

CRISTIANE OKUDA TORELLO



**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO PADRONIZADO
DE *Rhodiola rosea* L. NA RESPOSTA
IMUNOHEMATOPOÉTICA DE CAMUNDONGOS
INFECTADOS COM *Listeria monocytogenes***

CAMPINAS

Unicamp

2009

CRISTIANE OKUDA TORELLO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO
PADRONIZADO DE *Rhodiola rosea* L. NA RESPOSTA
IMUNOHEMATOPOÉTICA DE CAMUNDONGOS
INFECTADOS COM *Listeria monocytogenes***

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ

CAMPINAS

Unicamp

2009

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

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

T631a Torello, Cristiane Okuda
Avaliação dos efeitos do extrato padronizado de *Rhodiola rosea* L. na resposta imunohematopoética de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* / Cristiane Okuda Torello. Campinas, SP: [s.n.], 2009.

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

1. Hematopoese. 2. Células estromais. 3. Células NK. 4. *Listeria monocytogenes*. 5. Citocinas. I. Queiroz, Mary Luci de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Evaluation of *Rhodiola rosea* L. extract on the immunohematopoietic response of *Listeria monocytogenes* infected mice.

Keywords:

- Hematopoiesis
- Stromal cells
- NK Cells
- *Listeria monocytogenes*
- Cytokines

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Profª. Drª. Mary Luci de Souza Queiroz

Profª. Drª. Ivani Aparecida de Souza

Profº. Drº. Miguel Arcanjo Areas

Profº. Drº. Hélio dos Santos Dutra

Profª. Drª. Denise Fecchio

Data da defesa: 30-07-2009

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Cristiane Okuda Torcello

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

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Hélio dos Santos Dutra

Hélio dos Santos Dutra

Professor (a) Doutor (a) Denise Fecchio

Denise Fecchio

Professor (a) Doutor (a) Ivani Aparecida de Souza

Ivani Aparecida de Souza

Professor (a) Doutor (a) Miguel Arcanjo Areas

Miguel Arcanjo Areas

Professor (a) Doutor (a) Mary Luci de Souza Queiroz

Mary Luci de Souza Queiroz

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

Data: 30/07/2009



Dedico este trabalho...

*Aos meus queridos
esposo e filho,
ROGÉRIO e RAFAEL,
por todo amor
e paciência dedicados a mim,
pelo companheirismo e incentivo
à realização deste trabalho
e em todos os momentos
da minha vida.*

*Aos meus queridos pais,
JOANA e KIYOSHI,
pelo amor incondicional,
por todo incentivo ao estudo e crescimento profissional,
e por estarem presentes
em todos os momentos da minha vida.*

*Aos meus irmãos,
PAULA, MÁRCIA e JUNIOR,
por todo companheirismo e
apoio durante todos estes anos.*

A vocês todo o meu amor e gratidão....

AGRADECIMENTOS



A Deus, pela existência e, em Sua sabedoria, por guiar meus passos segundo as minhas necessidades e merecimento, e por me fortalecer a cada nascer do sol, na busca do progresso espiritual.

À querida Professora Mary, orientadora deste trabalho, pela oportunidade e por todo incentivo ao meu crescimento científico e intelectual, mas, sobretudo pela amizade e confiança dedicados a mim, por todos os ensinamentos pessoais e pelos bons momentos que passamos juntas.

Aos meus sogros, Bernadete e Antonio Carlos, pelo incentivo ao desenvolvimento deste trabalho e por toda ajuda durante estes anos.

Aos meus cunhados Benício, Bruna, Camila, Eliezer e Fábio, pelos momentos de alegria que compartilhamos em família.

Aos queridos sobrinhos Enzo e Larissa, pela grande alegria que proporcionaram com sua chegada à família.

Aos meus queridos avós, João e Albertina, pelos maravilhosos ensinamentos e por todo amor dedicado a mim.

À tia Kimiko, por sempre me incentivar ao estudo e aperfeiçoamento, e também pela presença amiga.

A todos os parentes e amigos.

Aos queridos Sueli e Raphael, técnicos do laboratório, mas sobretudo grandes amigos, por toda contribuição, apoio e amizade.

Aos queridos amigos do laboratório – Aline, Gustavo, Samara e Simone – que já trilharam esta caminhada e deixaram muita saudade, por todos os momentos que passamos juntos, pela amizade e apoio incondicional.

Aos queridos amigos do laboratório – Mariana, Michelle, Andrana, Miriam, Julia, Marcos, Jéssica, Rejane e Cecília – que ainda continuam esta jornada, pelos momentos importantes de aprendizagem que compartilhamos no convívio diário, tornando nosso trabalho mais alegre e compensador.

Aos queridos alunos de iniciação científica – Carol, Éder, Isabel, Luciana, Marcela e Yvonne – pela amizade e carinho, e pela oportunidade de crescimento através da colaboração no desenvolvimento dos projetos.

Ao Departamento de Farmacologia e ao Hemocentro pela infra-estrutura e por todo aprendizado teórico e prático.

A Empresa Chemyunion, em especial a Carmem, Gustavo e Samara, pela colaboração, apoio a este trabalho e oportunidade profissional.

À Dra. Angélica Zaninelli Schreiber, Dr. Carlos Emílio Levy, Dra. Shirley Gonçalves e a todos os funcionários do Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP pela contribuição prática neste trabalho.

Ao Laboratório de Marcadores Celulares e Citologia do Hemocentro, em especial à Fernanda, pela contribuição técnica.

A UNIMEP, por todo aprendizado durante a graduação, possibilitando o início deste trabalho.

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

A todos aqueles que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.



**“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.**
(Fernando Pessoa)

**“Ainda que eu falasse a língua dos homens
E falasse a língua dos anjos
Ainda que tivesse o dom da profecia,
Que penetrasse todos os mistérios,
e tivesse perfeita ciência de todas as coisas,
Sem amor, eu nada seria...”**
(Coríntios 1, 13)

	Pág.
RESUMO	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1- INTRODUÇÃO.....	20
1.1- <i>Rhodiola rosea</i> L.	22
1.2- Modelo experimental de Listeriose murina.....	26
2- OBJETIVOS.....	31
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1- Extrato de <i>Rhodiola rosea</i>	34
3.2- Animais.....	34
3.3- <i>Listeria monocytogenes</i>	34
3.4- Tratamento.....	35
3.5- Metodologia da cultura clonal de precursores hematopoéticos (CFU-C) da medula óssea e do baço de camundongos.....	36
3.6- Obtenção do soro dos animais para avaliação da presença de atividade estimuladora de colônias (CSA).....	37
3.7- Cultura líquida de longa duração de células da medula óssea (LTBMC).....	38

3.8-	Atividade citotóxica de células <i>natural killers</i>.....	39
	3.8.1- Preparo de células-alvo.....	39
	3.8.2- Preparo das células efetoras.....	39
3.9-	Análise quantitativa de células <i>natural killer</i> no baço.....	40
3.10-	Protocolo de incubação de células esplênicas para posterior dosagem de citocinas.....	41
3.11-	Quantificação de citocinas IL-1α, IL-6, IL-10, TNF-α e IFN-γ.....	41
3.12-	Avaliação da sobrevida.....	42
3.13-	Análise estatística.....	42
4-	RESULTADOS.....	43
4.1-	Avaliação dos efeitos do extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) na sobrevida de animais infectados com dose letal de <i>L. monocytogenes</i>.....	44
4.2-	Avaliação dos efeitos de diferentes doses do extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) sobre o número de progenitores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea e do baço de animais normais e infectados com <i>L. monocytogenes</i>.....	46
4.3-	Avaliação dos efeitos de diferentes doses do extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) sobre a atividade estimuladora de colônias hematopoéticas (CSA) do soro de animais normais e infectados com <i>L. monocytogenes</i>.....	49

4.4-	Avaliação dos efeitos de diferentes doses do extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) sobre a cultura líquida de longa duração de células de medula óssea (LTBMC) de animais normais e infectados com <i>L. monocytogenes</i>	51
4.4.1-	Número total de progenitores de granulócito e macrófago (CFU-GM) em LTBMC.....	51
4.4.2-	Produção de IL-1 α e IL-6 no sobrenadante da LTBMC.....	53
4.5-	Efeitos de diferentes doses do extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) sobre a atividade citotóxica de células <i>natural killers</i> (NK).....	57
4.6-	Efeitos do extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) sobre a porcentagem de células NK+ no baço de animais normais e infectados com <i>L. monocytogenes</i>	59
4.7-	Efeitos do extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) sobre a produção de citocinas em culturas de células esplênicas.....	61
5-	DISCUSSÃO.....	65
6-	CONCLUSÃO.....	80
7-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
8-	ANEXOS.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS

CFU-C	Cultura clonal de precursores hematopoéticos
CFU-GM	Progenitores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos
CSA	Atividade estimuladora de colônias
CSF	Fatores estimuladores de colônias
ERR	Extrato de <i>Rhodiola rósea</i>
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ip	Intraperitonealmente
kg	Quilograma
LM	<i>Listeria monocytogenes</i>
LTBMC	Cultura líquida de longa duração de células hematopoéticas
MHC	Moléculas do complexo de histocompatibilidade
mg	Miligrama
NK	<i>Natural killers</i>
TA	Temperatura ambiente
T CD4	Linfócitos T auxiliares
T CD8	Linfócitos T citotóxicos
Th	T helper
TNF	Fator de necrose tumoral

	Pág.
Figura 1 <i>Rhodiola rosea</i> L.....	22
Figura 2 Estrutura química do <i>salidroside</i> , <i>rosin</i> , <i>rosarin</i> e <i>rosavin</i>	24
Figura 3 Listeriose humana.....	27
Figura 4 Disseminação da <i>Listeria monocytogenes</i>	28
Figura 5 Colônias de <i>L. monocytogenes</i> , em ágar sangue.....	35
Figura 6 Curva de sobrevivência de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 mg/ kg de extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) e infectados com dose letal de <i>L. monocytogenes</i>	45
Figura 7 Número de progenitores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea de camundongos BALB/ c pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 50, 100, 250 e 500 mg/ kg de extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) e infectados com dose subletal de <i>L. monocytogenes</i>	47
Figura 8 Número de progenitores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) no baço de camundongos BALB/ c pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 50, 100, 250 e 500 mg/ kg de extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) e infectados com dose subletal de <i>L. monocytogenes</i>	48
Figura 9 Atividade estimuladora de colônias (CSA) no soro de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 50, 100, 250 e 500 mg/ kg de extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) e infectados com dose subletal de <i>L. monocytogenes</i>	50
Figura 10 Número de progenitores de granulócito e macrófago (CFU-GM) no sobrenadante da cultura líquida de longa duração de células hematopoéticas (LTBMC) de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 50, 100, 250 e 500 mg/ kg de extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) e infectados com dose subletal de <i>L. monocytogenes</i>	52

Figura 11	Níveis de IL-1 α no sobrenadante da cultura líquida de longa duração de células hematopoéticas (LTBMC) de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 100 mg/ kg de extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) e infectados com dose subletal de <i>L. monocytogenes</i>	54
Figura 12	Níveis de IL-6 no sobrenadante da cultura líquida de longa duração de células hematopoéticas (LTBMC) de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 100 mg/ kg de extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) e infectados com dose subletal de <i>L. monocytogenes</i>	56
Figura 13	Atividade citotóxica de células <i>natural killers</i> de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 50, 100, 250 e 500 mg/ kg de extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) e infectados com dose subletal de <i>L. monocytogenes</i>	58
Figura 14	Porcentagem de células <i>natural killers</i> no baço de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 100 mg/ kg de extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) e infectados com dose subletal de <i>L. monocytogenes</i>	60
Figura 15	Níveis de TNF- α no sobrenadante da cultura de células esplênicas de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 100 mg/ kg de extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) e infectados com dose subletal de <i>L. monocytogenes</i>	62
Figura 16	Níveis de IFN- γ no sobrenadante da cultura de células esplênicas de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 100 mg/ kg de extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) e infectados com dose subletal de <i>L. monocytogenes</i>	63
Figura 17	Níveis de IL-10 no sobrenadante da cultura de células esplênicas de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 100 mg/ kg de extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR) e infectados com dose subletal de <i>L. monocytogenes</i>	64
Figura 18	Hematopoese.....	69



Neste trabalho, investigamos os efeitos do extrato padronizado de *Rhodiola rosea* L. (ERR) sobre a resposta imunoematopoética de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*. Os resultados demonstram que o ERR aumenta a resistência dos animais frente uma dose letal de *Listeria* quando administrado profilaticamente nas doses de 100 e 250 mg/ kg por sete dias consecutivos anteriores à inoculação. Paralelamente, reversão da mielossupressão induzida pela infecção, concomitante ao aumento na atividade de células *natural killers* (NK) e na produção das citocinas TNF- α , IFN- γ e fatores estimuladores de colônias foram observados. Os resultados obtidos demonstram que o ERR compartilha da habilidade de regular positivamente os desequilíbrios hematopoiéticos e imunológicos envolvidos nos estágios iniciais da infecção com *L. monocytogenes*. Estes efeitos podem ser atribuídos à recuperação no equilíbrio da resposta hematopoiética através da produção de IL-1 α e IL-6 pelas células estromais no microambiente medular e também da produção de fatores estimuladores de colônias a partir das 24 horas de infecção, promovendo aumento no número de progenitores de macrófagos e granulócitos na medula óssea. Além disso, a eficácia do ERR também depende do aumento na produção das citocinas TNF- α e IFN- γ , do aumento na atividade funcional das células NK e polarização da resposta celular para Th1. Juntos, estes efeitos contribuem para o aumento na resistência a *L. monocytogenes*.



Abstract

In this work, we have investigated the effects of *Rhodiola rosea* L. extract (ERR) in *Listeria monocytogenes* infected mice. Our results demonstrated that ERR protects mice from a lethal dose of *L. monocytogenes*, when administered prophylactically at 100 and 250 mg/ kg, for seven consecutive days prior to the infection. In addition, prevention of myelosuppression induced by infection, concomitant to increasing natural killers (NK) cells activity and production of TNF- α , IFN- γ and colony-stimulating factors were observed. The results showed that ERR share the ability of regulating positively the hematopoietic and immunological unbalance involved in the initial stages of infection with this pathogen. These effects could be attributed to recovering of the hematopoietic response through the production of IL-1 α and IL-6 by stromal cells in the bone marrow microenvironment and the production of colony-stimulating factors at 24 hours of infection, promoting an increase in the number of granulocytes and macrophages progenitors in the bone marrow microenvironment. Moreover, the efficacy of ERR depends on high levels of TNF- α and IFN- γ , increased NK cells activity and polarization to Th1 response. Together, these effects contribute to increasing resistance to *L. monocytogenes*.



1. INTRODUÇÃO

Há séculos as espécies vegetais são usadas no tratamento de doenças. Plantas representam uma fonte valiosa de produtos farmacêuticos e medicamentos e podem ser consideradas como um sofisticado laboratório de biotecnologia, capaz de produzir uma grande variedade de substâncias farmacologicamente bioativas, com uma ampla variedade de efeitos (BALUNAS e KINGHORN, 2005; RATES, 2001).

Cerca de 25 por cento das preparações farmacêuticas são fabricados a partir de plantas mundialmente (BALUNAS e KINGHORN, 2005; RATES, 2001). Dos 252 medicamentos considerados básicos e essenciais pela Organização Mundial de Saúde, aproximadamente onze por cento são exclusivamente de origem vegetal e um número significativo são drogas sintéticas obtidas a partir de precursores naturais. Exemplos de importantes drogas obtidas a partir de plantas são: a digoxina (*Digitalis* spp.), a quinina e a quinidina (*Chinchona* spp.), a vincristina e a vinblastina (*Catharanthus roseus*), a atropina (*Atropa belladonna*), a morfina e a codeína (*Papaver somniferum*) e mais recentemente, a galantamina (*Galanthus woronowii*), utilizada no tratamento da Doença de Alzheimer (RATES, 2001). Acredita-se que os produtos naturais em geral são importantes fontes de substâncias químicas biologicamente ativas com potencial e aplicabilidade terapêutica.

Nas últimas décadas, o crescente interesse em alternativas terapêuticas para a prevenção e tratamento de doenças, especialmente o uso terapêutico de produtos naturais derivados de plantas, tem aumentado (RATES, 2001). Sendo assim, o estudo de espécies vegetais com atividades imunomoduladoras desempenha um papel relevante na busca de novos compostos farmacologicamente ativos, uma vez que são capazes de aumentar a imunidade do organismo contra infecções através das células de defesa, seja pela indução ou restauração das funções imune efectoras. (HENGGE et al., 2001; MASIHI, 2000).

1.1. *Rhodiola rosea* L.

Rhodiola rosea L. (família *Crassulaceae*), também conhecida como “raiz do ártico” ou “raiz dourada” (figura 1), é uma planta utilizada na medicina popular tradicional da Europa e Ásia devido às suas propriedades estimulantes sobre o sistema nervoso, indutora do desempenho físico e mental, antifadiga, antidepressiva e profilática contra afecções respiratórias comuns em regiões de altitudes elevadas (MONOGRAPH, 2002; KELLY, 2001). No entanto, embora tenha sido extensamente estudada na Rússia e Escandinávia por mais de 35 anos, a maioria das pesquisas não está disponível (KELLY, 2001).



Figura 1. *Rhodiola rosea* L. Fonte: <http://www.plant-identification.co.uk/skye/crassulaceae/rhodiola-rosea.htm>.

Incluindo a *Rhodiola rosea*, mais de 200 espécies do gênero *Rhodiola* já foram identificadas, sendo que aproximadamente 20 delas são utilizadas na prática médica tradicional asiática, incluindo *R. alterna*, *R. brevipetiolata*, *R. crenulata*, *R. kirilowii*, *R. quadrifida*, *R. sachalinensis*, *R. imbricata* e *R. sacra* (YOUSEF et al., 2006; KELLY, 2001).

A *R. rosea* cresce em altitudes elevadas das regiões árticas e montanhosas da Europa e Ásia. Atinge em média trinta a setenta centímetros de altura, produz flores amarelas e suas raízes exalam uma fragrância de rosas ao serem cortadas. É utilizada desde épocas remotas por povos indígenas da Sibéria principalmente por suas propriedades adaptógenas, ou seja, pela capacidade de estimular o sistema imunológico, aumentando a resistência do organismo a estressores químicos, físicos e biológicos (GANZERA et al., 2001; KELLY, 2001).

