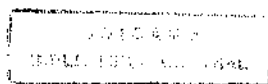


ADRIANA DE MELO

**Modulação de Parâmetros Imunológicos da Resposta
Não Específica pelo Composto MAPA**

UNICAMP

1999



ADRIANA DE MELO

**Modulação de Parâmetros Imunológicos da Resposta
Não Específica pelo Composto MAPA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Co-orientadora: Giselle Zenker Justo

UNICAMP

1999

UNIDADE B.c
N.º CHAMADA: F/UNICAMP
018302
V. _____ Ex. _____
TOMPO DE 41003
278100
R\$ 11,00
DATA 25/04/00
N.º CPD _____

CM-00142022-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

M491m

Melo, Adriana de

Modulação de parâmetros imunológicos da resposta não específica pelo composto MAPA / Adriana de Melo. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientadores : Mary luci de Souza Queiroz, Giselle Zenker Justo
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Listeria monocytogenes. 2. Neutrófilos. 3. Fagocitose. 4. Quimiotaxia. I. Mary Luci de Souza Queiroz. II. Giselle Zenker Justo. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.



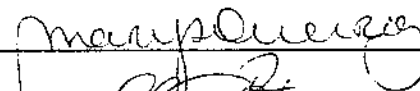
Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:


Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Membros:

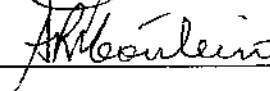
1. Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz



2. Profa. Dra. Claudia Bincoletto Trindade



3. Profa. Dra. Alba Regina Monteiro de Souza Brito



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

Data: 17/12/99

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por me conferir o dom da vida e por me dar coragem para enfrentar os problemas do dia a dia.

Agradeço aos meus pais, por me conferirem a existência e por me permitirem a construção de minha vida.

À Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, orientadora deste trabalho, pelo apoio e estímulo ao meu desenvolvimento científico, assim como pela amizade.

À Profa. Dra. Giselle Zenker Justo, co-orientadora deste trabalho, pelo apoio e amizade.

Aos amigos do laboratório CFU: Cláudia, Solange, Denise, Marize, Fátima, Marlene, Raphael, Sueli e outros mais, pela amizade e cooperação no decorrer das minhas atividades de mestrado.

Aos profissionais do Departamento de Comunicação Social do Hemocamp: Sandrinha e Rosana.

Ao Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero pelo auxílio na obtenção da substância, a qual foi imprescindível para a realização deste trabalho.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

Agradeço, enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo.....	i
Summary.....	v
Introdução	1
Objetivos.....	11
Materiais e métodos.....	13
1. Substância teste MAPA.....	14
2. <i>Listeria monocytogenes</i>	14
3. Estudo <i>in vitro</i>	15
3.1- Preparação das Células de Levedura.....	15
3.2- Capacidade Fagocitária e Lítica Frente aos Antígenos <i>Candida albicans</i> e <i>Candida kefyr</i>	16
3.2.1- Princípio do método	16
3.2.2- Descrição da técnica	16
3.3- Teste do Nitroblue Tetrazolium (N.B.T.).....	17
3.3.1- Princípio do método	17
3.3.2- Descrição da técnica	17
3.4- Atividade quimiotática de neutrófilos.....	18
3.4.1- Princípio do método	18
3.4.2- Descrição da técnica	18

4. Estudos <i>in vivo</i>	20
4.1- Animais.....	20
4.2- Cultura Clonal de Precursores Hematopoiéticos de Medula Óssea (CFU-GM) de Camundongos	20
4.3- Preparação do Fator Estimulador do Crescimento de Colônias (CSF). Meio Condicionado de Células Esplênicas (SCM)	22
4.4- Efeitos <i>in vitro</i> do Composto MAPA nos números de Células Formadoras de Colônias de Medula Óssea (CFU-GM).....	23
4.5- Realização da Curva de Sobrevida	23
5. Estatística.....	23

