</i>	45
DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

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>Angelica sinensis</i> (10, 25, 50 e 100 mg/Kg/dia) administrados durante 10 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> (5×10^4 bac/animal)..	36
Figura 3. Efeitos do extrato de <i>Angelica sinensis</i> (10, 25, 50 e 100 mg/Kg/dia) administrados durante 10 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> (5×10^4 bac/animal).....	38
Figura 4. Efeitos do extrato de <i>Angelica sinensis</i> (10, 25, 50 e 100 mg/Kg/dia) administrados durante 10 dias consecutivos sobre a produção de fatores estimuladores de colônias no soro de animais normais e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> (5×10^4 bac/animal)..	40
Figura 5. Efeitos do extrato de <i>Angelica sinensis</i> (10, 25 e 50 mg/Kg/dia) administrados durante 10 dias consecutivos sobre o peso do baço de animais normais e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> (5×10^4 bac/animal)	42
Figura 6. Efeitos do extrato de <i>Angelica sinensis</i> (10, 25 e 50	

mg/Kg/dia) administrados durante 10 dias consecutivos na sobrevivência de animais infectados com uma dose letal de <i>Listeria monocytogenes</i> (6×10^5 bac/animal)	44
--	----

Figura 7. Efeitos do tratamento com a dose de 50mg/Kg do extrato de <i>Angelica sinensis</i> (EAS) sobre os níveis de INF-γ em cultura de macrófagos esplênicos de animais normais e infectados com 5×10^3 <i>Listéria monocytogenes</i> /animal.....	46
---	----

Figura 8. Efeitos do tratamento com a dose de 50mg/Kg do extrato de <i>Angelica sinensis</i> (EAS) sobre os níveis de TNF-α em cultura de macrófagos esplênicos de animais normais e infectados com 5×10^3 <i>Listéria monocytogenes</i> /animal.....	47
---	----

RESUMO

As propriedades imunomoduladoras do extrato seco da raiz de *Angelica sinensis* Diels (EAS) foram avaliadas em camundongos Balb-c machos utilizando-se o modelo de infecção por *Listeria monocytogenes*. Administrou-se profilaticamente doses de 10, 25, 50 e 100mg/Kg de EAS durante 10 dias. As doses de 10, 25 e 50mg/Kg protegeram os camundongos contra uma dose letal de *Listeria monocytogenes* observando-se uma taxa de sobrevivência de 10%, 20% e 30%, respectivamente. Essas doses também impediram a mielossupressão e a esplenomegalia frente a uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* aumentando de forma significativa o número de progenitores de macrófagos e granulócitos (CFU-GM) na medula óssea. A investigação da atividade dos fatores estimuladores de colônia (CSF) demonstrou aumento na atividade estimuladora de colônia no soro (CSA) de animais pré-tratados com EAS. Curiosamente, não se observou efeitos com a dose 100 mg/kg, em comparação com controles infectados não tratados, sugerindo estimulação dose-dependente da mielopoiese e CSA, onde a dose biológica ativa ótima foi a de 50 mg / kg. Esta dose foi utilizada nos experimentos para investigar os níveis de INF- γ e TNF- α . Observou-se aumento nos níveis de INF- γ e TNF- α em culturas de macrófagos esplênicos de animais tratados com EAS, sugerindo aumento na atividade microbicida de macrófagos. Estes resultados sugerem que EAS modula a atividade imune de forma indireta e provavelmente inibe a atividade supressora da LM por induzir um aumento na reserva de progenitores mielóide da medula óssea em consequência de uma liberação ativa de citocinas (CFS, INF- γ e TNF- α).

ABSTRACT

The immunomodulatory properties of dry extract of the roots of *Angelica sinensis* Diels (ASE) were evaluated in Male BALB/c mice using the model of infection with *Listeria monocytogenes*. Prophylactic administration of ASE (10, 25, 50 and 100 mg/kg) stimulated marrow myelopoiesis in a dose-dependent manner and reduced spleen colony formation to control values. Evaluation of the colony-stimulating factors (CSF) showed an increase in the colony-stimulating activity (CSA) in the serum of animals pre-treated with ASE. Interestingly, no effects were observed with the 100 mg/Kg dose, compared with infected non-treated controls, suggesting a stimulation of myelopoiesis and CSA occurred in a dose-dependent manner, with a peak being reached with dose of 50 mg/kg. This dose was used to investigate levels of INF- γ and TNF- α . There was an increase in the levels of INF- γ and TNF- α in culture of splenic macrophages from animals treated with ASE, and this result points to increased microbicide activity of macrophages. All together, the results suggest that the ASE indirectly modulates the immune activity and probably disengages LM-induced suppression of these responses by inducing a higher reserve of myeloid progenitors in the bone marrow in consequence of biologically active cytokine release (CFS, INF- γ and TNF- α).

INTRODUÇÃO

O interesse por fitoterápicos e plantas medicinais tem crescido muito nos últimos anos, vale lembrar que o uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à civilização humana. Em 252 drogas consideradas como básicas e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS) 11% são de origem exclusivamente vegetal e um número significativo das drogas sintéticas é obtido a partir de precursores naturais (Rates, 2001).

Os tratamentos de primeira escolha atualmente aplicados em quadros de neoplasias e estados imunodeficientes provocam efeitos colaterais graves, dentre eles a inibição da resposta imune, sendo amplamente demonstrado maior eficiência destes tratamentos quando utilizam imunomoduladores como coadjuvantes (Chirigos, 1992; Spelman *et al.*, 2006). Já são conhecidas várias plantas medicinais com atividade imunomoduladora, que alteram a resposta imune por meio de um controle dinâmico de moléculas informativas como as citocinas (Spelman *et al.*, 2006). Assim, encontramos uma importante justificativa para estudos de imunomodulação por extratos vegetais tanto em modelos animais quanto em ensaios clínicos.

Angelica sinensis

A *Angélica sinensis* (AS), também conhecida como Don Quai, é uma erva perene perfumada, encontrada na China, Japão e Coréia. Pertence a família Umbelliferae e produz flores brancas que em conjunto lembram um guarda chuva. Uma planta típica cresce aproximadamente a uma altura de seis pés. Na raiz encontra-se todo valor terapêutico, sendo seu sabor uma mistura de amargo e

doce. Considerada um tônico do sangue, é tradicionalmente utilizada pelos chineses para problemas de coração, pulmão e fígado, sendo muito empregada para controlar cólica menstrual e irregularidades do ciclo menstrual (Monografia..., 2004).

Devido a vários constituintes bioativos (Ligustilide, ácido ferúlico, ácido succínico, vitamina A, E e B12, carotenóides, ácido ascórbico, ácido folínico, fitoesteróis, biontina, derivados cumárinicos, ácido mirístico, vários macrominerais, polissacarídeos e outros) a AS possui diversas ações farmacológicas (Zhu DP., 1987; Wang *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003; Monografia, 2004). Derivados cumárinicos provavelmente são responsáveis por atividade anticoagulante da AS. A AS também exerce atividade antiplaquetária uma vez que o ácido ferúlico pode inibir a polimerização das plaquetas na circulação sanguínea (Zhu DP., 1987; Monografia..., 2004; Bone *et al.*, 2000).