A análise fitoquímica das raízes de *R. rosea* revelaram a presença de uma série de substâncias incluindo flavonóides, taninos, ácidos fenólicos (clorogênico, hidroxicinâmico, gálico), glicosídeos fenilpropanóides (*rosin*, *rosarin* e *rosavin*), glicosídeos feniletanóides (*salidroside* e *tyrosol*), monoterpênos (*rosiridol*, *rosaridin*) e triterpênos (β -sitosterol), bem como outros glicosídeos e ácidos orgânicos. Dentre estes constituintes, os estudos científicos atribuem os efeitos farmacológicos conhecidos dos extratos de *R. rosea* principalmente à presença do *tyrosol*, *salidroside* (p-hidroxifeniletil-O- β -D-glicopiranosídeo) e dos fenilpropanóides *rosin* (cinamil-O- β -D-glicopiranosídeo), *rosarin* (cinamil-(6'-O- α -L-arabinofuranosil)-O- β -D-glicopiranosídeo) e *rosavin* (cinamil-(6'-O- α -L-arabinopiranosil)-O- β -D-glicopiranosídeo), sendo estes três últimos específicos desta espécie e comumente referidos apenas como *rosavins* (MA et al., 2008; TOLONEN et al., 2003; KELLY, 2001; GANZERA et al., 2001; LINH et al., 2000). Atualmente, *rosavins* e *salidroside* (figura 2) são os constituintes fitoquímicos selecionados tanto para a padronização dos extratos como para a caracterização da espécie *Rhodiola rosea* (TOLONEN et al., 2003).

Estudos experimentais têm comprovado atividades antitumoral, anticarcinogênica, cardioprotetora, antioxidante, adaptógena e imunomoduladora. (DIERMEN et al., 2009; WANG et al., 2009; CHEN et al., 2008; DIEAMANT et al., 2008; KWON et al., 2006; MAJEWSKA et al., 2006; KIM et al., 2006; WALKER et al., 2006; KORMOSH et al., 2006; ABIDOV et al., 2003; UDINTSEV e SCHAKHOV, 1991).

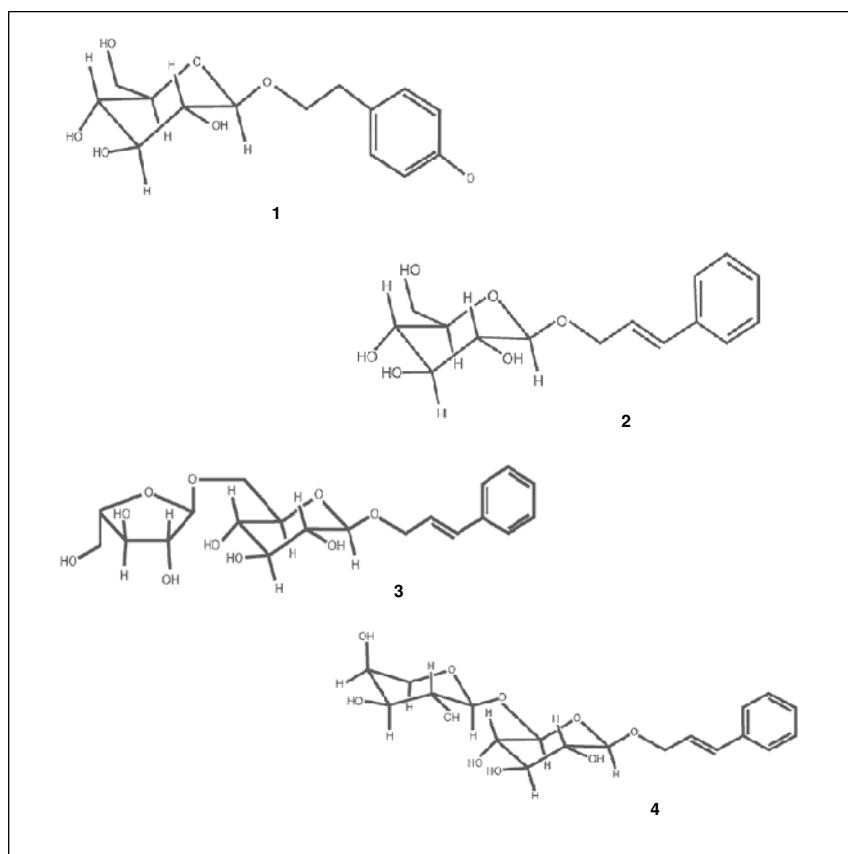


Figura 2. Estrutura química do *salidroside* (1), *rosin* (2), *rosarin* (3) e *rosavin* (4). Fonte: TOLONEN et al., 2003.

MAJEWSKA e colaboradores (2006) relataram que o extrato de *Rhodiola rosea* inibiu o crescimento *in vitro* da linhagem leucêmica HL-60. Além disso, a administração oral do extrato das raízes *R. rosea* protegeu animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich e carcinoma pulmonar de Lewis da mielossupressão induzida pela ciclofosfamida, bem como suprimiu o crescimento do tumor e as metástases (UDINTSEV e SCHAKHOV, 1991). Estudos também mostraram que a *R. rosea* neutraliza reações oxidativas por reduzir radicais de oxigênio livre e peróxido de hidrogênio (CHEN et al., 2008), reduz a glicose sanguínea e a peroxidação lipídica, bem como aumenta a atividade de enzimas antioxidantes como a glutathione redutase, s-transferase, s-peroxidase, catalase e superóxido dismutase, protegendo animais diabéticos do estresse oxidativo (KIM et al., 2006).

Em relação à propriedade adaptógena e imunomoduladora, a administração do extrato de *R. rosea* aumentou a capacidade locomotora de ratos submetidos ao nado forçado (ABIDOV et al., 2003). Atletas profissionais que utilizaram estes extratos para incremento da atividade física apresentaram estimulação dos processos anabólicos na musculatura esquelética e aumento na resistência durante exercício físico máximo (WALKER et al., 2006). Uma redução do estresse e depressão também é atribuída a *R. rosea*, uma vez que desordens emocionais e mentais são aliviadas em função do seu efeito estimulante sobre o sistema nervoso central, por elevar as concentrações de dopamina, noradrenalina e serotonina no cérebro (DIERMEN et al., 2009; SPASOV et al., 2000; DARBINYAN et al., 2000).

Recentemente foi demonstrada atividade antiviral *in vitro* e *in vivo* contra Coxsackievirus B3 pelo *salidroside*, através da modulação na expressão das citocinas fator de necrose tumoral (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , interleucina (IL)-2 e IL-10 (WANG et al., 2009). KORMOSH e colaboradores (2006) demonstraram aumento no número das subclasses celulares T CD3, CD4, CD5 e CD8, e nos níveis de IgG e IgM de pacientes com câncer ovariano submetidas a cirurgia e posterior quimioterapia com cisplatina e ciclofosfamida. Um estudo de nosso grupo também revelou que o extrato de *R. rosea* apresenta atividade imunomoduladora em culturas de queratinócitos humanos após foto-exposição, através do aumento nos níveis das citocinas inflamatórias IL-1 α e TNF- α e redução nos níveis da citocina imunossupressora IL-10 (DIEAMANT et al., 2008).

O objetivo da escolha do extrato de *Rhodiola rosea* padronizado em *rosavins* (3%) e *salidroside* (1%) se deve ao fato dos estudos experimentais realizados com esta espécie adotarem esta padronização e atribuírem as propriedades farmacológicas descritas para os extratos de *Rhodiola rosea* especialmente à presença destes constituintes fitoquímicos.

Neste sentido, diante das propriedades mencionadas desta espécie e do fato de que até o momento não foram descritos estudos em modelo de infecção com

Listeria monocytogenes, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos do ERR sobre a resposta imunoematopoética de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*.

1.2. Modelo experimental de Listeriose murina

A *Listeria monocytogenes* (LM) é uma bactéria gram-positiva, de replicação intracelular, que está presente no solo e na água, e pode ser encontrada de forma assintomática no trato gastrointestinal de animais e do homem. A contaminação com esta bactéria geralmente ocorre pela ingestão de alimentos contaminados como laticínios não pasteurizados ou carnes mal cozidas (COSSART e TOLEDO-ARANA, 2008; COSSART, 2007).

Os primeiros surtos de infecção humana com *Listeria* através de alimentos contaminados aconteceram na década de 80, tornando esta bactéria um dos mais importantes patógenos da época (RAMASWAMY et al., 2007). A incidência de listeriose em indivíduos imunocompetentes é menos freqüente, podendo causar sintomas de gripe e efeitos gastrintestinais brandos, tais como vômitos e diarreias. Entretanto, pode causar infecções severas como septicemia, meningite e meningoencefalite em indivíduos imunocomprometidos, recém-nascidos, idosos e grávidas (COSSART e TOLEDO-ARANA, 2008; COSSART, 2007; RAMASWAMY et al., 2007; BAKARDJIEV et al., 2006), resultando em morte em aproximadamente 25-30 por cento dos casos (RAMASWAMY et al., 2007; HAMON et al., 2006).

O modelo experimental de listeriose murina tem sido extensamente utilizado nas últimas quatro décadas para estudar aspectos básicos da resposta imune celular (COSSART, 2007; PAMER, 2004; PORTNOY et al., 2002; HARTY et al., 2000; NORTH et al., 1997; UNANUE, 1997). Este modelo foi desenvolvido por Mackaness, em 1962, como sendo altamente reprodutível (MACKANESS, 1962) e, devido a sua ampla

caracterização, atualmente é o mais utilizado pelos imunologistas para o estudo dos mecanismos celulares envolvidos na defesa do organismo (COSSART, 2007; ZENEWICZ e SHEN, 2007).

O processo envolvido na resistência a esta bactéria é caracterizado inicialmente pela imunidade inata do hospedeiro, seguida por uma resposta específica, garantindo a erradicação do patógeno (ZENEWICZ e SHEN, 2007; PAMER, 2004). Nos estágios iniciais da infecção, a participação de macrófagos, neutrófilos e células *natural killers* (NK), bem como a produção de IFN- γ e TNF- α , são essenciais para a ativação da resposta necessária ao controle da replicação bacteriana (PAMER, 2004).

A *L. monocytogenes* invade o organismo através das células epiteliais intestinais, mediadas pela proteína de superfície internalina. Após sua passagem pela barreira intestinal, a bactéria se dissemina para outros órgãos como baço e fígado (figura 3), onde é internalizada por fagócitos (PAMER, 2004; GULERIA e POLLARD, 2001; MOCCI et al., 1997; CZUPRYNSKI e HAAK-FRENDSCHO 1997).

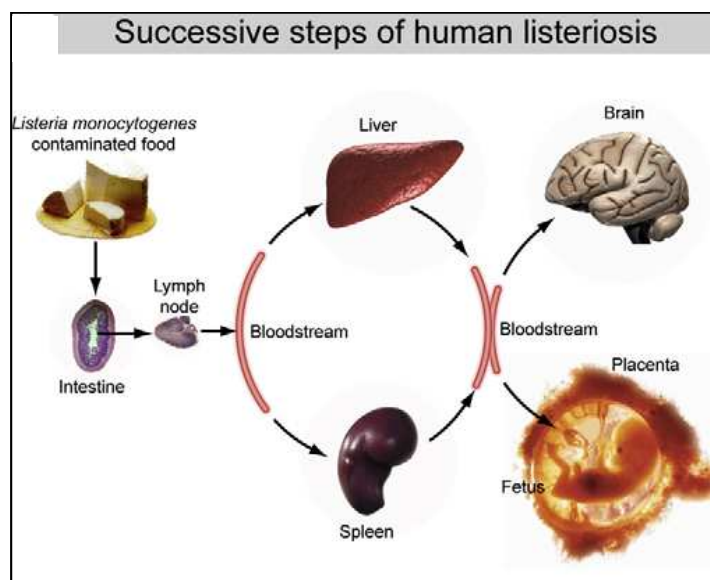


Figura 3. Listeriose humana. Fonte: COSSART e TOLEDO-ARANA, 2008.

Após ser fagocitada, a LM produz uma toxina, a Listeriolisina O, que lisa o fagossoma da célula, permitindo sua saída para o citoplasma, onde ocorre sua proliferação e conseqüente migração para as células adjacentes (figura 4) (PAMER, 2004; NOMURA et al., 2002; COSSART e BIERNE, 2001).

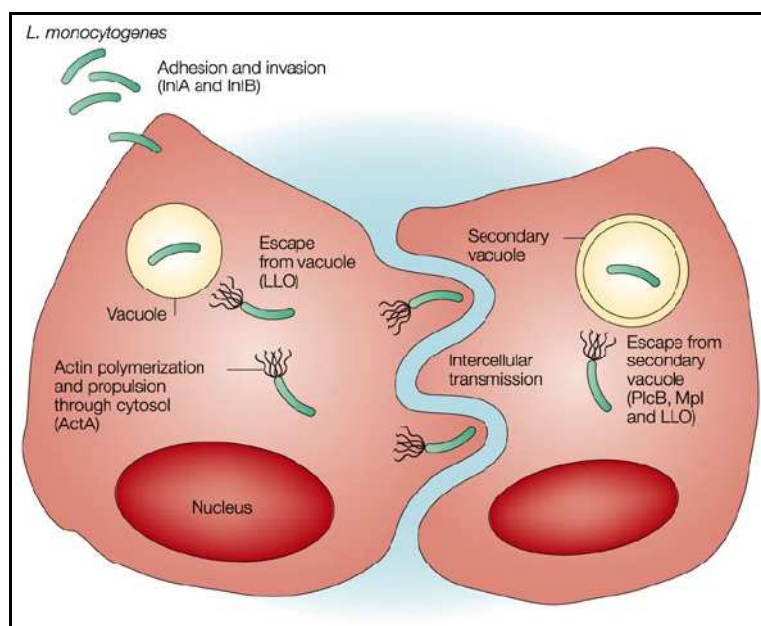


Figura 4. Disseminação da *Listeria monocytogenes*. Fonte: PAMER, 2004.

Neutrófilos são os primeiros tipos celulares a migrarem para o sítio da infecção, promovendo a lise de células infectadas abortando o espalhamento célula-célula da bactéria no fígado (EDELSON e UNANUE, 2000). A destruição destes hepatócitos infectados serve para garantir a exposição da LM para o compartimento extracelular e assim, torná-la susceptível ao ataque dos próprios neutrófilos e macrófagos (UNANUE, 1997). A *Listeria* se replica primariamente em macrófagos que, ao serem infectados, liberam citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), as quais estimulam células NK a secretarem IFN- γ e desenvolverem atividade citotóxica contra as células infectadas (PAMER, 2004; CARRYIN et al., 2004, COSSART e BIERNE, 2001; BRAUN e COSSART, 2000; EDELSON e UNANUE, 2000). Altas concentrações de IFN- γ promovem a ativação de macrófagos aumentando suas propriedades antimicrobianas e

levam a uma maior expressão das moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC). Isto induz a apresentação do antígeno (bactéria) a um segundo sistema de defesa do organismo, as células T, as quais atuam através de uma resposta imune específica para erradicar a infecção (ZENEWICZ e SHEN, 2007; PAMER, 2004).

Os primeiros eventos são essenciais para a sobrevivência, porque, na sua ausência, o crescimento bacteriano ocorre tão rapidamente que camundongos morrem dentro de 72 a 96 horas (PAMER, 2004; BRAUN e COSSART, 2000). No entanto, a resposta que ocorre nos estágios iniciais da infecção envolvendo neutrófilos, macrófagos e células NK não é suficiente para erradicar a infecção, sendo necessária a participação dos linfócitos auxiliares (T CD4+) e citotóxicos (T CD8+) (PAMER, 2004).

As células TCD8+ (linfócitos T citotóxicos) promovem a lise das células infectadas, liberando a bactéria para o ambiente extracelular, favorecendo sua fagocitose. Estas células exercem esta função através de dois mecanismos sinérgicos: (1) liberação das enzimas perforina e granzima contra a célula alvo, e (2) secreção de IFN- γ para a ativação de macrófagos (PAMER, 2004; EDELSON e UNANUE, 2000; UNANUE, 1997; UNANUE, 1996). As células T CD4+, também chamadas T helper (Th), através da produção de citocinas podem se diferenciar em Th1 ou Th2. O IFN- γ liberado pelas células NK junto a IL-12, induzem o perfil Th1 (GULERIA e POLLARD, 2001). As células Th1 sintetizam mais IFN- γ , amplificando a resposta dos macrófagos (NORTH et al., 1997; UNANUE, 1997).

A participação do TNF- α e do IFN- γ é essencial na defesa contra esta bactéria (BERG et al., 2005, ROACH et al., 2005; PAMER, 2004; BUCHMEIER e SCHREIBER, 1985; HAVELL, 1989) e, camundongos nocauteados para estas citocinas sucumbem rapidamente (ROTHER et al., 1993). O TNF- α produzido pelo macrófago ativado atua em sinergismo com o IFN- γ , sendo o IFN- γ fundamental para ativação de

macrófagos e polarização para o perfil Th1 (JANEWAY JUNIOR et al., 2007; PAMER, 2004).

As citocinas IL-4 (IIZAWA et al., 1992) e IL-10 (BISWAS et al., 2008; FLESCHE e KAUFMANN, 1994) apresentam um papel supressor nos estágios iniciais da listeriose. A administração do anticorpo monoclonal anti-IL-4 antes da infecção com *Listeria* produz aumento da resistência dos animais (IIZAWA et al., 1992). Em relação à citocina IL-10, estudos demonstram que o tratamento com IL-10 desativa a função fagocítica e inibe células T CD8+, ocorrendo disseminação da infecção e morte do animal, por indução do perfil supressor Th2 (BISWAS et al., 2008; CARRERO et al., 2006).

Considerando que o estudo da resistência do hospedeiro à infecção com *Listeria monocytogenes* constitui um modelo bastante apropriado para a investigação de mecanismos envolvidos na defesa a este patógeno, neste estudo investigamos o efeito do extrato padronizado de *Rhodiola rosea* sobre a resposta imunohematopoética de camundongos infectados com *L. monocytogenes*.



2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do extrato padronizado de *Rhodiola rosea* nos diversos parâmetros envolvidos na resposta imunohematopoética de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*.

Os parâmetros avaliados foram:

- Sobrevida de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*; Crescimento e diferenciação de progenitores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea e baço;
- Presença de atividade estimuladora de colônias (CSA) no soro;
- Capacidade do estroma medular manter a hematopoese no Sistema de Cultura Líquida de Longa Duração de células hematopoéticas (LTBMC) através da avaliação de:
 - Número de CFU-GM;
 - Produção de IL-1 α e IL-6;
- Atividade citotóxica e análise quantitativa de células *natural killers* no baço dos animais;
- Produção de citocinas do perfil Th1 (TNF- α e IFN- γ) e Th2 (IL-10).



Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Extrato de *Rhodiola rosea* (ERR)

O extrato seco de *Rhodiola rosea* (ERR) padronizado em *rosavins* totais (3%) e *salidroside* (1%) foi fornecido pela Chemyunion Química Ltda (Sorocaba, SP, Brasil) (anexo 1). A análise quantitativa do ERR realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) revelou a presença de *rosavins* totais (aproximadamente 3,0% p/ p) e *salidroside* (aproximadamente 1,0% p/ p) (anexo 2).

3.2. Animais

Para a realização dos experimentos utilizamos camundongos BALB/ c machos, com idade entre seis e oito semanas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Os animais foram mantidos em gaiolas forradas com maravalha estéril, em sala climatizada com ciclos claro-escuro de 12 horas. Ração comercial padrão e água foram fornecidos *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal desta Universidade (anexo 3).