Resultados..... 24

1. Capacidade Fagocitária e Lítica Frente aos Antígenos <i>Candida albicans</i> e <i>Candida kefyr</i>	25
2. Teste do Nitroblue Tetrazolium (N.B.T.).....	30
3. Atividade quimiotática de neutrófilos.....	32
4. Cultura Clonal de Precursores Hematopoiéticos de Medula Óssea (CFU-GM) de Camundongos	34
5. Efeitos <i>in vitro</i> do Composto MAPA nos números de Células Formadoras de Colônias de Medula Óssea (CFU-GM).....	36
6. Realização da Curva de Sobrevida	37

Discussão.....	39
1. Capacidade Fagocitária e Lítica Frente aos Antígenos <i>Candida albicans</i> e <i>Candida kefyr</i>	40
2. Teste do Nitroblue Tetrazolium (N.B.T.).....	42
3. Atividade quimiotática de neutrófilos.....	43
4. Cultura Clonal de Precursores Hematopoiéticos de Medula Óssea (CFU-GM) de Camundongos	45
Conclusões	49
Referências Bibliográficas	51
Apêndice	b

Resumo

Neste trabalho, investigamos os efeitos imunomoduladores do composto MAPA nas atividades fagocitária, lítica e quimiotática de neutrófilos frente aos antígenos *Candida albicans* e *Candida kefyr in vitro*, bem como sobre o crescimento e diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea para a série granulócito-macrófago (CFU-GM) de animais infectados com *Listeria monocytogenes*. A capacidade fagocitária apresentou-se aumentada com todas as concentrações de MAPA utilizadas (25, 50, 75 e 1000 µg/mL) frente à *C. albicans*. Por outro lado, em presença de *C. kefyr* houve um aumento com as três maiores concentrações (50, 75 e 1000 µg/mL). Quanto à capacidade lítica, houve um aumento nas três menores concentrações frente à *C. albicans* e com as três maiores concentrações frente à *C. kefyr*, indicando uma ação do composto na aderência dos fagócitos, bem como no processo de desgranulação de neutrófilos. A capacidade do neutrófilo de reduzir o corante nitroblue tetrazolium apresentou-se aumentada nas duas maiores concentrações testadas (50 e 75 µg/mL), sugerindo uma ação do composto MAPA na produção de óxido nítrico. A quimiotaxia foi utilizada para o estudo quantitativo da locomoção de leucócitos polimorfonucleares, quando incubados com as concentrações de 25, 50 e 75 µg/mL de MAPA. Esta atividade apresentou-se aumentada apenas quando as células polimorfonucleares foram incubadas com a concentração de 75 µg/mL. Para a realização dos experimentos *in vivo* os animais foram tratados por 7 dias consecutivos nas doses de 0,5; 2,0; 5,0 e

7,5 mg/Kg de MAPA. Ao final do tratamento, os animais foram infectados com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes*. Após a infecção ocorreu uma diminuição dos números de CFU-GM na medula óssea dos animais. Os animais previamente tratados com MAPA apresentaram um aumento no número de CFU-GM da medula óssea com as doses de 2,0 e 5,0 mg/Kg às 48 e 72 horas após a infecção, em relação ao controle e ao grupo infectado. Para avaliar a resistência destes animais à infecção pela *L. monocytogenes* realizamos uma curva de sobrevida, utilizando uma dose letal da bactéria (3×10^8 bactérias/animal). Trinta e quarenta por cento dos animais previamente tratados com as doses de 0,5 e 5,0 mg/Kg de MAPA, respectivamente, sobreviveram à dose letal da *L. monocytogenes*, enquanto 100% dos animais do grupo controle infectado morreram em oito dias. No entanto, com 7,5 mg/Kg de MAPA todos os animais morreram em até oito dias, não havendo proteção contra a infecção. Diante dos resultados obtidos neste trabalho, podemos sugerir que o composto MAPA aumenta a resistência dos camundongos BALB/c infectados com a *L. monocytogenes* através do aumento dos precursores hematopoiéticos da medula óssea.