Estudo em modelo animal usando extrato aquoso da AS demonstrou efeito protetor contra disfunção do miocárdio e injúria do miocárdio induzida por isquemia (Chen *et al.*, 1995). Um estudo histológico utilizando uma preparação de AS e *Ligusticum chuanxiong* evidenciou proteção das células endoteliais da veia umbilical contra danos causados por peróxido de hidrogênio, provavelmente devido a ativação da via ERK (sinal extracelular-regulamentado proteína quinase) e a expressão de eNOS (enzima óxido nítrico sintetase). Graças a sua propriedade antioxidante a preparação revelou potencial terapêutico no tratamento de doenças cardiovasculares (Hou *et al.*, 2004).

Dados clínicos demonstram que prescrições contendo AS tiveram efeito significativo em reduzir o tempo de recuperação de ferimentos ósseos

(Enciclopédia de Prescrições da Tradicional Medicina Chinesa, 1992). A AS possui atividade estimuladora dose dependente sobre as células ósseas, efeito esse atribuído ao aumento da secreção de proteínas, particularmente, colágeno tipo I, pelas células osteoprecursoras humanas, e a estimulação da atividade da fosfatase alcalina (Yang *et al.*, 2002).

A AS é capaz de reduzir a área de ulcera, evento esse acompanhado de aumento significativo na síntese de muco gástrico em modelo animal (Ye *et al.*, 2003). O reparo da ulcera gástrica deve-se a capacidade de modular a migração e proliferação das células epiteliais gástricas por meio de polissacarídeos. A ODC (Ornitina Descarboxilase, enzima fosfato dependente) e c-MYC (fator de transcrição) estão envolvidos no mecanismo de proliferação. A AS pode agir através do gene do c-MYC, que ativa o mRNA de ODC e a expressão da proteína estimula a proliferação das células (Ye *et al.*, 2001).

Poderíamos, ainda, citar estudos que falam sobre a aplicação da AS em modelos de câncer, fibrose pulmonar, injúria hepática e outros (Tsai *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2001; Monografia..., 2004). Como já foi enfatizado a AS possui muitas aplicações farmacológicas por isso são vários estudos sobre suas propriedades, porém gostaríamos de enfatizar sua atividade sobre a hematopoese e propriedade imunomoduladora.

A administração de *A. sinensis* em um paciente portador de anemia renal crônica submetidos a hemodiálise revelou uma melhoria na hematopoese relacionada a maior secreção de CFSs (Bradley *et al.*, 1999). Uma preparação feita a partir de ervas do gênero *Angélica* é amplamente aplicada na clínica médica chinesa para tratamento de doenças caracterizadas por baixa contagem

de células sangüíneas. Relata-se que a preparação estimula a proliferação das células sangüíneas. Justifica-se o estímulo sobre a proliferação celular através do aumento na secreção de muitos fatores hematopoéticos, tais como interleucinas, EPO, TPO, GM-CSF, TNF- α , INF- γ (Hatano *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1996; Jean *et al.*, 2000). Sabe-se, ainda, que tal preparação estimula de forma direta a proliferação de células mononucleares da medula óssea através de ERK 1/2 e P38, enzimas que participam de subvias que compõem a via MAPK (Xiaoping *et al.*, 2006).

A atividade imunomoduladora de polissacarídeos da AS (PAS), extraídos a partir da raiz fresca, foi estudada *in vitro*. Observou-se aumento na produção de IL-2 e IFN- γ por células esplênicas tratadas com PAS e analisadas com Kit ELISA, em paralelo a análise de RT-PCR apontou para o aumento da expressão dos genes que codificam para IL-2 e IFN- γ . Os resultados da proliferação celular mostraram atividade de PAS sobre a proliferação de macrófagos e células T, sendo que a relação tempo efeito da resposta das citocinas sugere que macrófagos e células NK envolvidos na resposta imune inespecífica foram primariamente ativados, e células T foram secundariamente afetadas por PAS (Yang *et al.*, 2006).

O isolamento de ativos na avaliação de atividade das plantas pode levar a exclusão de ativos com relevante potencial. Isto ocorre quando o efeito não é causado por um simples composto, mas por uma combinação de vários, atuando de modo sinérgico – fitocomplexo (Rates, 2000). Deve-se levar em consideração que o uso do extrato bruto se aproxima mais do uso tradicional relatado pelos povos.

Tendo em vista os relatos do uso desta planta, alguns estudos sugerindo uma atividade imunomoduladora e a necessidade de ampliação desses estudos, nos propomos a estudar os efeitos do extrato da *Angélica sinensis* na resposta hematopoética em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*.

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 à 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 conseqüente 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; Flesch *et al.*, 1998; Rescigno *et al.*, 1999).

As células TCD8⁺ (linfócitos T citotóxicos) lisam as 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 *Angelica sinensis* (EAS) em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* (LM). Os parâmetros avaliados foram:

- Eficácia do EAS frente a uma dose letal da LM;
- Número de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea e baço;
- Atividade estimuladora de colônias do soro;
- Peso do baço;
- Níveis de TNF- α e IFN- γ em cultura de macrófagos esplênicos.

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 *Angelica sinensis* (EAS) nas doses de 10, 25, 50 e 100mg/Kg durante 10 dias;
- c) animais infectados com *L. monocytogenes*, recebendo veículo (água);

d) animais tratados com EAS nas doses de 10, 25, 50 e 100mg/Kg durante 10 dias e infectados com *L. monocytogenes*.

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA-IB-UNICAMP), sob protocolo nº 1058-1

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) + 15% de Glicerol a -80°C no Freezer do Controle de Qualidade do Hemocentro desta Universidade. Um dia antes da inoculação descongelou-se a bactéria e estriou-se duas placas de ágar-sangue, essas placas

permaneceram na estufa a 37°C por 24h. 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 o estudo dos parâmetros hematopoéticos foi utilizada a dose subletal de 5×10^3 bactérias/animal. Para a avaliação da sobrevida dos animais foi necessário utilizar uma concentração letal de 6×10^5 bactérias/animal. A bactéria foi inoculada intraperitonealmente no décimo dia de tratamento. A resposta hematopoética foi avaliada 24, 48 e 72 horas após a infecção.

Para manter a patogenicidade da bactéria nossa equipe inocula intraperitonealmente um camundongo com a bactéria diluída em solução salina 0,9%. Quarenta e oito horas após a inoculação da bactéria o baço é isolado em ambiente estéril, macerados, mantidos em BHI por 24 horas e, logo após, a bactéria é isolada em placas de ágar-sangue e reinicia-se o procedimento quantas vezes forem necessárias para que a bactéria mantenha sua patogenicidade.

3. Tratamento com o extrato de *Angelica sinensis* (EAS)

O EAS foi gentilmente fornecido por Galena Química e Farmacêutica Ltda (Campinas-SP, Brasil). Trata-se de um extrato seco comercializado por Jiangxi Medicines & Health Products, situado em Nanchang, China. O vegetal e o extrato foram identificados e avaliados de acordo com a descrição das características adequadas e através da monografia presente na Farmacopéia Chinesa. Para obtenção do extrato seco utilizou-se como solventes etanol e água. O lote da matéria-prima utilizado neste trabalho é o de número 288469, este lote foi

padronizado e submetido à realização de análises organolépticas, fitoquímicas e microbiológicas para determinação da qualidade. O extrato é padronizado através do seu ativo Ligustilide, qualquer fração do extrato não pode ter menos que 1% de Ligustilide, para quantificar esse ativo e confirmar a padronização utilizou-se HPLC agilent, coluna inertisil ODS-3 4,6x150mm 5µm, fluxo de 1,0mL/min, detecção de 284nm, fase móvel de metanol/água (65:35), temperatura de 25°C, volume de injeção igual a 10 µL, utilizou-se metanol como diluente no preparo das soluções, o padrão externo foi preparado na concentração de 0,04mg/mL.