3.3. *Listeria monocytogenes* (LM)

A bactéria LM utilizada para infectar os animais é um cocobacilo gram-positivo, anaeróbio facultativo, móvel por flagelos peritríquios a temperatura ambiente, facilmente cultivável em ágar-sangue (figura 5). Essa cepa foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica (Hospital das Clínicas-UNICAMP).

A bactéria foi mantida em meio de cultura BHI (brain heart infusion, Merck) e incubada por 24-48 horas a 37°C. Os repiques foram feitos em ágar-sangue, e

novamente incubados a 37°C por 24 horas. As colônias obtidas foram diluídas em salina e as concentrações determinadas por espectrofotometria através da escala de McFarland (Vitek Colorimeter).



Figura 5. Colônias de *L. monocytogenes*, em ágar sangue. Fonte: // atlas.medmicro.info.

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. Para a padronização da dose letal e subletal, foi realizado um estudo de sobrevivência, utilizando-se diferentes concentrações da bactéria.

Para a avaliação da sobrevivência dos animais utilizamos uma concentração letal de 1×10^6 microrganismos/ animal. Para o estudo dos parâmetros imunológicos e hematopoéticos utilizamos a dose subletal de 1×10^4 microrganismos/ animal. Ambas as concentrações foram inoculadas intraperitonealmente (ip).

3.4. Tratamento

O tratamento com o ERR foi realizado com as doses de 50, 100, 250 e 500 mg/ kg administrados aos animais por um período de sete dias consecutivos anteriores à inoculação com a bactéria. Todos os parâmetros foram avaliados com estas doses, exceto

as análises de citocinas e citometria de fluxo, para as quais se utilizou apenas a dose de 100 mg/ kg.

Para a realização dos experimentos, o ERR foi diluído em água e administrado por via oral (gavagem) aos animais, os quais foram distribuídos em grupos, conforme descrito a seguir:

- Grupo I: animais controle, sem tratamento;
- Grupo II: animais somente infectados ip com LM;
- Grupo III: animais somente tratados com diferentes doses de ERR;
- Grupo IV: animais tratados com diferentes doses de ERR e infectados ip com LM.

O sacrifício dos animais foi feito por deslocamento cervical 24, 48 e 72 horas após a infecção.

3.5. Metodologia da cultura clonal de precursores hematopoéticos (CFU-C) da medula óssea e do baço de camundongos

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, fez-se a assepsia com álcool 70%. A seguir, expôs-se o fêmur, removeu-se a cartilagem sobre o orifício da extremidade distal e cortou-se o osso na junção superior. A medula foi transferida com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo RPMI-1640 (Cultilab). Os baços foram removidos assepticamente, lavados com salina estéril e preparados como suspensões celulares em meio RPMI com o auxílio de um macerador. As suspensões foram mantidas no gelo. O número de células na suspensão foi contado em câmara hemocitométrica após diluição 1:10 das células em solução de azul de tripan 0,2%.

Preparou-se o meio mais ágar (Bacto-ágar, Difco), conforme descrito abaixo:

- 30% de meio DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium, Sigma) duas vezes concentrado;
- 20% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab);
- 50% de ágar (concentração final 0,6 %, Bacto-ágar, Difco).

A seguir, adicionou-se o volume apropriado de células da medula (1×10^5 células/ mL) ou do baço (2×10^5 células/ mL) e distribuíram-se volumes de 2 mL em cada placa de Petri (35mm), as quais já continham o estímulo apropriado (100µL do fator estimulador de colônias GM-CSF na concentração final 0,5 ng/ mL; Sigma, Cat. G0282). Incubou-se por sete dias a 37° C em presença de 5% de CO₂ no ar e a seguir contou-se o número de colônias em microscópio de dissecação com aumento de 40X. Para o estudo morfológico, as colônias foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (v/ v) e coradas com Luxol fast blue/ hematoxilina (METCALF, 1984).

3.6. Obtenção do soro dos animais para avaliação da presença de atividade estimuladora de colônias (CSA)

O sangue dos animais dos grupos experimentais foi coletado por punção cardíaca, separado em “pools”, centrifugado para obtenção do soro e armazenado a – 20°C. A atividade estimuladora de colônias no soro dos animais em questão foi avaliada pela capacidade promotora do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea de animais normais.

De acordo com VAN DEN ENGH e BOL (1975), a menor concentração capaz de estimular o crescimento de colônias é considerada como 1 unidade de CSF/ mL.

A capacidade de estimular a formação de colônias de granulócitos e macrófagos foi testada em cultura semi-sólida, da mesma forma que a descrita no item 3.5. Os valores foram expressos em unidades por mL e determinados a partir da curva

de titulação do fator estimulador de colônias (GM-CSF). De acordo com a curva de titulação, a menor concentração capaz de estimular o crescimento de colônias foi 0,15 ng/ mL.

3.7. Cultura líquida de longa duração de células hematopoéticas (LTBMC)

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical e remoção da medula óssea, as células da medula óssea e do estroma medular foram transferidas com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo 10 mL de meio completo, o qual consiste de: RPMI-1640 (Sigma) suplementado com L-glutamina, 20% de soro equino (Sigma), 1% de uma solução de hidrocortisona (10^{-4} M) e antibióticos.

Esta suspensão de células (1×10^7) foi transferida para garrafas de cultura (6 frascos de 10 mL/ grupo) por 3 semanas a 37 °C na presença de 5% de CO₂. Semanalmente, estas células foram alimentadas através da remoção de 50% do meio saturado e adição do mesmo volume de meio RPMI completo.

Na quarta semana (tempo necessário para confluência das células do estroma), após retirarmos 50% do sobrenadante, as culturas foram repovoadas com 50% de meio completo contendo células da medula óssea e do estroma medular dos fêmures de animais da mesma idade e submetidos ao mesmo protocolo de tratamento. Este repovoamento celular é necessário para que as células hematopoéticas mais imaturas possam agora se alojar na capa de células aderentes e iniciar a hematopoese *in vitro*.

A partir da quinta semana foram iniciados os ensaios de CFU-C a partir das células do sobrenadante das culturas. A cada sete dias, foram coletados 5 mL do sobrenadante. Este volume foi centrifugado (10 minutos/ 1500 rpm) e o sobrenadante foi congelado a -20°C para posterior quantificação das citocinas IL-1 α e IL-6. O botão celular foi ressuspensionado em meio RPMI, e após a contagem do número de células

viáveis em câmara hemocitométrica, as mesmas foram submetidas ao protocolo de cultura clonal de precursores hematopoéticos (CFU-C) descrito anteriormente.

3.8. Atividade citotóxica de células *natural killers* (NK)

Para este ensaio foram utilizadas células tumorais YAC-1. Esta linhagem é uma sublinhagem do linfoma de células T murino YAC (induzido pelo vírus Moloney), adaptado para crescer em cultura líquida. Células YAC-1 incorporam o isótopo cromo-51 (^{51}Cr), que se liga a proteínas. As células NK (células efetoras), ao serem colocadas em contato com as células-alvo (YAC-1), promovem a lise e liberação do cromo para o sobrenadante da cultura. A atividade citotóxica das células NK é proporcional à quantidade de cromo liberada no meio.

3.8.1. Preparo de células-alvo

A linhagem tumoral YAC-1 foi mantida em cultura a 37°C e 5% de CO_2 . Para o ensaio, 5×10^6 células YAC-1 foram lavadas duas vezes com meio RPMI-1640 (Cultilab). Ressuspendeu-se o precipitado com 0,2 mL de soro bovino fetal (SBF, Cultilab). A seguir, adicionou-se 100 Ci de cromato de sódio (IPEN) e incubou-se em banho-maria a 37°C sob agitação periódica por noventa minutos. Lavou-se duas vezes e ressuspendeu-se em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab) a uma concentração final de 1×10^5 células/ mL.

3.8.2. Preparo das células efetoras

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, o baço foi removido e macerado cuidadosamente. As células mononucleares foram separadas em gradiente Ficoll-Hypaque ($d=1,089$; Sigma) e lavadas em RPMI-1640 (Cultilab)

suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab). A seguir, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio RPMI-1640 (Cultilab) e incubadas em placas de Petri por 2 h em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, as células não aderentes foram lavadas com RPMI e ressuspensas a uma concentração de 5x10⁶ células/ mL.

Distribuíram-se 0,1 mL da suspensão em placas de microcultura fundo em forma de U (Corning, New York, USA) com reserva de três orifícios para a lise máxima (0,1 mL de detergente diluído 1:2) e outros três para a lise espontânea (0,1 mL de SBF). As células-alvo previamente marcadas foram distribuídas (0,1 mL) nos orifícios de reação e controles na proporção 50 células efetoras:1 células alvo. As placas foram centrifugadas por 5 minutos, a 800 rpm e em seguida incubadas a 37°C, por 4 h em estufa com 5% de CO₂. Após este período de incubação, centrifugou-se a placa por 10 minutos a 1500 rpm e transferiu-se 0,1 mL do sobrenadante para tubos plásticos. A leitura foi feita em contador gama (Gamma Counter 5500 Beckmann, Irvine, USA).

Cálculo da porcentagem de lise específica:

$$\% \text{ lise específica} = \frac{\text{teste} - \text{lise espontânea}}{\text{lise máxima} - \text{lise espontânea}} \times 100$$

3.9. Análise quantitativa de células *natural killers* (NK) no baço

Baços de camundongos foram coletados assepticamente, macerados e homogeneizados em meio RPMI-1640 (Cultilab) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab) 24, 48 e 72 horas após a inoculação da bactéria. Células mononucleares foram obtidas adicionando-se tampão de lise (NH₄Cl 0,85% - Tris 15mM, pH 7,2) ao botão celular previamente concentrado. A seguir, as células foram centrifugadas e contadas em câmara hemocitométrica. Um total de 1x10⁶ células por amostra foram marcadas com anticorpos conjugados específicos para NK1.1 por 20

minutos e a leitura foi obtida pela análise de 10.000 células/ amostra em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). As análises foram efetuadas através do programa CellQuest.

3.10. Protocolo de incubação de células esplênicas para posterior dosagem de citocinas

Baços de camundongos foram coletados assepticamente, macerados e homogeneizados em meio RPMI-1640 (Cultilab) 24, 48 e 72 horas após a inoculação da bactéria. Células mononucleares foram obtidas adicionando-se tampão de lise (NH_4Cl 0,85% - Tris 15mM, pH 7,2) ao botão celular previamente concentrado. Após lavagem, ressuspendeu-se em meio RPMI-1640 (Cultilab) suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab). Em placa de cultura de 24 poços (Corning) foram adicionados 1×10^5 células/ mL em presença de solução de Concavalina A ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma) em cada poço. As placas foram incubadas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO_2 . Após 48 horas, o sobrenadante foi coletado e congelado a -20°C para posterior dosagem de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ e IL-10.

3.11. Quantificação de citocinas IL-1 α , IL-6, IL-10, $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$

As concentrações de IL-1 α , IL-6, IL-10, $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$, foram quantificadas através do método imunoenzimático (ELISA sanduíche) utilizando-se kits específicos para cada citocina (DuoSet, R&D System, Minneapolis, IL-1 α / IL-1F1 Cat. DY400, IL-6 Cat. DY406, IL-10 Cat. DY417, $\text{TNF-}\alpha$ / TNFSF1A Cat. DY410 e $\text{IFN-}\gamma$ Cat. DY485).

Após adição de 100 L do anticorpo monoclonal anti-citocina de captura na placa de 96 poços (Nunc), incubou-se por 12 horas a temperatura ambiente (TA). Após este período, os poços foram lavados com uma solução de tampão de lavagem (PBS/ Tween) e incubados com uma solução de bloqueio (300 L), contendo PBS e albumina sérica bovina (BSA, Sigma) durante 1 hora (TA). As amostras (sobrenadantes provenientes da cultura esplênica) e os padrões (citocinas recombinantes) foram

adicionados e a placa foi incubada por 2 horas (TA). O anticorpo monoclonal de detecção anti-citocina foi então preparado e incubado por mais 2 horas (TA). Adicionou-se uma solução de estreptavidina-peroxidase e incubou-se por 1 hora (TA). Finalmente, a solução de substrato (H_2O_2 e TMB – tetrametilbenzidina) foi adicionada à placa e uma coloração azul se desenvolveu dentro de um período de 20 minutos. A reação de coloração foi interrompida adicionando-se H_2SO_4 2N e a leitura foi realizada em leitor de microplacas a 450nm. Os níveis de citocinas foram expressos em pg/ mL, calculados a partir dos valores de referência obtidos com uma curva padrão construída com concentrações conhecidas das citocinas recombinantes.

3.12. Avaliação da sobrevida

Para avaliarmos os efeitos do ERR na resistência dos animais infectados com *Listeria monocytogenes*, doses de 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 mg/ Kg foram administradas por um período de sete dias consecutivos anteriores a inoculação com a bactéria. Grupos de dez animais foram observados diariamente por um período de trinta dias.

3.13. Análise estatística

A comparação estatística dos resultados foi realizada pelo método de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. Para a curva de sobrevida foi aplicado o teste de Kaplan-Maier, seguido de Cox-Mantel. Em todos os grupos estudados, foram considerados estatisticamente significativos aqueles cujos valores de P foram menores que 0,05.



4. RESULTADOS

4.1. Avaliação dos efeitos do extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) na sobrevida de animais infectados com dose letal de *L. monocytogenes*

Os efeitos protetores das doses de 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 mg/ Kg do ERR na sobrevida de animais infectados com uma dose letal de *L. monocytogenes* (1×10^6 bactérias/ animal) estão representados na figura 6.

Conforme podemos observar, todos os animais infectados que não receberam tratamento morreram até o quinto dia de infecção. O pré-tratamento com as doses de 100 e 250 mg/ kg de ERR aumentou a resistência dos animais a *L. monocytogenes* em 50 e 60%, respectivamente ($P < 0,05$), sendo que não houve diferença significativa entre estas doses. Uma interessante relação dose-resposta foi observada com as doses de 500 e 1000 mg/ Kg do extrato. Essas doses promoveram uma redução na atividade protetora do ERR quando comparadas com as doses de 100 e 250 mg/ Kg. Nestes animais observamos agitação motora e irritabilidade.

A dose de 50 mg/ kg aumentou a resistência dos animais à infecção em apenas 10%, apresentando uma redução significativa na atividade protetora do extrato em relação as doses de 100 e 250 mg/ Kg. A dose de 25 mg/ kg não produziu qualquer proteção nos animais infectados com a bactéria.

Neste sentido, selecionamos as doses de 50, 100, 250 e 500 mg/ kg para o estudo dos parâmetros hematopoéticos e imunológicos.

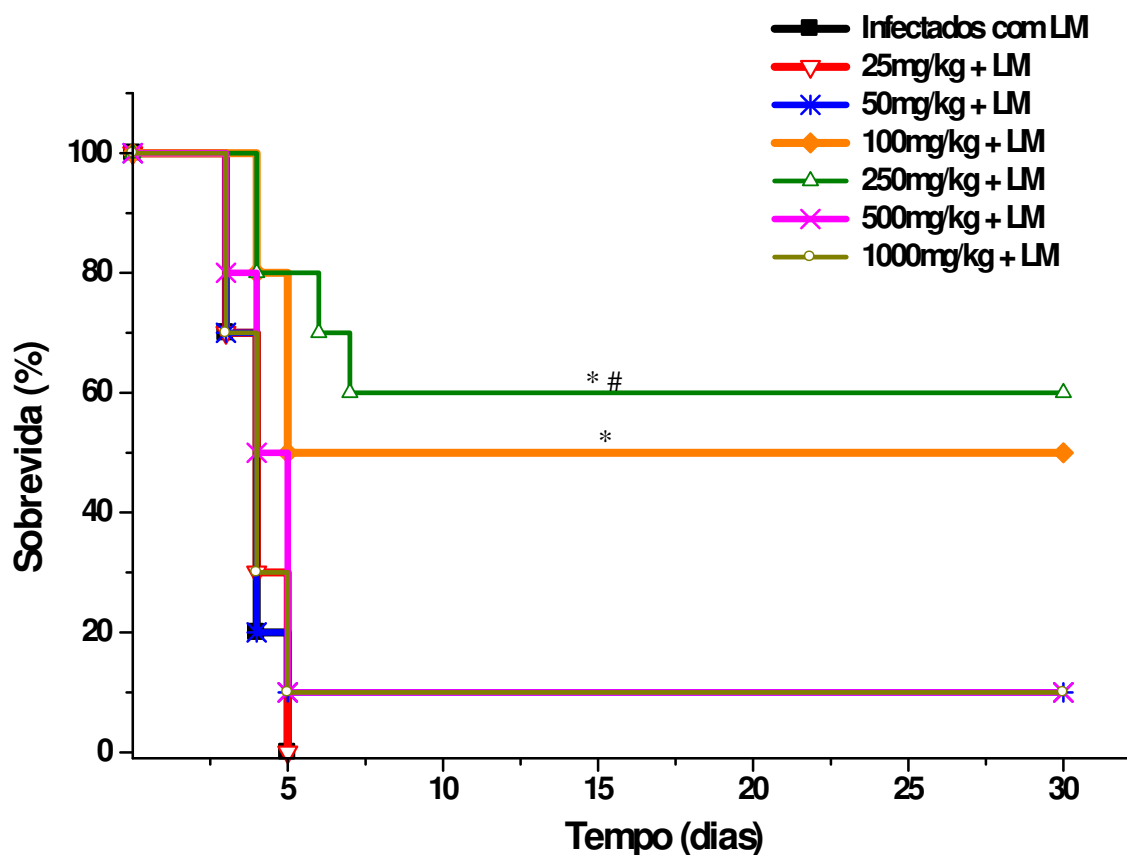


Figura 6. Curva de sobrevivência de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 mg/ kg de extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) e infectados com 1×10^6 *L. monocytogenes* (LM). O grupo controle recebeu apenas o veículo (água). Os animais foram observados por um período de 30 dias. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de dez animais. Kaplan-Meier, Teste de Cox-Mantel. * $P < 0,05$ em relação ao grupo infectado; # $P > 0,05$ em relação à dose de 100 mg/ kg.

4.2. Avaliação dos efeitos de diferentes doses do extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) sobre o número de progenitores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea e do baço de animais normais e infectados com *L. monocytogenes*

Os resultados do pré-tratamento por sete dias com as doses de 50, 100, 250 e 500 mg/ kg de ERR sobre o número de CFU-GM da medula óssea e baço de animais normais e infectados com dose subletal de *L. monocytogenes* estão apresentados na figura 7 e 8.

Em animais normais, o tratamento com as diferentes doses de ERR não produziu alterações significativas no número de CFU-GM medular quando comparado com o grupo controle (figura 7).

Nos animais infectados, observamos uma drástica mielossupressão nas 48 e 72 horas após a inoculação da bactéria quando comparado com o grupo controle ($P < 0,001$), o que corrobora com estudos anteriores de nosso laboratório (SOUZA-QUEIROZ et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2006; EBERLIN et al., 2005; QUEIROZ et al., 2003; 2001; MELO et al., 2001).

No entanto, quando os animais infectados foram previamente tratados com 100 e 250 mg/ kg do ERR, houve uma prevenção da mielossupressão ($P < 0,001$). A dose de 50 mg/ kg produziu recuperação parcial tardia ($P < 0,05$) no número de CFU-GM medular, apenas nas 72 horas após a infecção, enquanto que a dose de 500 mg/ kg não foi capaz de prevenir a mielossupressão nos períodos avaliados.

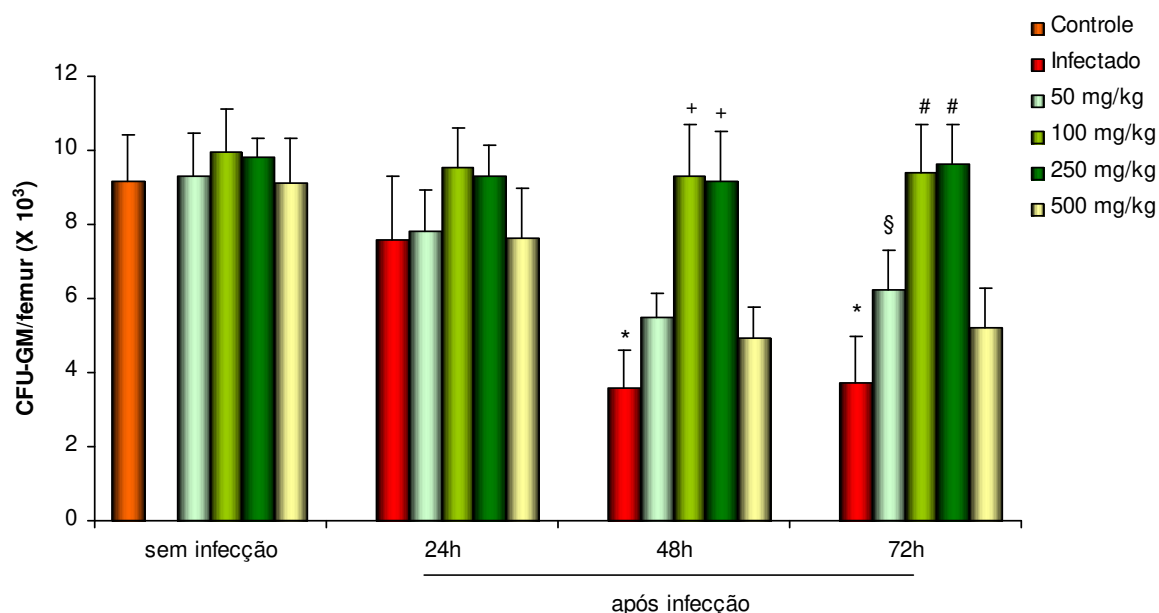


Figura 7. Número de progenitores hematopoiéticos de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea de camundongos BALB/ c pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 50, 100, 250 e 500 mg/ kg de extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) e infectados com 1×10^4 *L. monocytogenes* (LM). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. O grupo controle recebeu apenas o veículo (água). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de seis animais. ANOVA, Teste de Tukey. *P<0,001 em relação ao controle; ‡P<0,01 em relação ao controle e ao LM 48h; +P<0,001 em relação ao LM 48h; §P<0,05 em relação ao LM 72h; #P<0,001 em relação ao LM 72h.

Em relação à hematopoese extramedular (figura 8), podemos observar que o tratamento de animais normais com as quatro doses de ERR não alterou o número de CFU-GM esplênico dos animais.

A infecção com *L. monocytogenes* produziu um aumento expressivo no número de CFU-GM no baço nas 48 e 72 horas após a infecção, quando comparado ao

grupo controle ($P<0,001$). O tratamento destes animais com ERR preveniu este aumento de colônias esplênicas somente nos animais tratados com 100 e 250 mg/ kg ($P<0,001$), atingindo valores similares aos observados no grupo controle. As doses de 50 e 500 mg/ kg não foram capazes de prevenir este efeito.

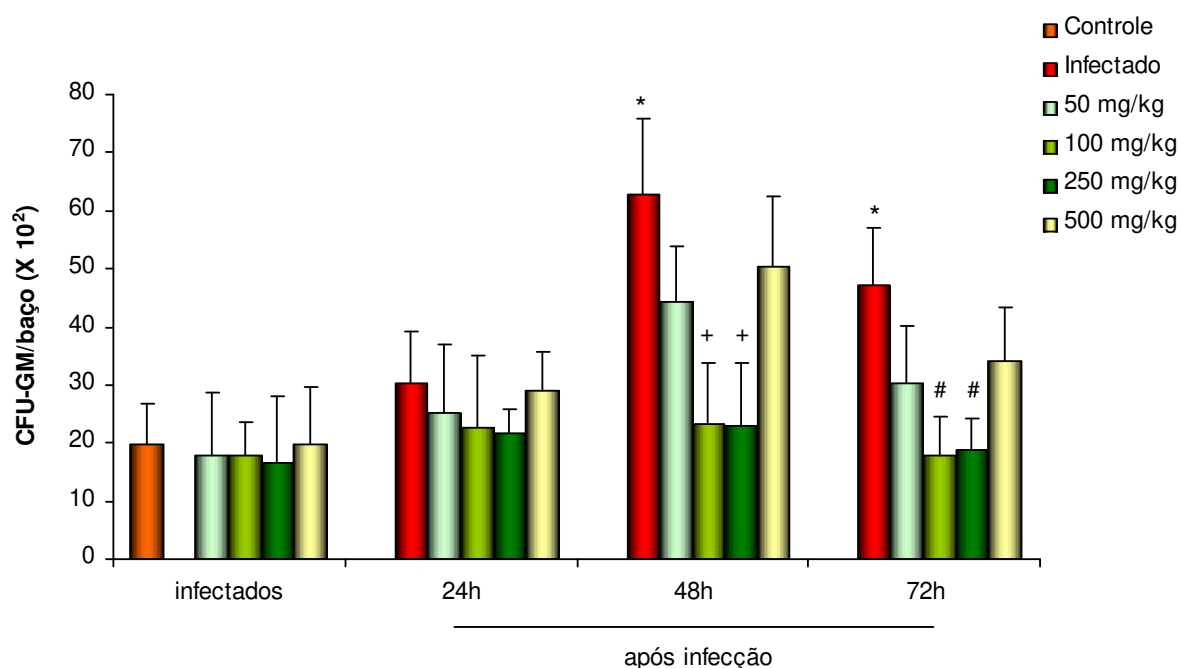


Figura 8. Número de progenitores hematopoiéticos de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) no baço de camundongos BALB/ c pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 50, 100, 250 e 500 mg/ kg de extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) e infectados com 1×10^4 *L. monocytogenes* (LM). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. O grupo controle recebeu apenas o veículo (água). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de seis animais. ANOVA, Teste de Tukey. * $P<0,001$ em relação ao controle; $\dagger P<0,05$ em relação ao LM 48h; + $P<0,001$ em relação ao LM 48h; # $P<0,001$ em relação ao LM 72h.

4.3. Avaliação dos efeitos de diferentes doses do extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) sobre a atividade estimuladora de colônias hematopoéticas (CSA) do soro de animais normais e infectados com *L. monocytogenes*

A avaliação da presença de atividade estimuladora de colônias (CSA) no soro de animais normais e infectados com *L. monocytogenes* pré-tratados com ERR está representada na figura 9.

Nos animais apenas tratados com as diferentes doses de ERR (50, 100, 250 e 500 mg/ kg) não verificamos nenhum efeito estimulador no soro destes animais sobre o crescimento e diferenciação de células progenitoras da medula óssea de animais normais.

A presença da infecção produziu um aumento agudo nos níveis séricos de CSA nas 48 e 72 horas após a inoculação da bactéria ($P<0,01$). O pré-tratamento dos animais infectados com 100 e 250mg/ Kg de ERR potencializou a CSA nos três períodos avaliados (24, 48 e 72 horas após infecção), em relação ao grupo infectado ($P<0,01$). O estudo morfológico das colônias produzidas nestes ensaios evidenciou o predomínio de granulócitos e macrófagos.

No entanto, o tratamento com as doses de 50 e 500 mg/ kg não produziu nenhum efeito nos momentos iniciais da infecção, sendo que apenas a dose de 50 mg/ kg apresentou um aumento significativo 72 horas após infecção ($P<0,01$).

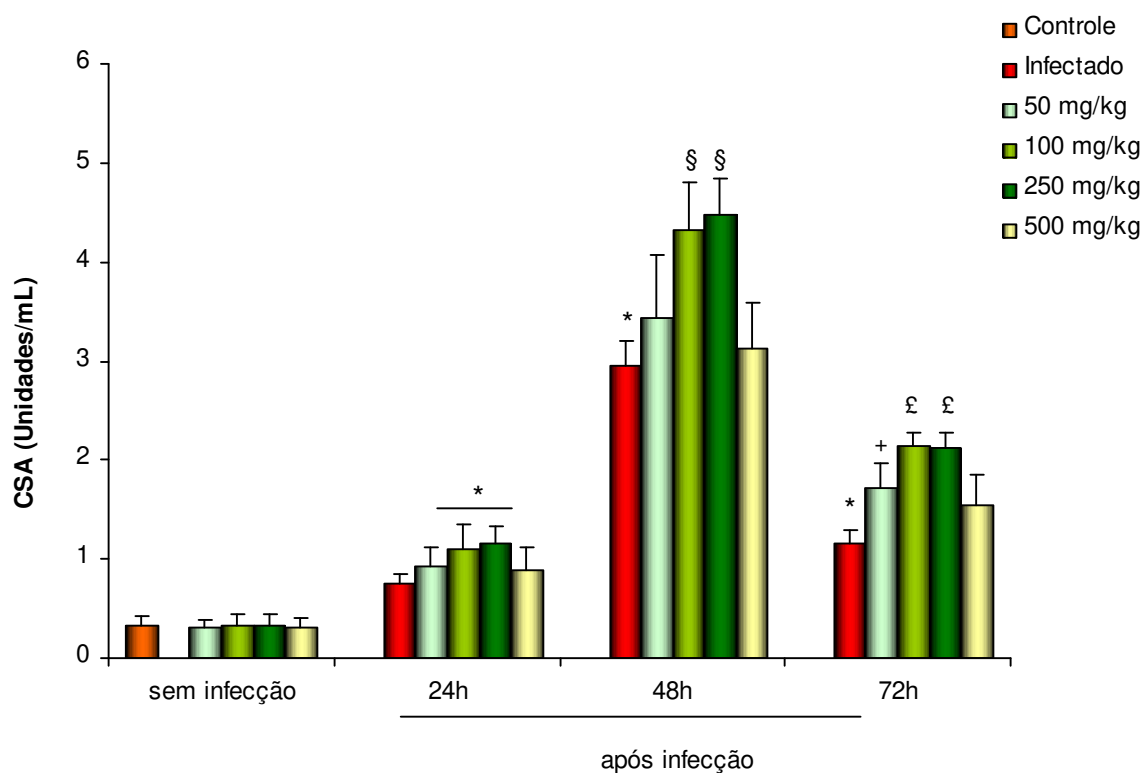


Figura 9. Atividade estimuladora de colônias (CSA) no soro de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 50, 100, 250 e 500 mg/ kg de extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) e infectados com 1×10^4 *L. monocytogenes* (LM). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. O grupo controle recebeu apenas o veículo (água). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de seis animais. ANOVA, Teste de Tukey. * $P < 0,01$ em relação ao controle, § $P < 0,001$ em relação ao LM 48h, + $P < 0,01$ em relação ao LM 72h, £ $P < 0,01$ em relação ao LM 72h.

4.4. Avaliação dos efeitos de diferentes doses do extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) sobre a Cultura Líquida de longa duração de células da medula óssea (LTBMC) de animais normais e infectados com *L. monocytogenes*

4.4.1. Número total de progenitores de granulócito e macrófago (CFU-GM) em LTBMC

Para analisar a capacidade do estroma de animais pré-tratados com 50, 100, 250 e 500 mg/ kg de ERR manter a hematopoese, LTBMCs foram estabelecidas e monitoradas semanalmente até a 9^a semana de incubação.

A observação microscópica das LTBMCs revelaram estromas densos e confluentes após 3 semanas de incubação das culturas correspondentes aos animais controle e tratados com o ERR. Em constraste, as LTBMCs dos animais infectados não apresentaram os mesmos estromas confluentes.

A partir da 5^a semana de cultura realizamos ensaios clonogênicos para a série granulocítica e macrófagica (CFU-GM) até o final do experimento (9^a semana) (figura 10).

Na 5^a semana observamos um pico no número de CFU-GM como consequência da repopulação. Observamos que o tratamento de animais normais com as diferentes doses de ERR não produziu nenhum efeito no número de CFU-GM. Por outro lado, a infecção provocou uma diminuição drástica do número de CFU-GM em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). Entretanto, para os animais infectados pré-tratados com as doses de 100 e 250 mg/ kg do extrato esta redução foi prevenida ($P < 0,05$). As doses de 50 e 500 mg/ kg não foram capazes de prevenir este efeito.

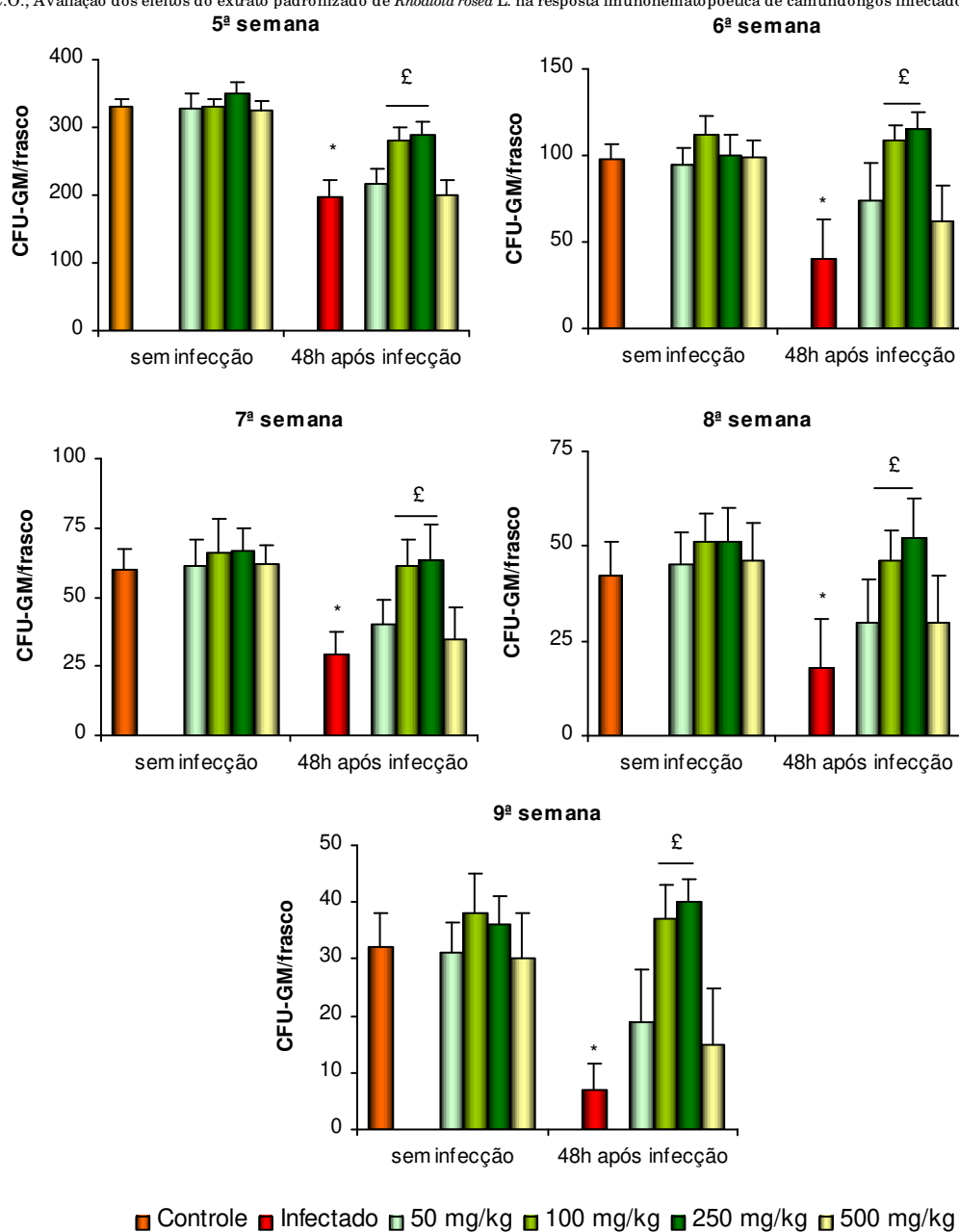


Figura 10. Número de progenitores de granulócito e macrófago (CFU-GM) no sobrenadante da cultura líquida de longa duração de células hematopoéticas (LTBMC) de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 50, 100, 250 e 500 mg/ kg de extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) e infectados com 1×10^4 *L. monocytogenes* (LM). Para o estabelecimento das culturas, os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção. O grupo controle recebeu apenas o veículo (água). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 frascos. ANOVA, Teste de Tukey. * $P < 0,05$ em relação ao controle, $\xi P < 0,05$ em relação ao LM 48h.

4.4.2. Produção de IL-1 α e IL-6 no sobrenadante da LT BMC

Os níveis de IL-1 α e IL-6 nos sobrenadantes das LT BMCs foram quantificados da 4^a a 9^a semana de incubação e estão representados nas figuras 11 e 12.

Como demonstrado, o tratamento de animais normais com 100 mg/ kg do ERR não altera os níveis de IL-1 α no sobrenadante das culturas em relação aos animais controle (figura 10).

Por outro lado, nas culturas dos animais infectados, verificamos uma diminuição significativa na produção de IL-1 α quando comparado ao grupo controle ($P < 0,001$). O tratamento destes animais com ERR preveniu a redução nos níveis de IL-1 α induzida pela infecção. Além disso, observamos um declínio gradativo nos níveis desta citocina em todos os grupos avaliados.