A administração do EAS foi realizada por gavagem nas doses de 10, 25, 50 e 100mg/Kg, utilizando-se água estéril como veículo de administração. O tratamento ocorreu durante 10 dias consecutivos, no mesmo horário todos os dias, e no último dia inoculou-se intraperitonalmente a bactéria 3 horas depois do tratamento.

As doses do EAS foram selecionadas com base em trabalhos da literatura (Ye et al., 2001; Ding et al., 2001; Sun et al., 2005) e a partir dos resultados obtidos na curva de sobrevivência, uma vez que os trabalhos encontrados em modelo animal normalmente isolam os polissacarídeos e neste trabalho optamos por utilizar o extrato cru dissolvido em água estéril.

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 conseqüente superposição das mesmas, de modo a permitir a identificação de cada colônia. Pensando nisto, nossa equipe padronizou a utilização de 100µL de fator estimulante de colônias (GM-CSF da empresa Sigma Chemical Co, USA) na concentração de 8 nanogramas/mL durante a preparação de cada placa. Além disso, a escolha do soro fetal bovino deve ser feita cuidadosamente devido à variação na atividade dos vários lotes e marcas.

4.1. Medula óssea

Após sacrificar o animal através do deslocamento cervical, limpou-se a pele com álcool 70%. O fêmur foi exposto para remoção da cartilagem sobre o orifício na extremidade distal e cortando-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 (Cutilab).

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

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 (Cutilab). 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 100µL do estímulo (GM-CSF da empresa Sigma Chemical Co, USA). Deixou-se geleificar e incubou-se por 7 dias a 37°C em presença de 5% de CO₂. Após este período contou-se o número de colônias formadas em microscópio de dissecação com aumento de 40x (Metcalf, 1984).

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

O sangue dos animais dos foi obtido 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 de CSF por mL e determinada a partir da curva de titulação do GM-CSF na figura 1. De acordo com Van e Bol (1975), a menor concentração capaz de estimular o crescimento de clones é considerada como 1 unidade de CSF/mL.

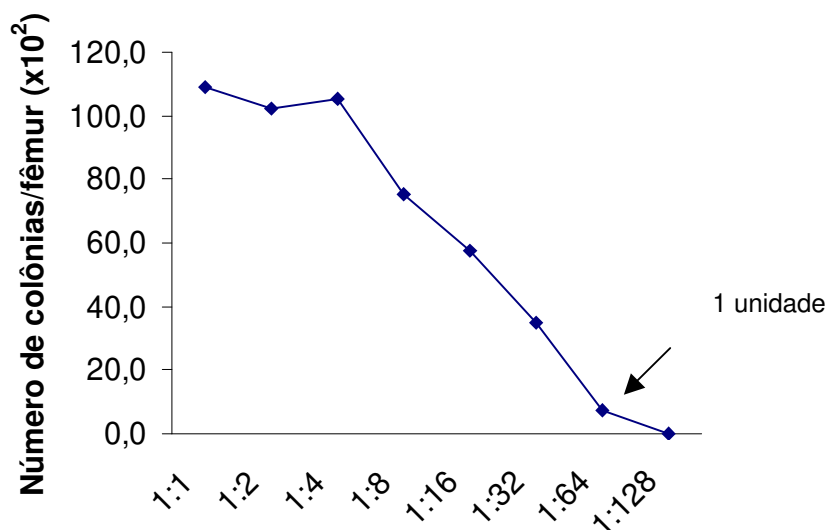


Figura 1. Curva da capacidade estimuladora do crescimento de colônias expressa em unidades/mL.

6. Realização da curva de sobrevida

Com o intuito de observar uma possível proteção dos animais tratados com o EAS, realizou-se uma curva de sobrevivência. Considerou-se dois grupos experimentais: animais somente infectados com *Listeria monocytogenes* 6×10^5 bactérias/animal e animais tratados por 10 dias consecutivos com EAS nas doses de 10, 25, 50, 100mg/Kg e infectados com 6×10^5 bactérias/animal. Observou-se os animais por um período de 30 dias.

7. 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.

8. Dosagem de citocinas

Baços de camundongos submetidos ao tratamento de 50mg/Kg de EAS e sacrificados após 48h de infecção (rever item 3) foram coletados assepticamente, macerados e homogeneizados em meio RPMI-1640 (Cultilab). Células mononucleares foram obtidas adicionando-se tampão de lise ao botão celular. Após lavagem, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF e incubadas em placa de petri de vidro (100x20 mm) por 2 h em estufa úmida a 37° C e 5% de CO₂. Após este período, as células não aderentes foram descartadas e tripsinizou-se as células aderentes, lavou-se as células tripsinizadas e através de câmara hemacitométrica ajustou-se a concentração para 1×10^5 células/mL de meio RPMI enriquecido com 5% de SBF.

Adicionou-se em placa de 24 poços 1mL de meio RPMI enriquecido com 5% de SBF contendo 1×10^5 células em cada well e, em seguida, 50 μ L de solução de LPS (5 μ g/mL). Simultaneamente, incubou-se células de cada amostra sem LPS para controle. As placas foram incubadas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂. Após 48h, o sobrenadante foi coletado individualmente de cada orifício e congelado a -20° C.

As concentrações de TNF- α e INF- γ foram quantificadas através do método imunoenzimático (ELISA) utilizando-se Kits de anticorpos específicos para cada substância [Kit DuoSet® ELISA Development System: mouse TNF- α /TNFSF1A (Cód. DY410) e mouse IFN- γ (Cód. DY485)]. A quantificação foi realizada em placa de microcultura para ELISA (“maxi sorp” 96 wells), seguindo a indicação do fabricante para utilização de cada Kit. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (λ = 450 nm).

RESULTADOS

1. Efeitos do EAS 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 10 dias com EAS na atividade hematopoética da medula óssea em animais normais e infectados com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal) estão representados na figura 2.

O tratamento de animais normais (não infectados) não produziu aumento no número de CFU-GM medular quando comparado com o grupo controle. A infecção com *Listeria monocytogenes* provocou acentuada redução no número de CFU-GM comparado ao grupo controle. No entanto, quando os animais foram previamente tratados com 10, 25, 50 e 100mg/Kg do EAS e infectados, houve uma prevenção da mielossupressão. A dose de 50 mg/Kg do EAS produziu um aumento no número de CFU-GM estatisticamente maior que as outras doses ($P < 0,001$).

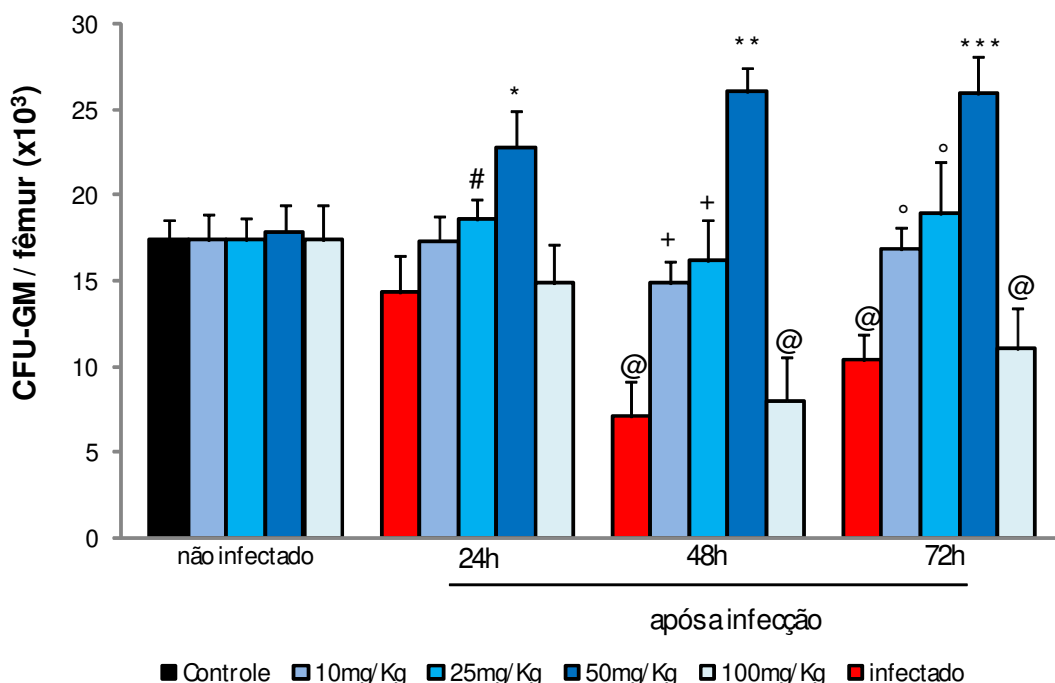


Figura 2. Efeitos do extrato de *Angelica sinensis*, administrado durante 10 dias consecutivos, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos da medula óssea de animais normais e infectados com *Listéria monocytogenes* (5×10^3 i.p. bac/animal). A inoculação de *Listéria monocytogenes* ocorreu 2h após o último tratamento em seguida os animais foram sacrificados 24, 48 e 72h após a infecção. O grupo controle recebeu água estéril. Os dados representam a média e desvio padrão obtidos de 6 animais por grupo. @ $P < 0,001$ em relação ao controle. * $P < 0,001$ em relação ao controle e Infectado 24h. ** $P < 0,001$ em relação ao controle e infectado 48h. *** $P < 0,001$ em relação ao controle e infectado 72h. # $P < 0,01$ em relação ao infectado 24h. + $P < 0,001$ em

relação ao infectado 48h. ° $P < 0,001$ em relação ao infectado 72h. ANOVA – Teste Tukey.

1.2. Baço

Os resultados da atividade hematopoética extramedular de animais normais e infectados com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal) estão representados na figura 3.

Não observamos qualquer alteração na formação de colônias esplênicas nos animais normais (não infectados) tratados com EAS. A infecção com *Listeria monocytogenes* aumentou o número de CFU-GM no grupo apenas infectado e no grupo tratado com 100mg/Kg e infectado ($P < 0,001$). Porém, quando os animais foram pré-tratados com as doses de 10, 25 e 50mg/Kg 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.

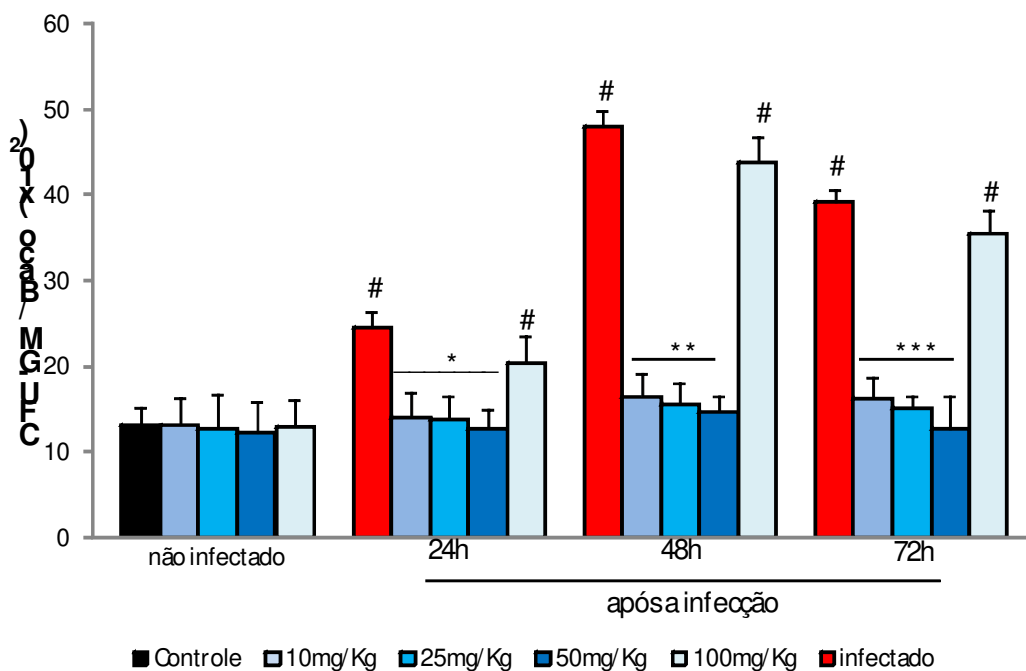


Figura 3. Efeitos do extrato de *Angelica sinensis*, administrado durante 10 dias consecutivos, sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos no baço de animais normais e infectados com *Listéria monocytogenes* (5×10^3 i.p. bac/animal). A inoculação de *Listéria monocytogenes* ocorreu 2h após o último tratamento em seguida os animais foram sacrificados 24, 48 e 72h após a infecção. O grupo controle recebeu água. Os dados representam a média e desvio padrão obtido de 6 animais por grupo. # $P < 0,001$ em relação ao controle; * $P < 0,001$ em relação ao infectado 24h; ** $P < 0,001$ em relação ao infectado 48h; *** $P < 0,001$ em relação ao infectado 72h. ANOVA – Teste Tukey.

2. Efeitos do EAS sobre a produção de fatores estimuladores de colônias (CSFs)

Os resultados do pré-tratamento por 10 dias com EAS sobre a produção de fatores estimuladores de colônias no soro de animais normais e infectados com uma dose subletal de *Listeria monocitogenes* (5×10^3 bactérias/animal) estão representados na figura 4.

Nos animais normais (não infectados) tratados com 10, 25, 50mg/kg do EAS observamos um aumento nos níveis séricos de CSFs ($P < 0,01$). Em animais normais (não infectados) tratados com a dose de 100mg/Kg observou-se níveis séricos de CSFs semelhantes ao grupo controle. A presença da infecção produziu um aumento agudo nos níveis séricos de CSFs nos três períodos estudados ($P < 0,001$). O pré-tratamento com 10, 25 e 50mg/Kg de EAS potencializou a produção de CSFs, verifica-se tal afirmação ao compararmos os grupos infectados e tratados com os grupos apenas infectados ($P < 0,001$). A dose de 50 mg/Kg do EAS produziu um aumento no número de CSF estatisticamente maior que as outras doses ($P < 0,001$).