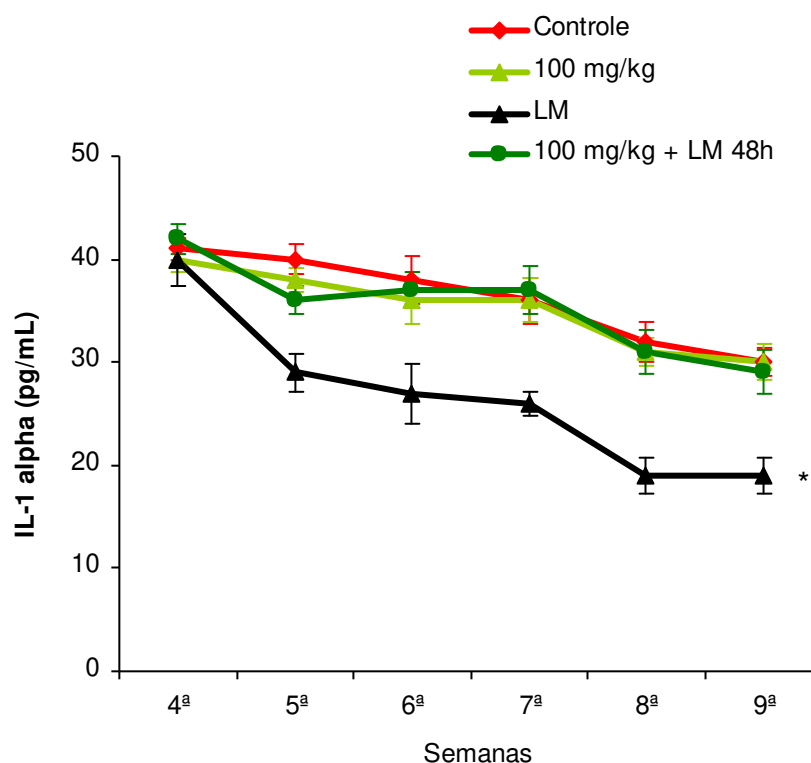


Figura 11. Níveis de IL-1 α (pg/mL) no sobrenadante da cultura líquida de longa duração de células hematopoéticas (LTBMC) de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 100 mg/ kg de extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) e infectados com 1×10^4 *L. monocytogenes* (LM). Para o estabelecimento das culturas, os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção. O grupo controle recebeu apenas o veículo (água). n=6 frascos/ grupo, ANOVA, Teste de Tukey. *P<0,001 em relação ao grupo controle e ao grupo tratado e infectado.

Os níveis de IL-6 nos sobrenadantes das LTBMCS estão representados na figura 12.

O pré-tratamento de animais normais com 100 mg/ kg de ERR não altera os níveis desta citocina em relação aos animais controle. A infecção, por outro lado, provocou uma redução significativa na produção de IL-6, quando comparado ao grupo controle ($P < 0,001$). O pré-tratamento destes animais com 100 mg/ kg de ERR preveniu esta diminuição nos níveis de IL-6.

Na quinta semana de incubação, observamos um pico na produção de IL-6, em decorrência da repopulação, seguido de um decréscimo gradativo nas culturas. Isto coincide com o observado nos números de CFU-GM obtidos da suspensão de células não-aderentes da LTBMCS, nas quais também notamos um declínio gradativo no decorrer das semanas.

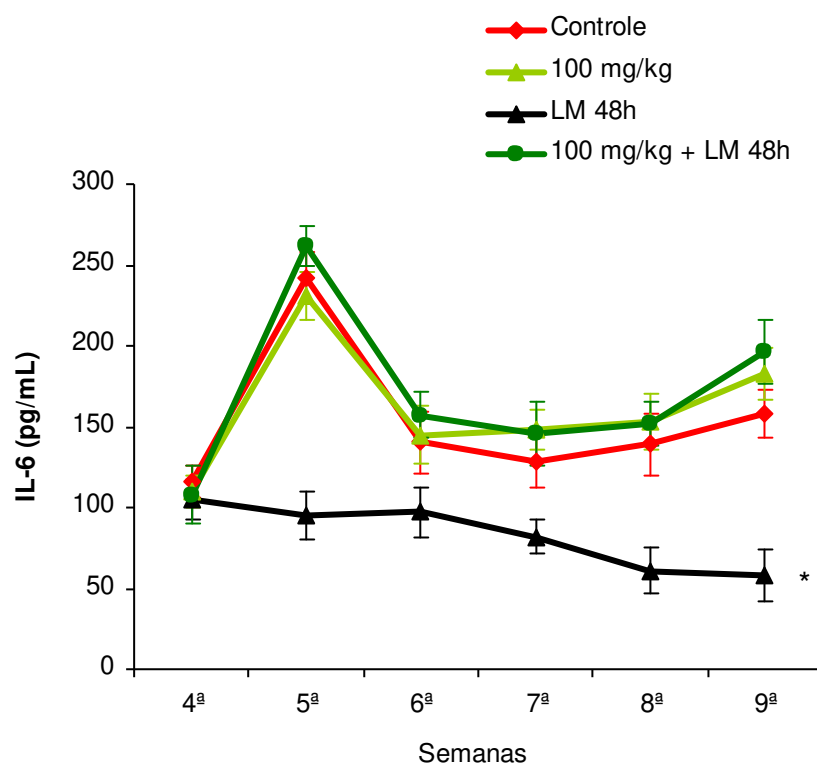


Figura 12. Níveis de IL-6 (pg/mL) no sobrenadante da cultura líquida de longa duração de células hematopoéticas (LTBMC) de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 100 mg/ kg de extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) e infectados com 1×10^4 *L. monocytogenes* (LM). Para o estabelecimento das culturas, os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção. O grupo controle recebeu apenas o veículo (água). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de seis frascos. ANOVA, Teste de Tukey. * $P < 0,001$ em relação ao grupo controle e ao grupo tratado e infectado.

4.5. Efeitos de diferentes doses do extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) sobre a atividade citotóxica de células *natural killers* (NK)

Os resultados obtidos nesta avaliação estão representados na figura 13. Conforme demonstrado, a atividade citotóxica das células NK foi de aproximadamente 5% nos animais normais. O pré-tratamento dos animais normais com ERR não alterou a citotoxicidade destas células quando comparado ao grupo controle.

Por outro lado, a infecção promoveu aumento na atividade funcional das células NK, atingindo aproximadamente 25% e 15% nas 48 e 72 horas de infecção, respectivamente ($P<0,001$). Quando os animais infectados foram pré-tratados com 100 e 250 mg/ kg de ERR, verificamos um aumento adicional na atividade citotóxica destas células em relação ao grupo infectado, alcançando em média 35% e 25% após 48 e 72 horas, respectivamente ($P<0,001$).

Nenhum efeito foi observado com as doses de 50 e 500 mg/ kg de ERR na atividade citotóxica das células NK em todos os períodos avaliados.

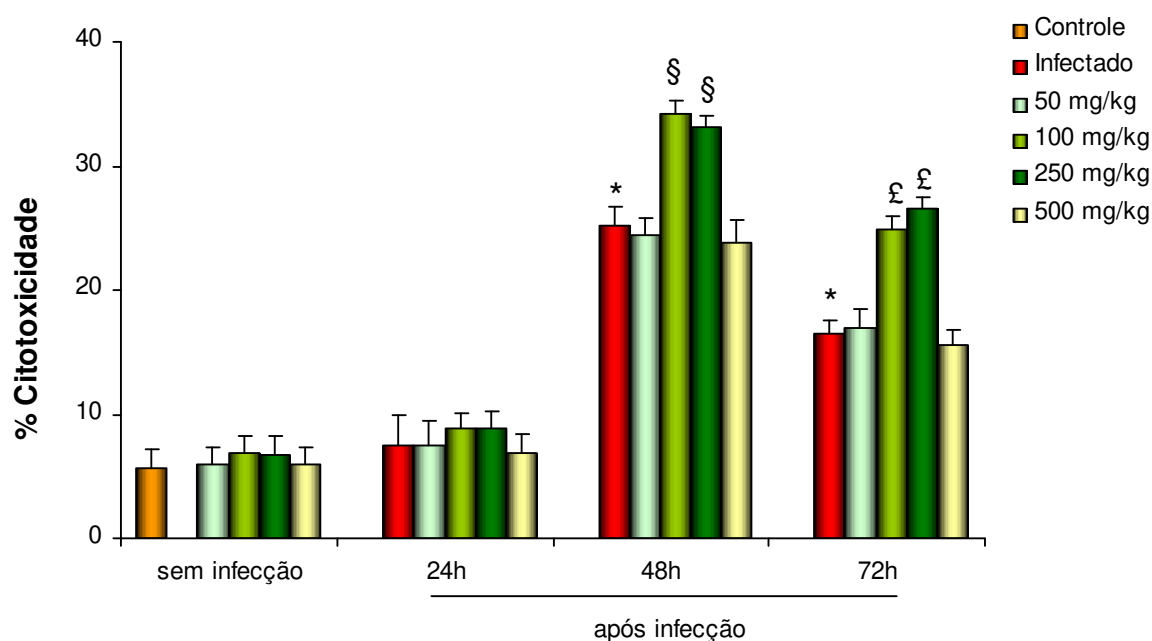


Figura 13. Atividade citotóxica de células natural killer de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 50, 100, 250 e 500 mg/ kg de extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) e infectados com 1×10^4 *L. monocytogenes* (LM). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. O grupo controle recebeu apenas o veículo (água). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de seis animais. ANOVA, Teste de Tukey. * $P < 0,001$ em relação ao controle, § $P < 0,001$ em relação ao LM 48h, £ $P < 0,001$ em relação ao LM 72h.

4.6. Efeitos do extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) sobre a porcentagem de células no baço de animais normais e infectados com *L. monocytogenes*

O pré-tratamento de animais normais com ERR não provocou alterações na porcentagem de células NK+ no baço (figura 14).

Similarmente, tanto a infecção como o tratamento dos animais infectados com 100 mg/ kg de ERR, não alteraram a porcentagem dessas células nos baços dos animais.

Estes resultados demonstram que um aumento na atividade funcional destas células ocorre e não do número no baço dos animais nos períodos avaliados.

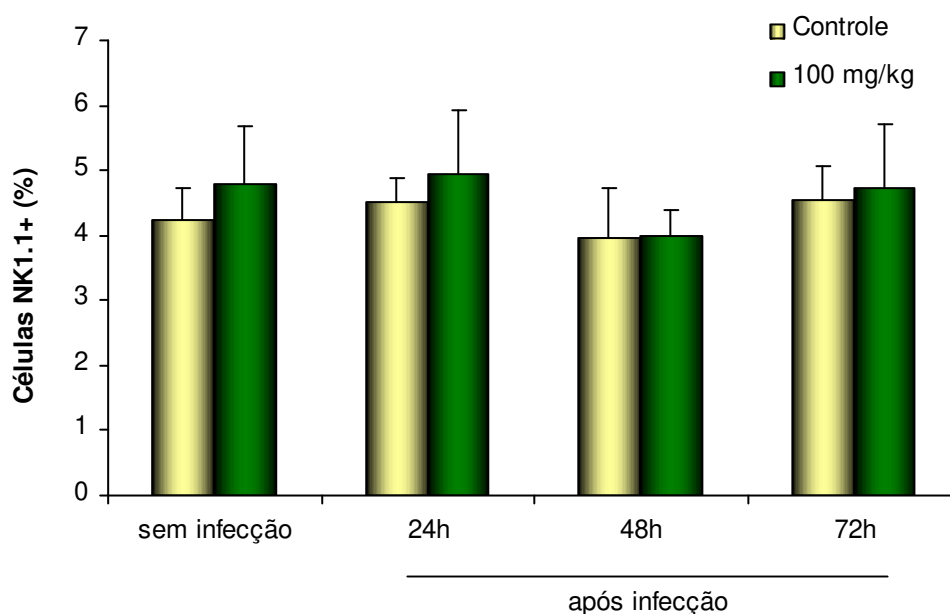


Figura 14. Porcentagem de células *natural killers* no baço de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 100 mg/ kg de extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) e infectados com 1×10^4 *L. monocytogenes* (LM). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção e as suspensões de células esplênicas foram analisadas por citometria de fluxo. O grupo controle recebeu apenas o veículo (água). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de seis animais. ANOVA, Teste de Tukey.

4.7. Efeitos do extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) sobre a produção de citocinas em culturas de células esplênicas

Os efeitos do ERR sobre a produção das citocinas de padrão Th1 (TNF- α e IFN- γ) e Th2 (IL-10) estão representados nas figuras 15, 16 e 17.

Observamos que o pré-tratamento de animais normais com ERR não alterou a produção das três citocinas nas culturas analisadas. A presença da infecção induz um aumento significativo em relação ao grupo controle na produção de TNF- α nas culturas 24 e 48 horas após inoculação ($P < 0,001$), e de IFN- γ nas 48 e 72 horas de infecção ($P < 0,001$). Quando animais infectados foram pré-tratados com 100 mg/ kg de ERR, verificamos um aumento adicional na liberação de TNF- α e IFN- γ em relação ao grupo infectado ($P < 0,001$).

Em relação à produção de citocina de padrão Th2 (IL-10), podemos observar que o pré-tratamento de animais normais com ERR não alterou os níveis desta citocina nas culturas analisadas. Confirmando resultados anteriores descritos pelo nosso grupo, foi verificado que a presença da infecção não induziu alteração na produção de IL-10 nas culturas. Similarmente, o pré-tratamento de animais infectados com 100mg/ kg do ERR não produziu alterações na produção desta citocina.

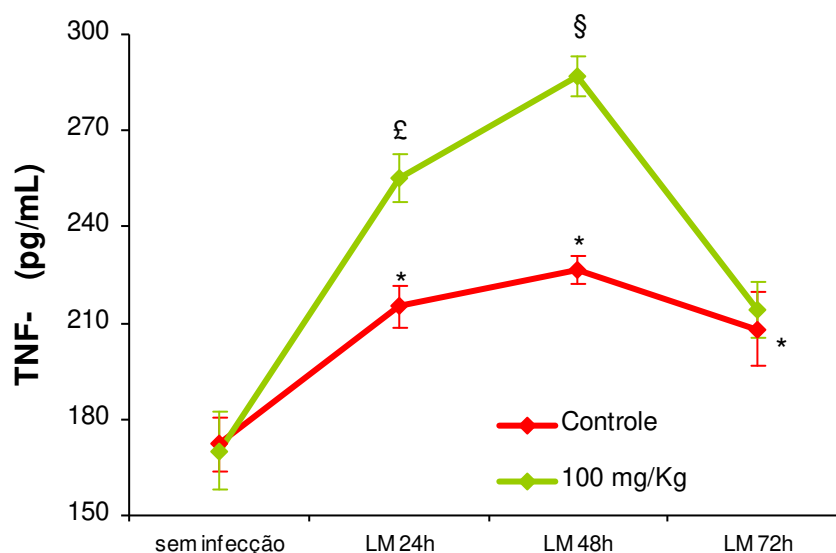


Figura 15. Níveis de TNF- α (pg/mL) no sobrenadante da cultura de células esplênicas de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 100 mg/ kg de extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) e infectados com 1×10^4 *L. monocytogenes* (LM). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. O grupo controle recebeu apenas o veículo (água). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de seis animais. ANOVA, Teste de Tukey. *P<0,001 em relação ao controle, £P<0,001 em relação ao LM 24h, §P<0,001 em relação ao LM 48h.

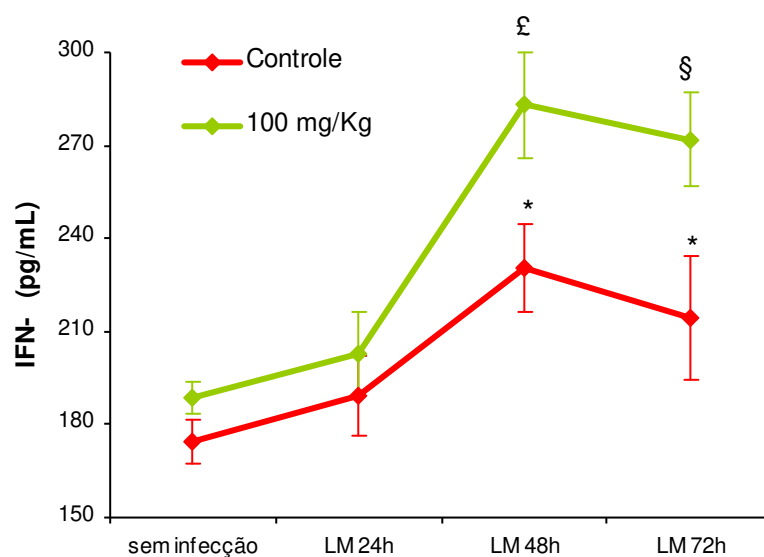


Figura 16. Níveis de IFN- γ (pg/mL) no sobrenadante da cultura de células esplênicas de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 100 mg/ kg de extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) e infectados com 1×10^4 *L. monocytogenes* (LM). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. O grupo controle recebeu apenas o veículo (água). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de seis animais. ANOVA, Teste de Tukey. *P<0,001 em relação ao controle, £P<0,001 em relação ao LM 24h, §P<0,001 em relação ao LM 48h.

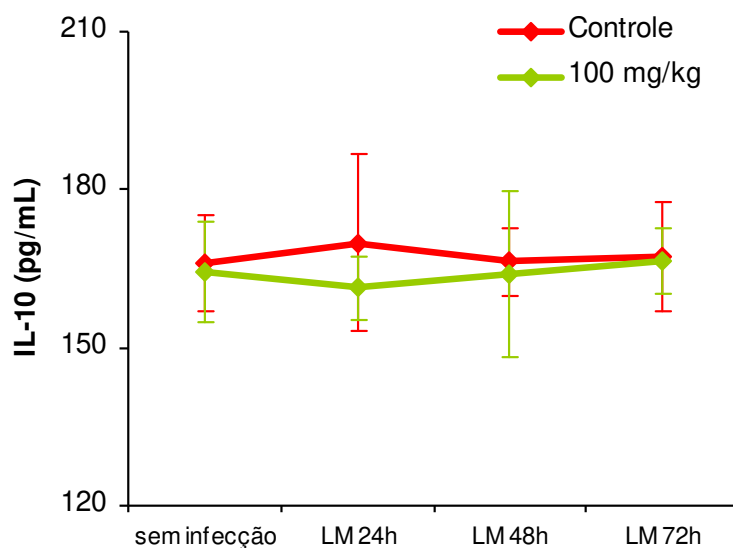


Figura 17. Níveis de IL-10 (pg/mL) no sobrenadante da cultura de células esplênicas de animais pré-tratados por gavagem durante 7 dias com 100 mg/ kg de extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) e infectados com 1×10^4 *L. monocytogenes* (LM). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. O grupo controle recebeu apenas o veículo (água). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de seis animais. ANOVA, Teste de Tukey. $P > 0,05$.



5. DISCUSSÃO

O crescente interesse por alternativas terapêuticas para a prevenção e tratamento de doenças, especialmente o uso terapêutico de produtos naturais derivados de plantas, incentivou um grande número de pesquisadores a explorar novas fontes de substâncias químicas biologicamente ativas com potencial e aplicabilidade terapêutica (RATES, 2001). Plantas com propriedades adaptógenas e imunomoduladoras desempenham um papel relevante nestas pesquisas, uma vez que são capazes de aumentar os mecanismos de defesa do organismo proporcionando proteção contra infecções oportunistas, frequentes em pacientes imunossuprimidos, como transplantados, em tratamento com drogas imunossupressoras, quimioterapia e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HENGGE et al., 2001; MASIHI, 2000).