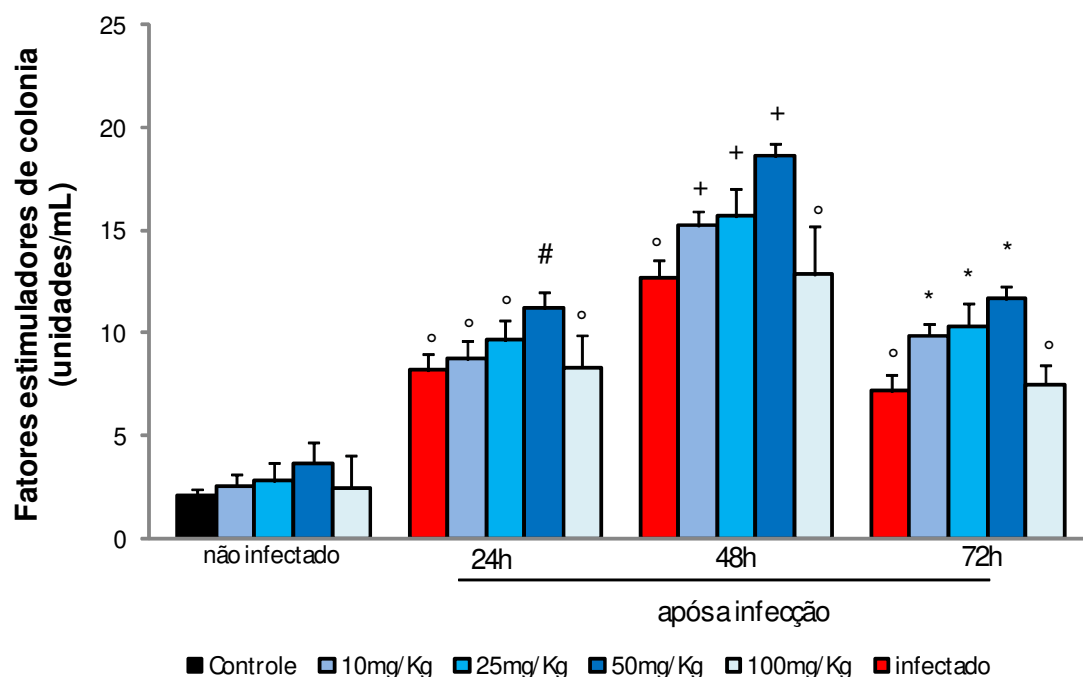


Figura 4. Efeitos do extrato de *Angélica sinensis* (EAS) (10, 25, 50 e 100mg/Kg/dia) administrados durante 10 dias consecutivos sobre a produção de fatores estimuladores de colônias no soro de animais normais e infectados com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bac/animal). A inoculação de *Listéria monocytogenes* ocorreu 2h após o último tratamento em seguida 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. Todos os grupos apresentaram $P < 0,001$ em relação ao controle; # $P < 0,001$, em relação ao infectado 24h; + $P < 0,001$, em relação ao infectado 48h; * $P < 0,001$, em relação infectado 72 h; ANOVA – Teste Tukey.

3. Efeitos do EAS sobre o peso do baço dos animais

Os resultados do pré-tratamento por 10 dias com EAS sobre o peso do baço de animais normais e infectados com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/animal) estão representados na figura 5.

O peso do baço dos animais tratados com 10, 25 e 50mg/Kg do EAS não apresentou diferença significativa em relação ao controle. O peso do baço de animais tratados com 100mg/Kg foi semelhante ao peso do baço observado em animais apenas infectado. No grupo de animais apenas infectado 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 10, 25 e 50mg/Kg do EAS, a esplenomegalia foi prevenida, o que provavelmente justifica os valores similares ao grupo controle.

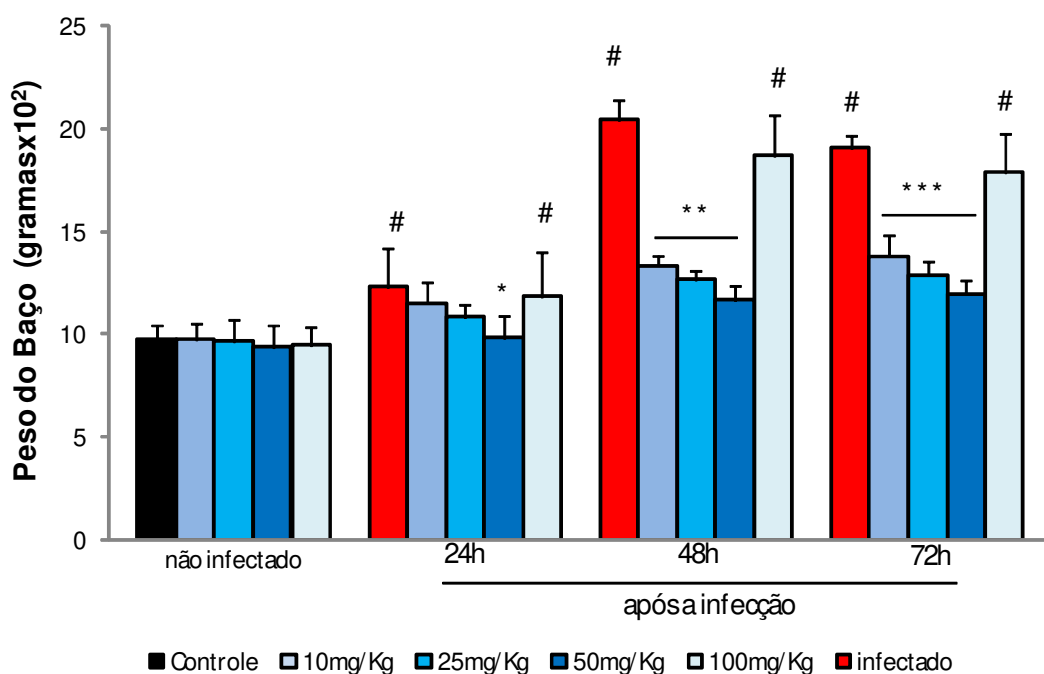


Figura 5. Efeitos do extrato de *Angelica sinensis*, administrado durante 10 dias consecutivos, sobre o peso do baço de animais normais e infectados com *Listéria monocytogenes* (5×10^3 i.p. bac/animal). A inoculação de *Listéria monocytogenes* ocorreu 2h após o último tratamento em seguida os animais 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; * $P < 0,01$ em relação ao infectado 24h; ** $P < 0,001$ em relação ao infectado 48h; *** $P < 0,001$, em relação ao infectado 72h. ANOVA – Teste Tukey.

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

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

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 10, 25 e 50mg/Kg do EAS aumentou a resistência dos animais à *Listeria monocytogenes*, resultando em aproximadamente 10, 20 e 30% de sobrevida, respectivamente ($P < 0,001$). Animais tratados com a dose de 100mg/Kg não apresentaram sobrevida significativa.

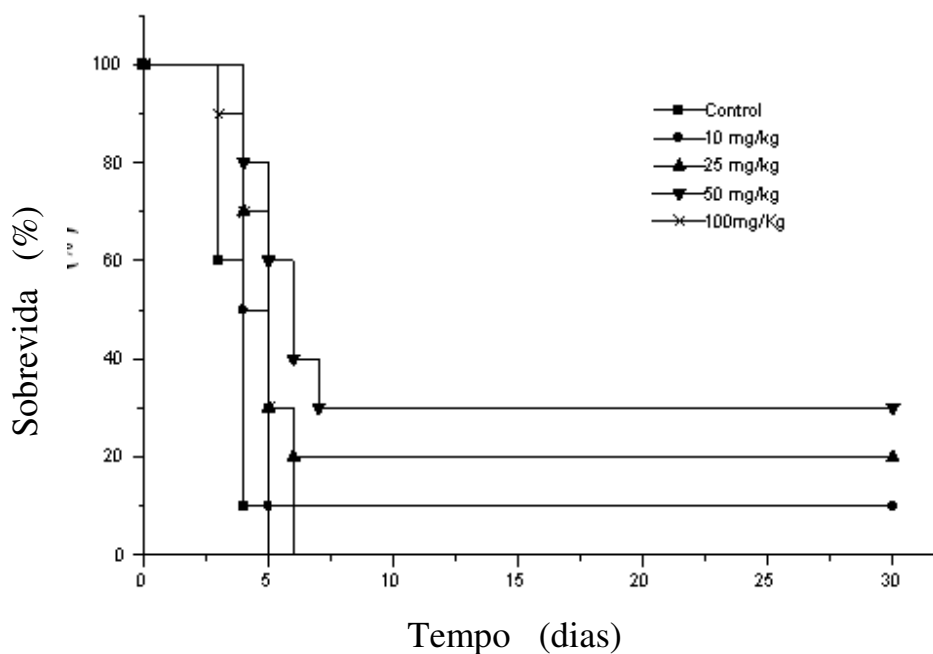


Figura 6. Efeito profilático do extrato de *Angelica sinensis* na sobrevivência de animais tratados com as doses de 10, 25, 50 e 100mg/Kg/dia durante 10 dias consecutivos anteriores a inoculação com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* (6×10^5 bac/animal). Os animais foram observados durante 30 dias. $P < 0,001$ para as doses de 10, 25, 50 e 100mg/Kg em relação ao grupo controle (tratado com água estéril durante 10 dias e infectado), $n = 20$, Curva de Kaplan-Maier, Teste Log-Rank.

5. Efeitos do EAS sobre os níveis de produção das citocinas INF- γ e TNF- α em animais normais e infectados com uma dose letal de *Listeria monocytogenes*

As figuras 7 e 8 apresentam os níveis de INF- γ e TNF- α obtidos em cultura de macrófagos esplênicos. Este experimento foi realizado apenas com a dose de 50mg/kg (por ser a dose que apresentou melhor eficácia nos experimentos anteriores) e com animais sacrificados 48h após a infecção (tempo em que se observa o pico da infecção). Nota-se que a infecção provoca um aumento nos níveis Das duas citocinas. Um aumento significativo em relação ao grupo infectado é observado no grupo tratado e infectado, resultado consistente com a proteção observada no tratamento preventivo com EAS durante a sobrevida e com o maior número de CFU-GM na medula óssea (Fig. 2).

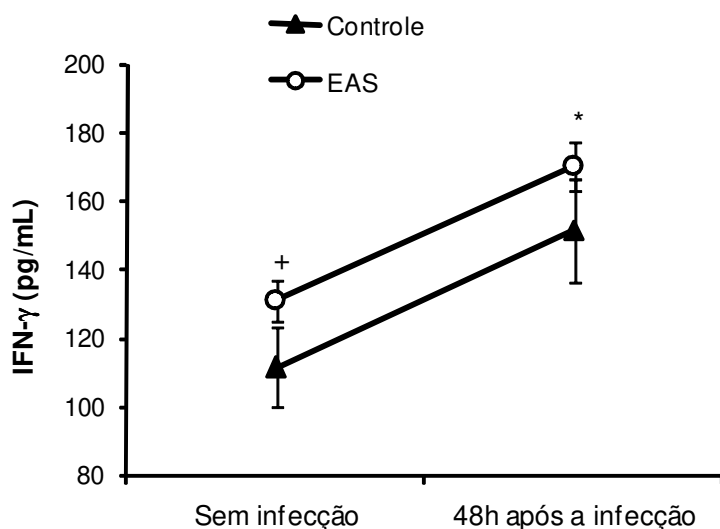


Figura 7. Efeitos do tratamento com a dose de 50mg/Kg do extrato de *Angelica sinensis* (EAS) sobre os níveis de INF- γ em cultura de macrófagos esplênicos de animais normais e infectados com 5×10^3 *Listéria monocytogenes*/animal. Os animais foram tratados durante 10 dias consecutivos com EAS e sacrificados 48h após a infecção. O grupo controle recebeu água estéril. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão obtidos de 6 animais por grupo. + $P < 0,001$ em relação ao controle não infectado. * $P < 0,001$ em relação ao controle não infectado e infectado 48h.

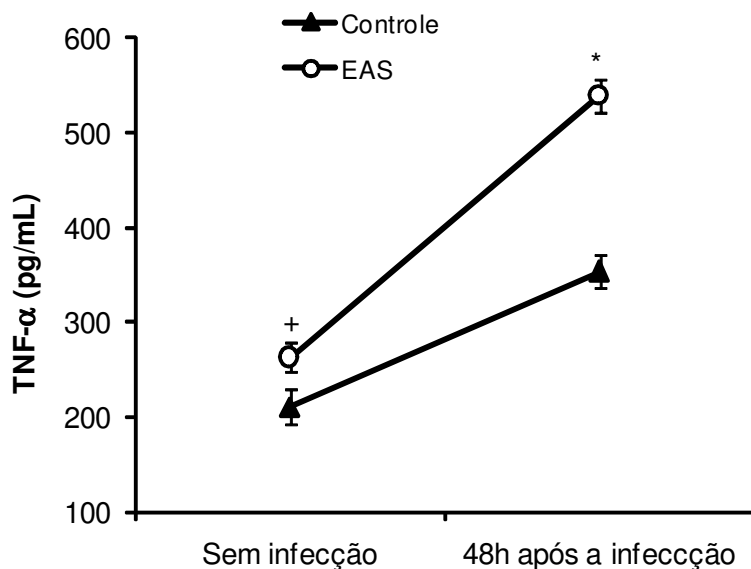


Figura 8. Efeitos do tratamento com a dose de 50mg/Kg do extrato de *Angelica sinensis* (EAS) sobre os níveis de TNF- α em cultura de macrófagos esplênicos de animais normais e infectados com 5×10^3 *Listéria monocytogenes*/animal. Os animais foram tratados durante 10 dias consecutivos com EAS e sacrificados 48h após a infecção. O grupo controle recebeu água esteril. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão obtidos de 6 animais por grupo. + $P < 0,001$ em relação ao controle não infectado. * $P < 0,001$ em relação ao controle não infectado e infectado 48h.