A *Rhodiola rosea* tem revelado propriedades adaptógenas e imunomoduladoras, sobre as quais, estudos experimentais têm sido conduzidos para esclarecer os mecanismos envolvidos na sua capacidade de aumentar a resposta imunológica do organismo a agentes estressores. Contudo, embora tenha sido extensamente estudada na Rússia e Escandinávia por mais de 35 anos, a maioria das pesquisas não está disponível (KELLY, 2001). Sendo assim, neste trabalho investigamos o efeito do extrato padronizado de *Rhodiola rosea* sobre alguns parâmetros da resposta imunoematopoiética, utilizando o modelo experimental de Listeriose murina. É importante salientar que até o momento não foram descritos estudos com o ERR utilizando este modelo experimental.

Inicialmente, os efeitos protetores do ERR foram avaliados em animais infectados com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* através do experimento de sobrevivência. Os resultados mostram que as doses de 100 e 250 mg/ kg foram as mais eficazes, aumentando a resistência dos animais em 50 e 60%, respectivamente. Por outro lado, enquanto a dose de 25 mg/ kg do extrato não apresentou proteção frente à infecção, a dose de 50 mg/ kg promoveu um aumento de apenas 10% na resistência dos

animais à infecção. Isto pode estar relacionado à interferência tardia na cinética da infecção com esta dose, confirmada com os resultados da avaliação hematopoiética. Em relação às doses de 500 e 1000 mg/ kg, observamos uma redução significativa na atividade protetora do ERR quando comparadas às doses de 100 e 250 mg/ kg, mostrando uma interessante relação dose-resposta. Isso sugere a possibilidade de uma dose eficaz do ERR, acima e abaixo da qual os efeitos benéficos podem ser menos prováveis.

A este respeito, KURKIN e ZAPESOCHNAYA (1985) observaram que a dose necessária do extrato de *Rhodiola rosea* para induzir morte em 50% dos animais, ou seja, a DL₅₀ seria aproximadamente 3360 mg/ kg. O equivalente em um homem de 70 kg seria cerca de 235 g. Dessa forma, há uma enorme margem de segurança com as doses utilizadas neste estudo. Em geral, poucos efeitos colaterais têm sido relatados nesta espécie. Alguns estudos clínicos indicam que doses acima de 1,5 g do ERR podem causar irritabilidade e insônia por alguns dias (KELLY, 2001). Este efeito relaciona-se a sua capacidade de aumentar a atividade cerebral em decorrência da elevação nos níveis dos neurotransmissores cerebrais dopamina, noradrenalina e serotonina (KELLY, 2001). Recentemente, DIERMEN e colaboradores (2009) demonstraram que este efeito da *Rhodiola rosea* está relacionado à inibição da monoamino-oxidase, enzima responsável pela degradação de dopamina, noradrenalina e serotonina nas vesículas neuronais. Um dos efeitos colaterais conhecidos dos inibidores desta enzima é a estimulação central excessiva, podendo causar excitação e insônia (BRUNTON et al., 2006).

Estudos demonstram que a noradrenalina e a dopamina, quando adicionados *in vitro*, promovem diminuição no número de CFU-GM da medula óssea (MIYAN et al., 1998; MAESTRONI e CONTI, 1994). Além disso, pesquisadores relataram que o sistema nervoso controla a produção de células sanguíneas e a liberação tanto das células maduras como das imaturas da medula óssea para o sangue periférico, corroborando a existência de um controle neural na hematopoese (BROOME et al., 2000;

AFAN et al., 1997). Neste sentido, a redução na atividade protetora do ERR observada com as doses de 500 e 1000 mg/ kg pode ter ocorrido em função do aumento nos níveis de dopamina, noradrenalina e serotonina, provocando efeitos estimulantes sobre o sistema nervoso central, os quais foram evidenciados pela agitação motora e irritabilidade nos animais durante o tratamento.

A partir dos resultados observados no experimento de sobrevivência, selecionamos as doses de 50, 100, 250 e 500 mg/ kg para a realização deste estudo, com o objetivo de verificar os mecanismos subjacentes à eficácia terapêutica das diferentes doses do ERR frente à infecção com *L. monocytogenes*.

Está bem documentado na literatura que diversos fatores estão envolvidos na defesa contra a *Listeria*. O processo envolvido na resistência a esta bactéria é caracterizado primeiramente pela imunidade inata do hospedeiro, seguida por uma resposta específica, garantindo a erradicação do patógeno. Embora a erradicação da infecção dependa de uma resposta imune específica através da atuação das células T, a resposta inespecífica mediada por macrófagos e neutrófilos durante as fases iniciais da infecção é fundamental para a sobrevivência do hospedeiro (ZENEWICZ e SHEN, 2007; PAMER, 2004; BRAUN e COSSART, 2000). Essas células são de grande importância, uma vez que, além de serem as primeiras células a atuarem contra os microrganismos, continuam liberando citocinas que agirão sobre as células T, formando uma rede de interação no sistema imune. O recrutamento de monócitos é uma característica essencial da resposta inflamatória à infecção com *L. monocytogenes* (PAMER, 2004; NORTH, 1970) e a depleção de granulócitos em animais aumenta a susceptibilidade à infecção (PAMER, 2004; McLAUHLIN, 1996; ROGERS e UNANUE, 1993; CONLAN e NORTH, 1994; 1991).

Os macrófagos e granulócitos são células derivadas dos precursores hematopoiéticos da medula óssea que se diferenciam em uma determinada linhagem celular (JANEWAY JUNIOR et al., 2007; ZON, 2001; METCALF e NICOLA, 1995;

METCALF, 1988), através da presença de fatores específicos, denominados fatores estimuladores de colônias (figura 18) (KAYASHIMA et al., 1993; METCALF, 1986; WING et al., 1984; BURGESS e METCALF, 1980). Desta forma, a presença de fatores estimuladores de colônias bem como a produção, maturação e mobilização eficiente das células hematopoéticas derivadas da medula óssea, particularmente granulócitos e macrófagos, são fundamentais para o sucesso da resolução da infecção. Neste sentido, a avaliação do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos de macrófagos e granulócitos através da técnica da cultura clonal em meio semi-sólido é uma ferramenta útil para o estudo dos mecanismos envolvidos na resistência a esta bactéria (METCALF, 2001).

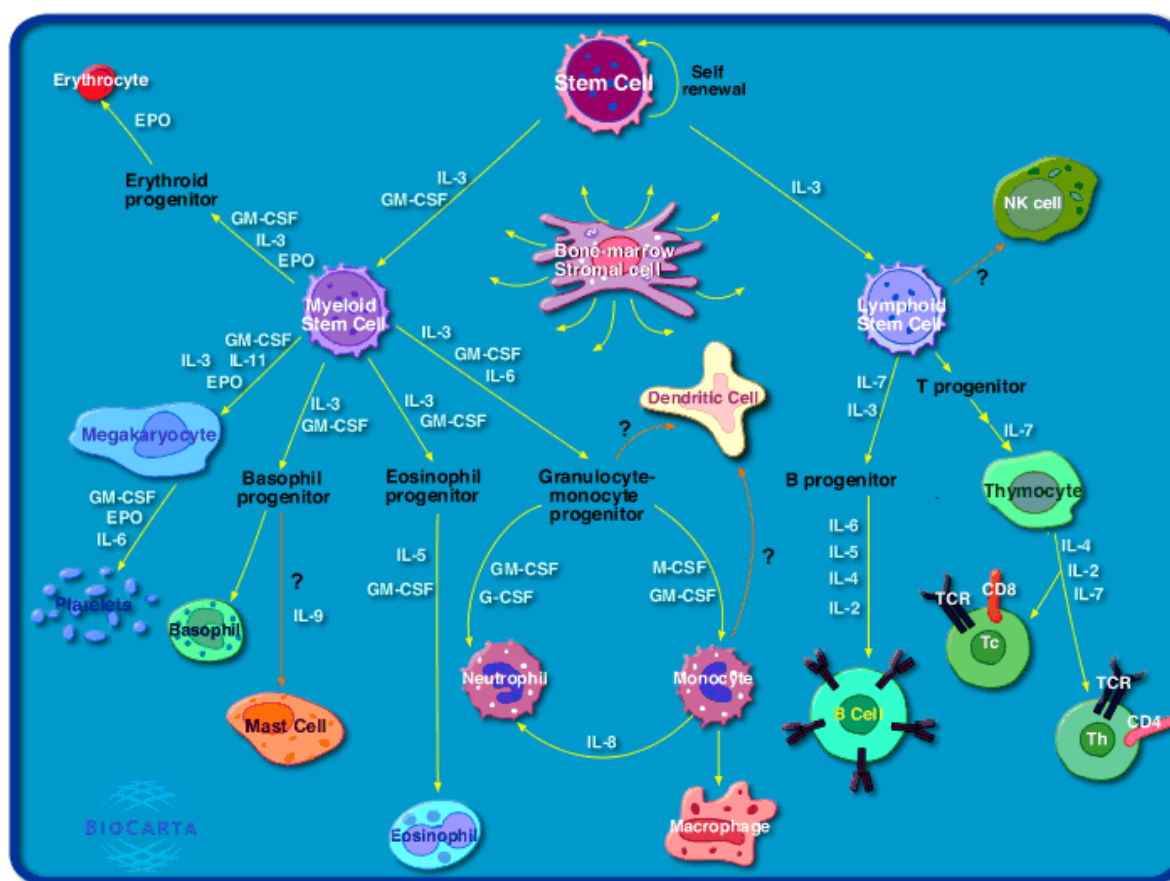


Figura 18- Hematopoese - Formação de granulócitos e macrófagos. Fonte: www.biocarta.com/pathfiles/h_stemPathway.gif.

Estudos de nosso laboratório e outros demonstram que, durante a fase inicial da infecção com *L. monocytogenes* ocorre uma redução no número de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos na medula óssea, com conseqüente hematopoese extramedular e elevação nos níveis séricos de fatores estimuladores de colônias (SOUZA-QUEIROZ et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2006; EBERLIN et al., 2005; QUEIROZ et al., 2003; 2001; MELO et al., 2001; CHEERS e STANLEY, 1988; CHEERS et al., 1988; WING et al., 1985; WING et al., 1984). 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 (TEIXEIRA et al., 2006; EBERLIN et al., 2005; QUEIROZ et al., 2003; WING et al., 1985).

Nossos resultados corroboram estes dados, uma vez que observamos mielossupressão nas 48 e 72 horas após a inoculação da bactéria, com conseqüente hematopoese extramedular e aumento nos níveis séricos da atividade estimuladora de colônias. O pré-tratamento dos animais infectados com as doses mais eficazes no experimento de sobrevivência, 100 e 250 mg/ kg do ERR, preveniu a mielossupressão e conseqüente hematopoese extramedular em todos os períodos avaliados. Além disso, verificamos um aumento adicional da CSA a partir das 24 horas de infecção no soro destes animais, mantendo-se elevado em todos os períodos avaliados.

Por outro lado, a dose de 50 mg/ kg produziu recuperação tardia no número de CFU-GM medular e na concentração de CSA, verificados apenas 72 horas após a infecção, sem produzir efeito sobre a hematopoese extramedular. Este efeito tardio sobre a hematopoese pode estar relacionado com a progressão da infecção e aumento de 10% na resistência dos animais à infecção. Em relação à dose de 500 mg/ kg, a mesma não foi capaz de prevenir a mielossupressão e hematopoese extramedular, bem como aumentar a concentração de CSA nos períodos avaliados. Como citado anteriormente, a reduzida eficácia observada com esta dosagem pode estar relacionada

aos efeitos estimulantes sobre o sistema nervoso central, provavelmente alcançados com doses mais elevadas do extrato.

Está bem documentado que os fatores estimuladores de colônias modulam a resposta hematopoética provocando a pronta mobilização dos fagócitos circulantes e teciduais, e aumentando a diferenciação de progenitores hematopoéticos (QIU et al., 2009; JIN et al., 2002; GULERIA e POLLARD, 2001; ZHAN et al., 1998; CHEERS e STANLEY, 1988). Em animais resistentes à *L. monocytogenes*, como o C57BL, observa-se o aumento de CSFs no soro nas primeiras horas de infecção, conferindo uma resposta mais eficiente do que em animais susceptíveis como o BALB/ c, cujo pico de CSFs ocorre nas 48 horas de infecção (CHEERS et al., 1988). Além disso, o estudo morfológico das colônias produzidas em nossos ensaios evidenciou o predomínio de macrófagos e granulócitos. Dessa forma, nossos resultados demonstram que o aumento na resistência dos animais pré-tratados com as doses de 100 e 250 mg/ kg do ERR à infecção pode estar relacionado com a elevação nos níveis de CSA a partir das 24 horas após a infecção, contribuindo para o aumento do número e migração de progenitores de macrófagos e granulócitos capazes de controlar a infecção. UDINTSEV e SCHAKHOV (1991), após tratamento com o extrato das raízes de *R. rosea*, também obtiveram proteção sobre as células da medula óssea de animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich e carcinoma pulmonar de Lewis tratados com o quimioterápico ciclofosfamida. Esse quimioterápico é tóxico para as células precursoras hematopoéticas e causa supressão medular. Assim, os autores sugerem que esta planta pode ter um efeito protetor na mielopoese em função de suas propriedades adaptógenas (UDINTSEV e SCHAKHOV 1991).

Interessante observar que o pré-tratamento de animais normais com as diferentes doses de ERR não produziu alterações em nenhum desses parâmetros. Além disso, a adição *in vitro* do ERR às culturas de células hematopoéticas da medula óssea de animais normais não produziu nenhum efeito sobre a formação de CFU-GM (dados não

mostrados), demonstrando a ausência de um efeito mieloestimulante tanto *in vitro* como *in vivo*.

Com base na mieloproteção *in vivo* promovida pelo ERR frente à infecção, procuramos investigar se fatores específicos do microambiente hematopoético estariam envolvidos neste efeito. O microambiente hematopoético é constituído por células hematopoiéticas e pelo estroma medular: células endoteliais, adipócitos, macrófagos e fibroblastos. O estroma medular tem como função regular a maturação e diferenciação dos precursores hematopoiéticos por meio de contato direto entre as células do estroma e células hematopoiéticas ou de forma indireta por meio da liberação dos fatores de crescimento (VALADARES, 2004; DEXTER, 1979; 1974). A integridade destes dois sistemas, bem como a associação entre eles, são fatores cruciais para a manutenção da homeostase hematopoética (SPOONCER et al., 1993).

Estudos *in vitro* demonstram que células da camada aderente, espontaneamente ou após a ativação, produzem uma série de fatores solúveis positivos ou negativos, dentre os quais fatores estimuladores de células tronco, IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, IL-12, CSFs, capazes de manter a sobrevivência, proliferação, diferenciação e auto-renovação de células hematopoiéticas (HERMAN et al., 1998; EAVES et al., 1991; FIBBE et al., 1988; ALLEN e DEXTER, 1984).

Uma forma de se avaliar o efeito de drogas sobre o microambiente medular é através do sistema de cultura líquida de longa duração de células hematopoéticas (LTBMC). Este sistema consiste em um modelo *in vitro* para estudo do estroma medular e de suas interações com as células hematopoéticas (VALADARES, 2004; SPOONCER et al., 1993). A supressão na formação do estroma medular induzido por drogas leva a um declínio rápido da formação de CFU-GM e morte das células progenitoras.

O fato da hematopoese poder ser mantida durante várias semanas *in vitro* através deste sistema de cultura, faz da LT BMC um modelo ideal para estudar os efeitos do ERR no microambiente hematopoético. Sendo assim, a capacidade do estroma medular de gerar e manter progenitores comprometidos com a linhagem granulocítica e macrofágica (CFU-GM) e a produção de fatores solúveis essenciais a manutenção da hematopoese como a IL-1 α e a IL-6 foram avaliados neste estudo.

Poucos estudos na literatura tratam dos efeitos de agentes infecciosos sobre o compartimento hematopoético. Em LT BMCs de pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, foi verificada uma redução no número de progenitores hematopoéticos (ISGRÒ et al., 2000; GILL, 1997). Similarmente, LAGNEAUX e colaboradores (1994) demonstraram que a infecção por Citomegalovírus promove uma redução na habilidade das células estromais suportar a hematopoese pela diminuição de fatores estimuladores de colônias (LAGNEAUX et al., 1994), posteriormente descrito como IL-6 (LAGNEAUX et al., 1996). Os ensaios realizados neste estudo mostram que a infecção com *L. monocytogenes* promove uma redução no número de CFU-GM em relação ao grupo controle, paralelo a uma diminuição nos níveis de IL-1 α e a IL-6 nas culturas. Estudos do nosso laboratório demonstram este mesmo perfil em relação ao número de CFU-GM em LT BMCs de camundongos portadores de tumor ascítico de Erlich (QUEIROZ et al., 2004) e expostos ao chumbo (QUEIROZ et al., 2008). Essa característica é reflexo da diminuição na capacidade do estroma manter a diferenciação e proliferação destes progenitores. Por outro lado, nas LT BMCs dos animais infectados pré-tratados com as doses de 100 e 250 mg/ kg do ERR não verificamos redução no número de precursores de granulócitos e macrófagos no sobrenadante da cultura, confirmando os resultados *in vivo* observados neste estudo.

É importante salientar que o número de precursores hematopoéticos na medula óssea de animais resistentes à *L. monocytogenes*, como o C57BL, é geneticamente maior que em linhagens susceptíveis como o BALB/ c, indicando que a mobilização de

granulócitos e macrófagos para o sítio de replicação bacteriana é importante para o controle da infecção (CHEERS et al., 1978; YOUNG e CHEERS, 1986). As doses de 50 e 500 mg/ kg não foram capazes de manter o crescimento e diferenciação de progenitores de macrófagos e granulócitos, confirmando a reduzida eficácia observada *in vivo* com estas dosagens frente à infecção.

Como citado, além das interações entre estroma medular e os precursores hematopoéticos, alguns reguladores endógenos positivos, tais como a IL-1 α e a IL-6, estão envolvidos na regulação da atividade proliferativa das células primitivas hematopoéticas. Neste contexto, um estudo de nosso grupo verificou produção reduzida de IL-6 em LTBMCS de animais expostos ao chumbo (QUEIROZ et al., 2008). Similarmente, LAGNEAUX e colaboradores (1996) observaram diminuição de IL-6 nas LTBMCS humanas após infecção com Citomegalovírus. Corroborando estes achados, uma redução significativa dos níveis de IL-6 e também de IL-1 α no sobrenadante das LTBMCS dos animais infectados foi observada neste estudo.

O pré-tratamento com 100 mg/ kg do ERR restabeleceu a capacidade das células estromais dos animais infectados de produzir IL-1 α e IL-6, o que é consistente com o aumento na capacidade do estroma para manter CFU-GM *in vitro*. Dentre os vários fatores envolvidos no controle da hematopoese, a IL-6 desempenha papel crítico na geração e manutenção da mielopoese em LTBMCS de murinos (HAUSER et al. 1997), sendo considerado um fator de sobrevivência de células tronco hematopoéticas (RODRIGUEZ et al., 2004; BERNAD et al. 1994). Do mesmo modo, a IL-1 α também é essencial para a atividade funcional destas células (MUENCH et al., 1992). Estudos na literatura demonstram que esta citocina acelera a recuperação granulopoética e trombopoética de camundongos mielossuprimidos por 5-fluorouracil (KOVACS et al., 1997). Além disso, ambas as citocinas, IL-1 α e IL-6, apresentam uma atividade sinérgica com os CSFs em estimular a hematopoese (DINARELLO, 1996; EAVES et al., 1991, IKEBUCHI et al., 1988). Portanto, parece provável que o ERR contribui para aumentar o

pool de células progenitoras, capazes de controlar a evolução da infecção através da produção de IL-1 α e IL-6. O aumento significativo na resistência dos animais confirma esta hipótese.