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 demonstram 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 modelo eficaz 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, observa-se também esplenomegalia e um elevado nível de fatores estimuladores de colônias no soro (CSFs) (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 5×10^3 *Listeria monocytogenes* por animal, uma significativa redução do número de CFU-GM da medula óssea, aumento do 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 10, 25 e 50mg/Kg do extrato da *Angelica sinensis* (EAS) durante 10 dias antes da inoculação da bactéria, preveniu a redução do número de CFU-GM da medula óssea. A hematopoese extramedular também foi prevenida, os números de CFU-

GM permaneceram nos patamares dos animais controles (não-infectados), além disso, o peso do baço de animais tratados com 10, 25 e 50mg/Kg e infectados foi significativamente menor do que o peso observado em animais apenas infectado, sugerindo uma prevenção da esplenomegalia. A potencialização da atividade estimuladora de colônias, relacionada ao pré-tratamento com EAS, foi observada nos 3 tempos após a infecção. Além disso, os animais apenas tratados com EAS nas doses de 10, 25 e 50mg/Kg demonstraram aumento significativo dos CSFs no soro. Esses resultados foram consistentes com o efeito protetor do EAS observado através de um experimento de sobrevida em animais infectados com uma dose letal de 5×10^3 *Listeria monocytogenes* por animal, onde as doses de 10, 25, e 50mg/Kg resultaram respectivamente em 10, 20 e 30% de sobrevida e a dose de 100 mg/Kg não apresentou taxa de sobrevida significativa. Ocorreu um aumento crescente da atividade do EAS onde a dose biológica ativa ótima foi a de 50mg/kg. Para a dose de 100mg/Kg observou-se uma queda na atividade do EAS, sugerindo uma resposta dose-dependente.

O preciso mecanismo pelo qual a *Angélica sinensis* aumenta a taxa de sobrevida dos animais infectados com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* não está totalmente elucidado, mas observa-se que o aumento no número de CFU-GM na medula óssea favorece 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 monocytogenes* 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 monocytogenes* no Balb/c é 100 vezes menor que no C57BL/10 (Cheers *et al.*, 1988).

Estudos na literatura demonstram que a *A. sinensis* além de estimular a produção de CFS também é capaz de estimular a produção de citocinas como TNF- α e INF- γ (Hantano *et al.* 2004; Wang *et al.* 1996; Jean *et al.* 2000; Yang *et al.* 2006) Macrófagos são capazes de interagir com diversos produtos celulares da resposta imune inata e adquirida. Destes produtos, destacam-se as citocinas TNF- α e INF- γ (originalmente chamado fator ativador de macrófago), fundamentais no controle de infecções. TNF- α é uma importante citocina produzida principalmente por macrófagos ativados capaz de reforçar a explosão oxidativa após a fagocitose. INF- γ promove a atração de leucócitos e direciona o crescimento, maturação, e diferenciação de vários tipos celulares, fortalece a atividade das células natural killer (NK) e ativa algumas funções das células B. Juntos TNF- α e INF- γ atuam sinergicamente (Bermudez 1993; Portnoy *et al.* 1989; Schroder *et al.* 2004). Os resultados encontrados na determinação dos níveis de TNF- α e INF- γ em cultura de macrófagos esplênicos estão de acordo com a literatura. Estudou-se apenas a dose de 50mg/Kg (por ser a mais eficaz nos demais experimentos) no ponto mais crítico da infecção (48h após a inoculação de *L. monocytogenes*). O tratamento com o extrato elevou significativamente os níveis de TNF- α e INF- γ do grupo apenas tratado em relação ao grupo controle. O extrato também elevou significativamente os níveis de TNF- α e INF- γ do grupo tratado e infectado em

relação ao grupo apenas infectado. Nesse sentido o animal tratado com a *A. sinensis* encontra-se mais protegido devido a um aumento nos níveis TNF- α e INF- γ antes e depois da infecção.

A produção adicional de CSFs no soro de animais pré-tratados com EAS, em comparação ao grupo somente infectado pode estar contribuindo para a produção e migração dos neutrófilos e macrófagos durante a infecção. Estes resultados sugerem que EAS modula a atividade imune de forma indireta e provavelmente inibe a atividade supressora da LM por induzir um aumento na reserva de progenitores mielóide da medula óssea em consequência de uma liberação ativa de citocinas (CFS, INF- γ e TNF- α).

Visto que, a *Angelica sinensis* preveniu a mielossupressão induzida pela infecção, 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 *Angélica sinensis* (EAS), 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 de animais infectados
- Aumento nos níveis de TNF- α e IFN- γ em cultura de macrófagos esplênicos.
- Aumento na sobrevivência de animais infectados

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bradley R.R., Cuniff P.J., Pereira B.J., Jaber B.L., Hematopoietic effect of Radix angelicae sinensis in a hemodialysis patient. ***Am J Kidney Dis*** 1999; 34:349-54.

Bermudez LE. Differential mechanisms of intracellular killing of *Mycobacterium avium* and *Listeria monocytogenes* by activated human and murine macrophages: the role of nitric oxide. **Clin Exp Immunol** 1993; 91:277–81.

Beuchat LR. *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. **Food Control**, 1996; 7(4/5):223-8.

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

Bone K, Mills S. Principles and practice of phytotherapy: modern herbal medicine. London, UK: Churchill Livingstone, 2000:350-3.

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

Burgess AW, Metcalf D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. **Blood**, 1980; 56(6):947-58.

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

Cheers C, Mckenzie IFC, 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**, 1978; 19(3):763-70.

Cheers C, Mckenzie IFC. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: genetics of listeriosis. **Infection and Immunity**, 1978; 19(3):755-62.

Cheers C, Stanley ER. 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**, 1988; 56(11):2972-78.

Chen SG, Li CC, Zhuang XX. Protective effects of *Angelica sinensis* infection on myocardial ischemia/ reperfusion injury in rabbits. **Zhongguo Zhong Xi Yijil He Za Zhi**, Aug 1995; 15 (8):486-8.

Chirigos MA. Immunomodulators: Current and future development and application. **Thymus**, 1992; S7:19.

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

Conlan JW, North RJ. 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**, 1994; 179:259-68.

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

Czuprynski CJ, Haak-Frendscho M. Non-specific resistance mechanisms to listeriosis: implications for experimental and naturally occurring infection. **Immunological Reviews**, 1997; 158:47-56.

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

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

Dermarderosian A, Beutler J. eds. The Review of Natural Products. St. Louis, MO; Facts and comparisons publishing group; 2004.

Ding H, Peng R, Yu J. Modulation of *Angelica sinensis* polysaccharides on the expression of nitric oxide synthase and Bax, Bcl – 2 in liver of immunological liver – injured mice. **Zhonghua Gam Zang Bing Za Zhi**, July 1, 2001; 9 suppl: 50-2.

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

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

Green LC, Luzuriaga KR, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young RV, Tannenbarum SR, Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci*, 78(12): 7764-7768, 1981.

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

Han G, Zhou MJ, Zhang MS, Cao Z, Xie CH, Zhou FX, Peng M, Zhang WJ. *Angelica sinensis* down-regulates hydroxyproline and tgfb1 and provides protection in mice with radiation induced pulmonary fibrosis. **Radiation Research**, 2006; 165:546-52.

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

Hatano R, Takano F, Fushiya S, Michimata M, Tanaka T, Kazama I, Susuki M, Matsubara M. Water soluble extracts from *Angelica acutiloba* kitagawa enhance hematopoiesis by activating immature erythroid cells in mice with 5-fluorouracil – induced anemia. **Exp Hematol**, 2004; 32:918-24.

Hou YZ, Zhao GR, Yang J, Yuan YJ, Zhu GG, Hiltunen R. Prolective effect of *Lingusticum Chuanxiong* and *Angelica sinensis* on endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide. **Life Science**, Aug 2004; 75 (14):1775-86.

Hu XM. Editor, Encyclopedia of isoteric prescriptions in traditional chinese medicine surgery/Bone injury. Taipei. **Holiday Press**, 1992. p.295-368. V. 4.

Jean YJ, Han SB, Ahn KS, Kim HM. Differential activation of murine macrophages by angelan and LPS. **Immunopharmacology**, 2000; 49:275-84.

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

Jin Y, Dons L, Kristensson K., Rottenberg ME. Colony-stimulating factor 1-dependent cells protect mice against systemic infection with *Listeria monocytogenes* but facilitate neuroinvasion. **Infectlon and Immunity**, 2002; 70(8):4682-86.

Kagi D, Ledermann B, Burki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. **Annual Reviews of Immunology**, 1996; 14:207-32.

Kaufmann SHE, Emoto M, Szalay G, Barsig J, Flesch IEA. Interleukin-4 and listeriosis. **Immunological Reviews**, 1997; 158:95-105.

Kaufmann SHE. Immunity to intracellular microbial pathogens. **Immunology Today**, 1995; 16(7):338-42.

Kayashima S, Tsuru S, Hata N, Rokutanda M. The therapeutic effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on the protection against *Listeria* infection in SCID mice. **Immunology**, 1993; 80:471-6.

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

Liu SP, Dong WG, Wu DF, Luo HS, Yu JP. Protective effect of *Angelica sinensis* polysaccharide on experimental immunological colon injury in rats. **World J Gastroenterol**, Dec 2003; 9 (12):2786-90.

Lu XH, Liang H, Zhao YX. Isolation and identification of the lingustilide compounds from the root of *Angelica sinensis*. **Zhong Yao Za Zhi**, 2003; 28:423-5.

Mackaness GB. Cellular resistance to infection. **Journal of Experimental Medicine**, 1962; 116:381-407.

Mackaness GB. The immunological basis of acquired cellular resistance. **Journal of Experimental Medicine**, 1964; 120:105-20.

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

Masihi KN. Immunomodulators in infectious diseases: panoply of possibilities. **International Journal of Immunopharmacology**, 2000; 22:1083-91.

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

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

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

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

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

Mielke MEA, 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**, 1997; 158: 79-93.

Miki K, Mackaness GB. The passive transfer of acquired resistance to *Listeria monocytogenes*. **Journal of Experimental Medicine**, 1964; 120:93-103.

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

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

Monograph. *Angelica sinensis*. **Altern Med Rev**, Dec 2004; 9 (4):429-33.

Nomura T, Kawamura I, Isuchiya K, Kohda C, Baba H, Ito Y, Kimoto T, Watanabe I, Mitusuyama 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**. 2002; 70(3):1049-55.

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

Pamer EG, Sijts AJAM, Villanueva MS, Busch DH, Vijn S. MHC class I antigen processing of *Listeria monocytogenes* proteins: implications for dominant and subdominant CTL responses. **Immunological Reviews**, 1997; 158:129-36.

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

Portnoy DA, Schreiber RD, Connelly P, Tilney LG. Gamma interferon limits access of *Listeria monocytogenes* to the macrophage cytoplasm. **J Exp Med** 1989;170:2141–6.

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

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

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

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

Queiroz MLS, Rodrigues APO, Bincoletto C, Figueiredo CAV, Malacrida, S. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with

Listeria monocytogenes. **Internacional Immunopharmacology**, 2003; 3:889-900.

Rates SMK. Plants as source of drugs. **Toxicon**. 2001; 39:603-13.

Rescigno M, Granucci F, Citterio S, FOTI M, Ricciardi-Castagnoli P. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. **Immunology Today**, 1999; 20(5):200-03.

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

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **J Leukoc Biol** 2004; 75: 163.

Sheng Y, Pero RW, Wagner H. Treatment of chemotherapy-induced leukopenia in a rat model with aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Phytomedicine**, 2000; 7(2):137-43.

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**, 1995; 160:211-16.

Spelman K, Burns J, Nichols D, Winters N, Ottersberg S, Tenborg M. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. **Altern Med Rev**, 2006; 11(2):128-50.

Sun Y, Tang J, Gu X, Li D. Soluble polysaccharides from *Angelica sinensis* (oliv.) Diels: Preparation, characterization and bioactivity. **Int J Biol Macromol**, Sep. 2005; 36 (5):283-9.

Tsai NM, Lin SZ, Lee CC, Chen SP, Su HC, Chang WL, Harn MJ. The antitumor effects of *Angelica sinensis* on malignant brain tumors in vitro and in vivo. **Clin Cancer Res**, May 2005; 11 (9):3475-84.

Unanue ER. Why listeriosis? A perspective on cellular immunity to infection. **Immunological Reviews**, 1997a; 158:5-9.

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

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

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

Wang M, Jia M. Advances in the study on chemical constituents of *Angelica sinensis* dahurica. **Zhong Yao Cai** 2002; 25:446-9.

Wang Y, Zhu B. The effect of Angelica polysaccharide proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cell. **Zhonghua Yixue Zazhi**, 1996; 76:363-6.

Wing EJ, Barczynski LC, Waheed A, Shadduck RK. Effect of *Listeria monocytogenes* infection on serum levels of colony-stimulating factor and number of progenitor cells in immune and nonimmune mice. **Infection and Immunity**, 1985; 49(2):325-28.

Wing EJ, Waheed A, Shadduck RK. Changes in serum colony-stimulating factor and monocytic progenitor cells during *Listeria monocytogenes* infection in mice. **Infection and Immunity**, 1984; 45(1):180-84.

Wood PR, 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**, 1986; 99:160-9.

Xiaoping C, Jianghua C, Ping Z, Jizeng D. *Angelica* stimulates proliferation of murine bone marrow mononuclear cells by the MAPK pathway blood-cells. **Molecules and Diseases**, 2006; 36:402-5.

Yang Q., Populo SM, Zhang J, Yang G, Kodama H. Effect of *Angelica sinensis* on the proliferation of human bone cells. **Clin Chim Acta**, Oct 2002; 324 (1/2):89-97.

Yang T, Jia M, Meng J, Wu H, Mei Q. Immunomodulatory activity of polysaccharide isolated from *Angelica sinensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2006; 39:179-84.

Ye YN, Koo MW, Li Y, Matsui H, Cho CH. *Angelica sinensis* modulates migration and proliferation of gastric epithelial cells. **Life Sciences**, Jan 2001; 68 (8):961-8.

Ye YN, Liu ES, Li Y, So HL, Cho CCM, Sheng MP, Lee SS, Cho CH. Protective effect of polysaccharides – enriched fraction from *Angelica sinensis* on hepatic injury. **Life Sciences**, Jan 2001; 69:637-46.

Ye YN, Liu ES, Shin VY, Koo MW, Wei EQ, Matsui H, Cho CH. A mechanistic study of proliferation induced by *Angelica sinensis* in a normal gastric epithelial cell line. **Biochem Pharmacol**, Jun 2001; 61 (11):1439-48.

Ye YN, So HL, Liu ESL, Shin VY, Cho CH. Effect of polysaccharides of *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing. **Life Sciences**, Jan 2003; 72 (8):925-32.

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

Zhan Y, Lieschke GJ, Grail D, Dunn AR, Cheers C. Essential roles for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF in the

sustained hematopoietic response of *Listeria monocytogenes*-infected mice.

Blood, 1998; 91(3):863-69.

Zhu DP, Don Quai, Am J. **Chin Med**, 1987; 15:117-25.