Neste contexto, nossos resultados sugerem que o efeito do ERR pode estar relacionado a alguma habilidade para manter o equilíbrio entre os estímulos positivos e negativos que controlam a mielopoese, o que resultaria em alterações celulares no sítio de replicação bacteriana. Portanto, no que diz respeito à variedade de efeitos regulatórios da IL-1 α e IL-6 sobre a hematopoese, os resultados parecem indicar que a recuperação induzida pelo ERR na produção destas citocinas pelas células estromais contribui para a manutenção da homeostase hematopoética.

Além da resposta inespecífica de macrófagos e neutrófilos ser fundamental contra a *Listeria*, a participação das células NK, principalmente pelas suas propriedades citotóxicas e capacidade de sintetizar IFN- γ , também é essencial na defesa contra a *Listeria* nos estágios iniciais da infecção (CHANG et al., 2007; ZENEWICS e SHEN, 2007; BERG et al., 2005; PAMER, 2004).

As células NK são consideradas componentes críticos na defesa do hospedeiro contra tumores, vírus e patógenos intracelulares como a *Listeria* (YOUNG e ORTALDO, 2006). São potentes efetoras do sistema imune inato e, após sofrerem estimulação por macrófagos ativados, participam no combate direto às células infectadas no foco inflamatório e no processo inicial de polarização para o perfil Th1 (JANEWAY JUNIOR, 2007; COSSART e BIERNE, 2001; ROGERS et al., 1992). A depleção *in vitro* e *in vivo* de células NK reduziram a produção de IFN- γ no primeiro dia após a infecção com *L. monocytogenes*, mostrando a importância destas células (TEIXEIRA e KAUFMANN, 1994). Está bem estabelecido que o IFN- γ , além de ativar as funções fagocíticas de macrófagos, potencializa a reatividade das células NK (MISAWA et al., 2000; MILLER, 2001).

Sendo assim, a avaliação da atividade funcional das células NK após a infecção com a bactéria mostrou um aumento na capacidade citotóxica destas células nas 48 e 72 horas de infecção, corroborando trabalhos da literatura (DAUGELAT et al., 1996) e de nosso laboratório (DANTAS et al., 1999). Quando os animais infectados foram pré-tratados com 100 e 250 mg/ kg de ERR, verificamos um aumento adicional na atividade citotóxica destas células nas 48 e 72 horas após a infecção. Por outro lado, as doses de 50 e 500 mg/ kg do extrato não produziram efeito na atividade funcional das células NK tanto de animais normais como de animais infectados com *L. monocytogenes*.

Em relação à análise quantitativa de células NK+ no baço dos animais, observamos que a porcentagem destas células não foi alterada na presença da infecção nos períodos avaliados. Similarmente, o pré-tratamento de animais normais ou infectados com o ERR não alterou a porcentagem dessas células no baço. Isto nos leva a concluir que o ERR promove apenas o aumento na atividade funcional das células NK e não o aumento quantitativo destas células nos períodos avaliadas, confirmados através do ensaio de citotoxicidade.

O aumento na atividade de células NK pela *Rhodiola* foi verificado recentemente por MISHA e colaboradores (2008). Os autores demonstraram que a adição *in vitro* do extrato aquoso de *Rhodiola imbricata* aumenta a atividade citotóxica das células NK provenientes de PBMCs humanas contra a linhagem leucêmica K-562. Esta ação foi sugerida à presença dos polifenóis nesta espécie. Com relação ao extrato das raízes de *Rhodiola rosea*, a literatura também descreve a presença de polifenóis em sua constituição fitoquímica (CHEN et al., 2008). Estudos sustentam a teoria de que a atividade imunomoduladora da *Rhodiola* está relacionada ao estímulo da resposta inata, através da produção de citocinas. Está bem esclarecido na listeriose murina que a produção de citocinas inflamatórias no início da infecção por macrófagos ativados induz a ativação de células NK (ZENEWICS e SHEN, 2007; PAMER, 2004). Dessa forma, nossos resultados parecem indicar que o aumento na atividade de células NK

promovido pelo ERR pode estar relacionado ao aumento na produção de citocinas inflamatórias envolvidas na resposta inata, as quais induziriam a ativação das células NK, colaborando na resistência dos animais à infecção.

Com base nos níveis de citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-10) avaliados a partir do sobrenadante da cultura de células esplênicas, pudemos observar que, através do aumento na produção de TNF- α e IFN- γ , o pré-tratamento de animais infectados com ERR estimulou o perfil celular Th1. A produção de citocinas de padrão Th1 e Th2 têm sido extensamente estudada no modelo de listeriose murina (BISWAS et al., 2008; CARRERO et al., 2006; BERG et al., 2005; ROACH et al., 2005; PAMER, 2004; COSSART e BIERNE, 2001; EDELSON e UNANUE, 2000; FERRICK et al. 1995; FLESCHE e KAUFMANN, 1994; BECKERMAN et al., 1993; ROGERS et al., 1992; BUCHMEIER e SCHEREIBER, 1985).

Está bem estabelecido que o IFN- γ e TNF- α são essenciais na defesa contra esta bactéria (BERG et al., 2005; ROACH et al., 2005; PAMER, 2004) e, camundongos nocauteados para estas citocinas sucumbem rapidamente após a infecção (HARTY e BEVAN, 1995; ROTHE et al., 1993). A IL-10, juntamente a IL-4, atua como supressora nos estágios iniciais da listeriose por induzir o perfil Th2 (BISWAS et al., 2008; CARRERO et al., 2006; FLESCHE e KAUFMANN, 1994). Estudos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo demonstram que a presença da infecção aumenta a concentração de IFN- γ em cultura de linfócitos estimulados com Concanavalina A. Adicionalmente, nenhuma alteração na secreção de IL-4 e IL-10 puderam ser detectadas nos estágios iniciais de infecção (QUEIROZ et al., 2000). Corroborando estes dados, a presença da infecção induziu um aumento significativo na produção de TNF- α nas culturas 24 e 48 horas após a inoculação da bactéria, e de IFN- γ nas 48 e 72 horas de infecção. Por outro lado, a produção de IL-10 não foi alterada pela infecção.

O pré-tratamento dos animais infectados com a dose 100 mg/ kg de ERR promoveu um aumento adicional significativo na liberação de TNF- α e IFN- γ em relação

à infecção, sem qualquer alteração na produção de IL-10. A administração do ERR modulou o perfil de produção de citocinas no animal infectado para Th1. A polarização do perfil para Th1 é uma característica fundamental no combate a microorganismos intracelulares e explica em parte, o aumento promovido pelo ERR na resistência do animal à dose letal de *L. monocytogenes*. Estudos realizados em camundongos C57BL6 nocauteados para o gene IFN- γ confirmam a importância desta interleucina na proteção de animais infectados com *Listeria monocytogenes*. Os resultados mostraram que, enquanto 100% dos animais controle, íntegros para o gene INF- γ sobrevivem à infecção, animais nocauteados são rapidamente eliminados (QUEIROZ et al., 2003).

Diante dos resultados expostos, nossos resultados demonstram que o ERR regula positivamente os desequilíbrios hematopoiéticos e imunológicos envolvidos nos estágios iniciais da infecção com *L. monocytogenes*. Nesse sentido, sua eficácia é dependente da recuperação no equilíbrio da resposta hematopoiética através da produção de IL-1 α e IL-6 pelas células estromais e também da produção de CSA a partir das 24 horas de infecção, promovendo um aumento no número progenitores de macrófagos e granulócitos na medula óssea. Além disso, a eficácia do ERR também depende do aumento na produção das citocinas TNF- α e IFN- γ , conseqüentemente o aumento na atividade funcional das células NK e polarização da resposta celular para Th1. Juntos, estes efeitos contribuem para o aumento na resistência a *L. monocytogenes*.

Este efeito promovido pelo ERR na produção de IL-1 α , IL-6, TNF- α , IFN- γ e CSA poderia estar relacionado à sua propriedade de modular a produção de citocinas. Trabalhos da literatura com o gênero *Rhodiola* sustentam esta hipótese, uma vez que a estimulação na produção *in vitro* de IL-6, TNF- α e óxido nítrico em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7, e de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em PBMCs humanas foi verificada (MISHRA et al., 2006; 2009). Além disso, MISHRA e colaboradores (2006) verificaram ativação da via do NF κ B em PBMCs humanas, sugerindo que a atividade imunomoduladora da *Rhodiola* está relacionada ao estímulo da resposta inata. Embora

não existam estudos que avaliem os efeitos do extrato da *Rhodiola rosea* sobre estes parâmetros, ao confrontarmos nossos resultados com os da literatura, ponderamos se o efeito promovido pelo ERR pode ser devido a alguma habilidade de estimular a resposta inata, através da modulação na produção de citocinas.

Ainda, plantas com propriedades adaptógenas contendo altas concentrações de polifenóis como a *Rhodiola rosea*, não oferecem apenas benefícios fisiológicos e farmacêuticos, mas também protegem células do organismo dos efeitos deletérios do estresse oxidativo. Recentemente, a propriedade antioxidante da *Rhodiola rosea* foi atribuída à presença dos polifenóis, os quais são capazes de neutralizar as reações oxidativas por reduzir radicais de oxigênio livre e peróxido de hidrogênio (CHEN et al., 2008). Dessa forma, a atividade antioxidante atribuída a *Rhodiola rosea* também poderia contribuir com os seus efeitos imunoematopoiéticos na proteção contra a *L. monocytogenes*, por reduzir o risco de complicações associadas ao estresse oxidativo, disponibilizando assim células mais eficientes para o combate da infecção.



6. CONCLUSÃO

A partir dos experimentos realizados podemos concluir que o ERR:

- Aumenta a resistência dos animais a listeriose por um interferir na resposta imunoematopoética;
- As doses mais eficazes do ERR foram 100 e 250 mg/ kg, aumentando a resistência dos animais frente uma dose letal da bactéria em 50% e 60%, respectivamente;
- As doses de 50, 500 e 1000 mg/ kg revelaram menor eficácia terapêutica, prolongando em apenas 10% a taxa de sobrevivência dos animais infectados;
- A dose de 25 mg/ kg não apresentou efeito frente à infecção;
- As doses de 100 e 250 mg/ kg previnem a mielossupressão, hematopoese extramedular e aumentam a atividade estimuladora de colônias hematopoéticas no soro de animais infectados;
- A dose de 50 mg/ kg promove uma interferência tardia nos parâmetros hematopoiéticos de animais infectados;
- As doses de 100 e 250 mg/ kg foram capazes de gerar e manter progenitores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) em LTBMCS de animais infectados;
- A dose de 100 mg/ kg induz aumento de IL-1 α e IL-6 no sobrenadante das LTBMCS dos animais infectados;
- As doses de 100 e 250 mg/ kg aumentam a atividade citotóxica de células NK de animais infectados nas 48 e 72 horas após a infecção;
- A dose de 100 mg/ kg não altera o número de células NK+ no baço dos animais infectados;
- A dose de 100 mg/ kg induz aumento de TNF- α e IFN- γ , bem como não altera os níveis de IL-10 em cultura de células esplênicas dos animais infectados;
- Não provoca alterações em animais normais nos parâmetros avaliados neste estudo.

A close-up photograph of a cluster of small, bright yellow flowers with green leaves and some pinkish buds. The text 'Referências bibliográficas' is overlaid on the bottom right of the image.

Referências bibliográficas

Abidov M, Crendal F, Grachev S, Seifulla R, Ziegenfuss T. Effect of extracts from *Rhodiola rosea* and *Rhodiola crenulata* (Crassulaceae) roots on ATP content in mitochondria of skeletal muscles. Bull Exp Biol Med 2003; 136: 585-7.

Afan AM, Broome CS, Nicholls SE, Whetton AD, Miyan JA. Bone marrow innervation regulates cellular retention in the murine haemopoietic system. Br J Haematol 1997; 98: 569-77.

Allen TD, Dexter TM. The essential cells of the hemopoietic microenvironment. Exp Hematol 1984; 12: 517-21.

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

Balunas MJ, Kinghorn D. Drug discovery from medicinal plants. Life Sciences 2005; 78: 431-41.

Beckerman KP, Rogers HW, Corbett JA, Schreiber RD, McDaniel ML, Unanue ER. Release of nitric oxide during the T cell-independent pathway of macrophage activation. Its role in resistance to *Listeria monocytogenes*. J Immunol 1993; 150: 888-95.

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

Bernad A, Kopf M, Kulbacki R, Weich N, Koehler G, Gutierrez-Ramos JC. Interleukin-6 is required *in vivo* for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. Immunity 1994; 1: 725-31.

Biswas PS, Pedicord V, Ploss A, Menet E, Leiner I, Pamer EG. Pathogen-specific CD8 T cell responses are directly inhibited by IL-10. J Immunol 2007; 179: 4520-8.

Braun L, Cossart P. Interactions between *Listeria monocytogenes* and host mammalian cells. *Microbes Infect* 2000; 2: 803-11.

Broome CS, Whetton AD, Miyan JA. Neuropeptide control of bone marrow neutrophil production is mediated by both direct and indirect effects on CFU-GM. *Br J Haematol* 2000; 108: 140-50.

Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11 ed. Estados Unidos: McGraw-Hill; 2006. 1984p.

Buchmeier NA, Schreiber RD. Requirement of endogenous interferon- γ production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7404-8.

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

Carrero JA, Calderon B, Unanue ER. Lymphocytes are detrimental during the early innate immune response against *Listeria monocytogenes*. *JExp Med* 2006; 203: 933-40.

Carryn S, Van de Velde S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Impairment of Growth of *Listeria monocytogenes* in THP-1 Macrophages by Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor: Release of Tumor Necrosis Factor- α and Nitric Oxide. *JInfect Dis* 2004; 189: 2101-9.

Chang SR, Wang KJ, Lu YF, Yang LJ, Chen WJ, Lin YH, et al. Characterization of early gamma interferon (IFN- γ) expression during murine listeriosis: Identification of NK1.1⁺ CD11c⁺ cells as the primary IFN- γ -expressing cells. *Infect Immun* 2007; 75: 1167-76.

Cheers C, McKenzie IFC, Pavlo VH, Waid C, York J. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: course of listeriosis in resistant or susceptible mice. *Infect Immun* 1978; 19: 763-70.

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

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. *Infect Immun* 1988; 56: 2972-8.

Chen TS, Liou SY, Chang YL. Antioxidant evaluation of three adaptogen extracts. *Am J Chin Med* 2008; 36:1209-17.

Conlan JW, North RJ. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. *JExp Med* 1991; 174: 741-4.

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. *JExp Med* 1994; 179: 259-68.

Cossart P, Bierne H. The use of host cell machinery in pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 96-103.

Cossart P. Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. *Microbes Infect* 2007; 9: 1143-6.

Cossart P, Toledo-Arana A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect* 2008; 10: 1041-50.

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

Dantas D, Kaneno R, Queiroz MLS. The effects of *Chrorella vulgaris* in the protection of mice infected with *Listeria monocytogenes*. Role of natural killer cells. Immunopharmacol Immunotoxicol 1999; 21: 609-19.

Darbinyan V, Kteyan A, Panossian A, Gabrielian E, Wikman G, Wagner H. *Rhodiola rosea* in stress induced fatigue: a double blind cross-over study of a standardized extract SHR-5 with a repeated low-dose regimen on the mental performance of healthy physicians during night duty. Phytomedicine 2000; 7: 365-71.

Daugelat S, Ladel CH, Flesch IE, Kaufmann SH. Activation of natural killer cells by heat-killed *Listeria monocytogenes* requires additional signals from lymphoid cells. Immunol Letters 1996; 50: 81-5.

Dexter TM, Lajtha LG. Proliferation of hemopoietic stem cells *in vitro*. Br J Hematol 1974; 28: 525-30.

Dexter TM. Haemopoiesis in long-term bone marrow cultures. A review. Acta Haematol 1979; 62: 299-305.

Dieamant GC, Velásquez-Pereda MDC, Eberlin S, Nogueira C, Werka RM, Queiroz MLS. Neuroimmunomodulatory compound for sensitive skin care: *in vitro* and clinical assessment. J Cosmetic Dermatol 2008; 7: 112-9.

Diermen DV, Marstona A, Bravob J, Reist M, Carrupt PA, Hostettmann K. Monoamine oxidase inhibition by *Rhodiola rosea* L. roots. J Ethnopharmacol 2009; 122: 397-401.

Dinarelllo CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood 1996; 87: 2095-147.

Eaves CJ, Cashman JD, Kay RJ, Dougherty GJ, Otsuka T, Gaboury LA, et al. Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. II. Analysis of positive and negative regulators produced by stromal cells within the adherent layer. Blood 1991; 78: 110-7.

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

Edelson BT, Unanue ER. Immunity to *Listeria* infection. Curr Opin Immunol 2000; 12: 425-31.

Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon- γ and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gdT cells *in vivo*. Nature 1995; 373: 255-7.

Fibbe WE, Van Damme J, Billiau A, Goselink HM, Voogt PH, Van Eeden G, et al. Interleukin-1 induces human marrow stromal cells in long-term culture to produce granulocyte colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor. Blood 1988; 71: 430-5.

Flesh IEA, Kaufmann SHE. Role of macrophages and alpha beta T lymphocytes in early interleukin 10 production during *Listeria monocytogenes* infection. Int Immunol 1994; 6: 463-8.

Ganzera M, Yayla Y, Khan IA. Analysis of the Marker Compounds of *Rhodiola rosea* L. (Golden Root) by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. Chem Pharm Bull 2001; 49: 465-7.

Gill V, Shattock RJ, Scopes J, Hayes P, Freedman AR, Griffin GE, et al. Human Immunodeficiency Virus Infection Impairs Hemopoiesis in Long-Term Bone Marrow Cultures: Nonreversal by Nucleoside Analogues. J Infect Dis 1997; 176: 1510-6.

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

Hamon M, Bierne H, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4: 423-34.

Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 275-308.

Hauser SP, Kajkenova O, Lipschitz DA. The Pivotal Role of Interleukin-6 in Formation and Function of Hematopoietically Active Murine Long-Term Bone Marrow Cultures. *Stem Cells* 1997; 15: 125-32.

Havell EA. Evidence that tumor necrosis factor has an important role in antibacterial resistance. *J Immunol* 1989; 143: 2894-9.

Hengge UR, Benninghoff B, Ruzicka T, Goos M. Topical immunomodulators- progress towards treating inflammation, infection, and cancer. *Lancet Infect Dis* 2001; 1: 189-98.

Herman P, Ferrant A, De Bruyere M, Straetmans N. Stromal factors support the expansion of the whole hemopoietic spectrum from bone marrow CD34 + DR – cells and of some hemopoietic subset from CD34+ and CD34 + DR + cells. *Leukemia* 1998; 12: 735-45.

[http:// atlas.medmicro.info](http://atlas.medmicro.info) [30/ 06/ 09]

Ikebuchi K, Ihle JN, Hirai Y, Wong GG, Clark SC, Ogawa M. Synergistic factors for stem cell proliferation: further studies of the target stem cells and the mechanism of stimulation by interleukin-1, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1988; 72: 2007-14.

Isgrò A, Mezzaroma I, Aiuti A, De Vita L, Franchi F, Pandolfi F, et al. Recovery of Hematopoietic Activity in Bone Marrow from Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients during Highly Active Antiretroviral Therapy. *Aids Res Hum Retroviruses* 2000; 16: 1471-9.

Iizawa Y, Brown JF, Czuprynski CJ. Early expression of cytokine mRNA in mice infected with *Listeria monocytogenes*. Infect Immun 1992; 60: 4068-73.

Janeway Junior CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença. 6 ed. Porto Alegre: Artmed Editora AS; 2007. 848p.

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. Infect Immun 2002; 70: 4682-6.

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

Kelly GS. *Rhodiola rosea*: A Possible Plant Adaptogen. Altern Med Rev 2001; 6: 293-302.

Kim SH, Hyun SH, Choung SY. Antioxidative effects of *Cinnamomi cassiae* and *Rhodiola rosea* extracts in liver of diabetic mice. Biofactors 2006; 26: 209-219.

Kormosh N, Laktionov K, Antoshechkina M. Effect of a Combination of Extract from Several Plants on Cell-Mediated and Humoral Immunity of Patients with Advanced Ovarian Cancer. Phytother Res 2006; 20: 424-5.

Kovacs CJ, Evans MJ, Daly BM, Thomas-Patterson D, Johnke RM, Powell DS. Secondary cytokines interact in sequence with interleukin-1 alpha (IL-1 alpha) with or without macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) to further accelerate granulopoietic recovery in myelosuppressed animals. J Interferon Cytokine Res 1997; 17: 453-60.

Kurkin VA, Zapesochaya GG. Chemical composition and pharmacological characteristics of *Rhodiola rosea* [review]. J Med Plants (Moscow) 1985; 1231-445.

Kwon YI, Jang HD, Shetty K. Evaluation of *Rhodiola crenulata* and *Rhodiola rosea* for management of Type II diabetes and hypertension. Asia Pac J Clin Nutr 2006; 15: 425-32.

Lagneaux L, Delforge A, Snoeck R, Bosmans E, Moreau JF, Taupin JL, et al. Human cytomegalovirus increases constitutive production of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *Blood* 1996; 87: 59-66.

Lagneaux L, Delforge A, Snoeck R, Stryckmans P, Bron D. Decreased production of cytokines after cytomegalovirus infection of marrow-derived stromal cells. *Exp Hematol* 1994; 22: 26-30.

Linh PT, Kim YH, Hong SP, Jian JJ, Kang JS. Quantitative determination of salidroside and tyrosol from the underground part of *Rhodiola rosea* by high performance liquid chromatography. *Arch Pharm Res* 2000; 23: 349-52.

Ma CY, Tang J, Wang H, Gu X, Tao GJ. Simultaneous Determination of Six Active Compounds in *Rhodiola* L. by RP-LC. *Chromatographia* 2008; 67: 383–8.

Mackaness GB. Cellular resistance to infection. *JExp Med* 1962; 116: 381-406.

Maestroni GJ, Conti A. Modulation of hematopoiesis via alpha 1-adrenergic receptors on bone marrow cells. *Exp Hematol* 22: 313–20, 1994.

Majewska A, Grazyna H, Mirosława F, Natalia U, Agnieszka P, Alicja G, et al. Antiproliferative and antimitotic effect, S phase accumulation and induction of apoptosis and necrosis after treatment of extract from *Rhodiola rosea* rhizomes on HL-60 cells. *JEthnopharmacol* 2006; 103: 43-52.

Masihi KN. Immunomodulators in infectious diseases: panoply of possibilities. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22: 1083-91.

McLauchlin J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control* 1996; 7: 187-93.

Melo A, Justo GZ, Queiroz MLS. Stimulation of myelopoiesis in *Listeria monocytogenes*-infected mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. *Hum Exp*

Toxicol 2001; 20: 38-45.

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: 257-67.

Metcalf D. The molecular control of blood cells. Londres: Harvard University Press; 1988. 165p.

Metcalf D, Nicola NA. The Hematopoietic Colony-Stimulating Factors: From Biology to Clinical Applications. Cambridge: Cambridge University Press; 1995. 329 p.

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

Miller JS. The biology of natural killer cells in cancer, infection, and pregnancy. Exp Hematol 2001; 29: 1157-68.

Misawa E, Sakurai T, Yamada M, Hayasawa H, Motoyoshi K. Effects of macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 administration on NK1.1+ cells in mice. Int J Immunopharmacol 2000; 22: 967-77.

Mishra KP, Ganju L, Chanda S, Karan D, Sawhney RC. Aqueous extract of *Rhodiola imbricata* rhizome stimulates Toll-like receptor 4, granzyme-B and Th1 cytokines *in vitro*. Immunobiology 2009; 214: 27-31.

Mishra KP, Padwad YS, Dutta A, Ganju L, Sairam M, Banerjee PK, et al. Aqueous extract of *Rhodiola imbricata* rhizome inhibits proliferation of an erythroleukemic cell line K-562 by inducing apoptosis and cell cycle arrest at G2/ M phase. Immunobiology 2008; 213: 125-31.

Mishra KP, Padwad YS, Jain M, Karan D, Ganju L, Sawhney RC. Aqueous extract of

Rhodiola imbricata rhizome stimulates proinflammatory mediators via phosphorylated I κ B and transcription factor nuclear factor- κ B. Immunopharmacol Immunotoxicol 2006; 28: 201-12.

Miyan JA, Broome CS, Afan AM. Coordinated host defense through an integration of the neural, immune and haemopoietic systems. Domest Anim Endocrinol 1998; 15: 297-304.

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

Monograph. *Rhodiola rosea*. Altern Med Rev 2002; 7 (5): 421-3.

Muench MO, Schneider JG, Moore MA. Interactions among colony-stimulating factors, IL-1 beta, IL-6 and kit-ligand in the regulation of primitive murine hematopoietic cells. Exp Hematol 1992; 20: 339-49.

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

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

North RJ. The relative importance of blood monocytes and fixed macrophages to the expression of cell-mediated immunity to infection. JExp Med 1970; 132: 521-34.

Pamer EG. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. Nature Rev Immun 2004; 4: 812-23.

Portnoy DA, Auerbuch V, Glomski IJ. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. J Cell Biol 2002; 158: 409-14.

Qiu X, Zhu L, Pollard JW. Colony-Stimulating Factor-1-Dependent Macrophage Functions Regulate the Maternal Decidua Immune Responses against *Listeria monocytogenes* Infections during Early Gestation in Mice. *Infect Immun* 2009; 77: 85-97.

Queiroz MLS, Quadros MR, Santos LMB. Cytokine profile and natural killer cell activity in *Listeria monocytogenes* infected mice treated orally with *Petiveria alliacea* extract. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2000; 22: 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. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2001; 23: 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*. *Int Immunopharmacol* 2003; 3: 889-900.

Queiroz ML, Valadares MC, Bincoletto C, Dieamant GC. Ehrlich ascites tumor as a tool in the development of compounds with immunomodulatory properties. *Imunopharmacol Imunotoxicol* 2004; 26: 511-25.

Queiroz MLS, Torello CO, Perhs SMC, Rocha MC, Bechara EJH, Morgano MA, et al. *Chlorella vulgaris* up-modulation of myelosuppression induced by lead: The role of stromal cells. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 3147-54.

Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, et al. *Listeria*-review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect* 2007; 40: 4-13.

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

Roach DR, Briscoe H, Saunders BM, Britton WJ. Independent protective effects for tumor necrosis factor and lymphotoxin alpha in the host response to *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* 2005; 73: 4787-92.

Rodriguez MC, Bernad A, Aracil M. Interleukin-6 deficiency affects bone marrow stromal precursors, resulting in defective hematopoietic support. *Blood* 2004; 103: 3349-54.

Rogers HW, Sheehan KC, Brunt LM, Dower SK, Unanue ER, Schreiber RD. Interleukin-1 participates in the development of anti-*Listeria* response in both normal and scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1011-5.

Rogers HW, Unanue ER. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect Immun* 1993; 61: 5090-6.

Rothe J, Lesslauer W, Lötscher H, Lang Y, Koebel P, Köntgen F, et al. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 1993; 364: 798-802.

Souza-Queiroz J de, Torello CO, Palermo-Neto J, Valadares MC, Queiroz MLS. Hematopoietic response of rats exposed to the impact of an acute psychophysiological stressor on responsiveness to an *in vivo* challenge with *Listeria monocytogenes*: modulation by *Chlorella vulgaris* prophylactic treatment. *Brain Behav Immun* 2008; 22: 1056-65.

Spasov AA, Wikman G, Mandrikov VB, Mironova IA, Neumoin VV. A double-blind, placebo-controlled pilot study of the stimulating and adaptogenic effect of *Rhodiola rosea* SHR-5 extract on the fatigue of students caused by stress during an examination period with a repeated low-dose regimen. *Phytomedicine* 2000; 7: 85-9.

Spooncer E, Elianson J, Dexter M. Hematopoiesis: A practical approach, NG Testa and G Molineux, Oxford, University press New York, 1993.

Teixeira HC, Kaufmann SHE. Role of NK1.1 cells in experimental listeriosis. J Immunol 1994; 152: 1873-82.

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

Tolonen A, Pakonen M, Hohtola A, Jälonen J. Phenylpropanoid Glycosides from *Rhodiola rosea*. Chem Pharm Bull 2003; 51: 467-70.

Udintsev SN, Schakhov VP. Decrease of cyclophosphamide haematotoxicity by *Rhodiola rosea* root extract in mice with Ehrlich and Lewis transplantable tumors. Eur J Cancer 1991; 27: 1182.

Unanue ER. Macrophages, NK cells and neutrophils in the cytokine loop of *Listeria* resistance. Res Immunol 1996; 147: 499-505.

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

Valadares MC. The use of clonal culture of hematopoietic progenitors in the investigation of the potential myelosuppressive of new chemicals. Rev Eletrônica Farmácia 2004; 1: 34-51.

Van Den 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.

Walker TB, Robergs RA. Does *Rhodiola Rosea* Possess Ergogenic Properties? Int J Sport Nutr Exerc Metabol 2006; 16: 305-15.

Wang H, Ding Y, Zhou J, Sun X, Wang S. The *in vitro* and *in vivo* antiviral effects of salidroside from *Rhodiola rosea* L. against coxsackievirus B3. Phytomedicine 2009; 16: 146-55.

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 non immune mice. *Infect Immun* 1985; 49: 325-8.

Wing EJ, Waheed A, Shadduck RK. Changes in serum colony-stimulating factor and monocytic progenitor cells during *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Infect Immun* 1984; 45: 180-4.

www.biocarta.com/pathfiles/h_stemPathway.gif [30/ 06/ 09]

www.plant-identification.com.uk/crassulaceae/rhodiola-rosea.htm [30/ 06/ 09]

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

Young HA, Ortaldo J. Cytokines as critical co-stimulatory molecules in modulating the immune response of natural killer cells. *Cell Res* 2006; 16: 20-4.

Yousef GG, Grace MH, Cheng DM, Belolipov IV, Raskin I, Lila MA. Comparative phytochemical characterization of three *Rhodiola* species. *Phytochemistry* 2006; 67: 2380-91.

Zenewicz LA, Shen H. Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: A short overview. *Microbes Infect* 2007; 9: 1208-15.

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: 863-9.

Zon LI. Hematopoiesis: a developmental approach. 1 ed. Estados Unidos: Oxford University Press; 2001. 814p.



Anexo 1 - Certificado de análise do extrato de *Rhodiola rosea* L.



Hangzhou Skyherb Technologies Co.,Ltd.

Add: 3610 Jindi Building, 206 Wen'er Rd, Hangzhou, China 310012

Tel:86-571-88053319

Fax:86-571-88054060

Website: www.skyherb.net

Email: Richard@skyherb.net

CERTIFICATION OF ANALYSIS

Product Name	Rhodiola rosea P.E.	Plant Latin Name	<i>Rhodiola Rosea</i> L.
Lot No.	RHR200608161	Quantity	1000Kg
Issue Date	Aug. 16 2006	Shelf Life	3 years
Used Part	Roots	Extract solvent	Ethanol, Water
Description	An powder extract of Rhodiola rosea root		
Storage Condition	Store in tightly closed plastic bag at room temperature in dry place.		
Safety Precaution	Avoid dusting, Irritant; Wear protective eye wear, if eye contact, flush with water for 10 minutes, wash skin with soap and water.		

Identifications	Standards	Results	Methods
------------------------	------------------	----------------	----------------

Appearance	Light Yellow-brownish powder		
Odor	Character odor of the herb Rhodiola Rosea		
Powder Size	98%through 100 mesh	Complied	
Rosavins	≥8%	3.15%	HPLC
Salidroside	≥1%	2.06%	HPLC
Residue	≤5%	Complied	USP25
Loss on Dry	≤5%	Complied	USP25
Bulk Density (g/ml)	0.25—0.40	Complied	
Heavy Metals	≤10ppm	Complied	USP25
Lead	≤10ppm	Complied	USP25
Arsenic	≤2ppm	Complied	USP25

Solvents residue

Ethanol	≤1000ppm	Complied	GC
Pesticides Residue	≤100ppb	Complied	GC

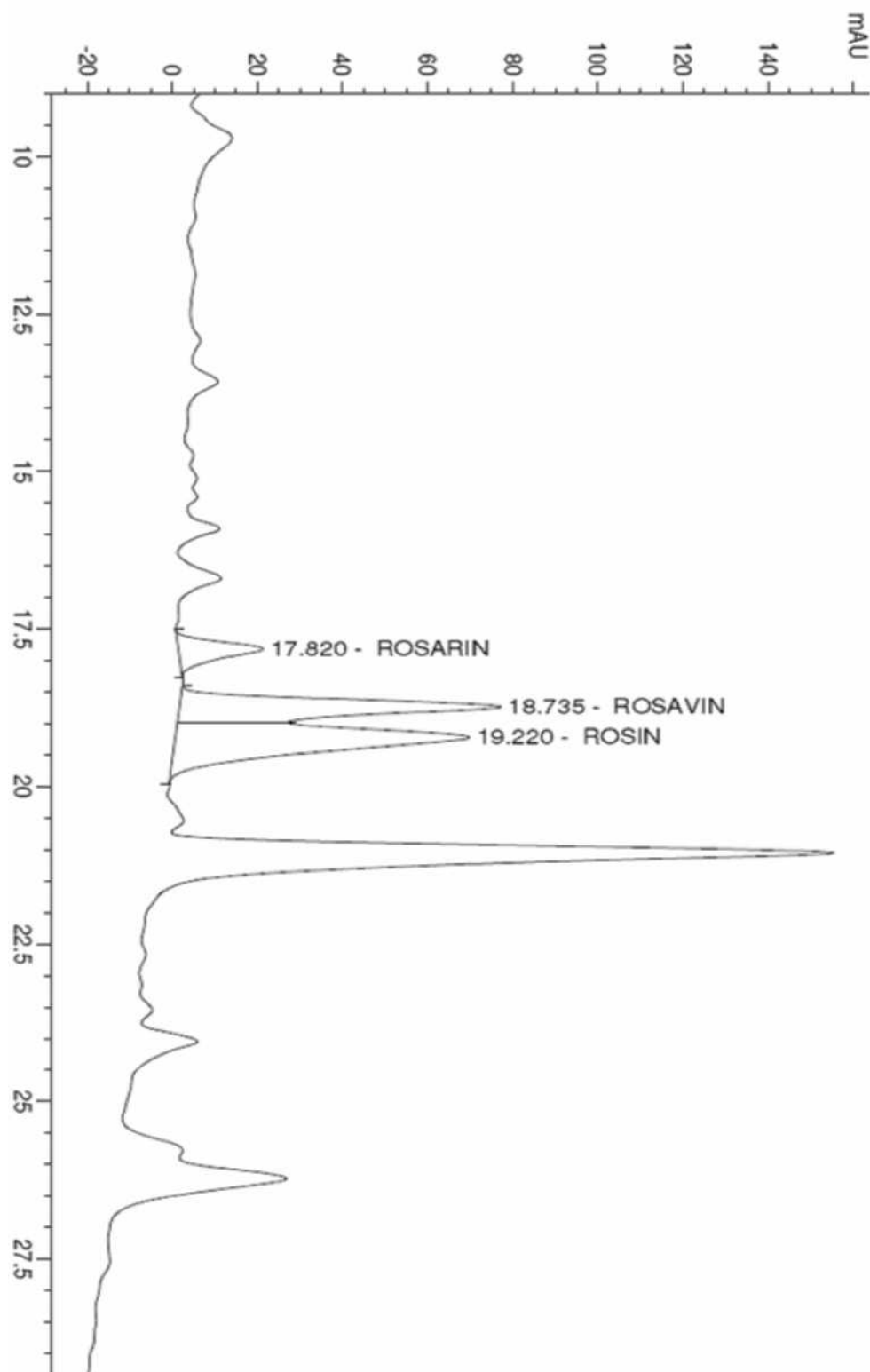
Microbiological Specifications

Total Aerobic (CFU/g)	≤1000	Complied	USP25
Mold and Yeast (CFU/g)	≤100	Complied	USP25
E. Coli	Negative	Negative	USP25
Salmonella	Negative	Negative	USP25

Irradiated Statement

Non-Irradiated

Anexo 2 - Laudo de HPLC do extrato de *Rhodiola rosea* L.



Anexo 3 - Protocolo experimental

 UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia	 CEEa-IB-UNICAMP
--	--	--

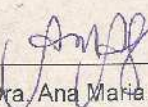
**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEa-IB-UNICAMP**

CERTIFICADO

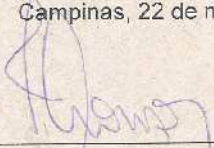
Certificamos que o Protocolo nº 964-1, sobre **"AVALIAÇÃO DO EXTRATO DE RHODIOLA ROSAE NA RESPOSTA HEMOTOPOÉICA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM LISTERIA MONOCYTOGENES"** sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz / Cristiane Okuda Torello** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa)-IB-UNICAMP em reunião de 22 de março de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 964-1, entitled **"EVALUATION OF RHODIOLA ROSAE EXTRACT OF THE HEMATOPOIETIC RESPONSE IN LISTERIA MONOCYTOGENES INFECTED MICE"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on March 22, 2006.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEa/IB - Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3788-6359
Telefax: (19) 3785-6356
E-mail: ceea@cemib.unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>