Summary

In this work, we investigated the effects of MAPA on the immune response. We have studied the neutrophils exposed to these compound of six normal individuals. Phagocytosis and killing of *Candida albicans* and *Candida kefyr* by neutrophils, neutrophil chemotaxis and nitroblue tetrazolium reduction were measured. The results obtained demonstrated an increase in the phagocytic function of neutrophils in exposed to MAPA. On the other hand, lysis of *C. albicans* and *C. kefyr* by neutrophils was significantly increased. We also observed a significant increase of nitroblue tetrazolium reduction and neutrophil chemotaxis in these cells.

We also investigated the effects of magnesium ammonium phospholinate-palmitoleate anhidryde (MAPA), a proteic aggregated polymer isoleted from *Aspergillus orizae*, on the growth and differentiation of granulocyte-macrophage progenitor cells (CFU-GM) in normal and *Listeria monocytogenes* infected mice. MAPA was administred subcutaneously (0.5-7.5 mg/Kg) for 7 days. In the MAPA treated/infected groups *L. monocytogenes* was administred at the end of MAPA treatment. A significant reduction in the numbers of CFU-GM was observed at 48 h after the infection, followed by a slight restoration at 72 h. Treatment of these animals previously to infection stimulated marrow myelopoiesis in a dose-dependent manner. The 5.0 mg/Kg MAPA was the optimal biological active dose in infected mice and this dose shedule also stimulated myelopoiesis in normal mice. The 0.5 and 5.0 mg/Kg doses given prior to infection with a lethal dose of 3×10^8 bacteria/animal led to a 30% and 40% survival, respectively. These results demonstrated that MAPA produces a significant increase in the resistance of the animals infected with *L. monocytogenes*, and that this protection is due, at least in part to increased CFU-GM in the bone marrow of infected animals.

Introdução

Nos últimos anos, a busca de alternativas mais eficazes para a terapia de doenças infecciosas e neoplásicas tem mobilizado profissionais de diferentes áreas. Resultados promissores têm surgido, particularmente, com a utilização de imunomoduladores (Hollinshead, 1986; Dunn, 1993; Strannegaard, 1995; Wagstaff, 1995; Wilson e Kay, 1995). Além disso, resultados encorajadores quanto ao potencial de compostos sintéticos ou naturais para modificar a resposta imune têm ampliado o interesse na busca de drogas alternativas com atividade direta ou indireta sobre diferentes alvos celulares.

Em 1990 Durán *et al.* caracterizaram um novo composto fúngico cuja estrutura foi denominada como sendo um agregado de fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio protéico (PM=316 KDa), conhecido atualmente pelo nome abreviado de MAPA. Em estudos preliminares, diferentes atividades biológicas foram atribuídas ao composto. Particularmente a atividade antiviral *in vivo*, contra o vírus da parvovirose e da cinomose canina, foi excepcionalmente encorajadora para que estudos subsequentes fossem realizados (Durán *et al.*, 1990^{a,b}).

Embora não citotóxico contra 53 linhagens de células tumorais (Durán *et al.*, 1993), experimentos recentes conduzidos em ratas inoculadas com células tumorais de Walker-256 e tratadas com MAPA (Justo, 1996) confirmaram a hipótese de atividade antineoplásica proposta por Durán *et al.* (1993) em ensaios anteriores. Ademais, foi proposto que os mecanismos de defesa do hospedeiro estão diretamente envolvidos na atividade biológica observada para o composto (Durán *et al.*, 1993; Justo, 1996).

Em estudos preliminares Durán *et al.* (1993) verificaram estimulação no número de células produtoras de anticorpos em culturas de células esplênicas de camundongos tratados com MAPA. Além disso, em um experimento isolado, verificou-se um aumento na incorporação de timidina em culturas de linfócitos provenientes de indivíduos controle, após a adição do sobrenadante de cultura de linfócitos de voluntários tratados (Durán *et al.*, 1993).

A análise química quantitativa do MAPA impulsionou a especulação acerca da relação entre os principais componentes da macromolécula e a ação farmacológica observada.

A importância do magnésio (Mg^{2+}) para uma grande variedade de processos bioquímicos e fisiológicos e principalmente, o conhecimento do papel exercido por este íon na função imune, sugerem que os efeitos observados para o MAPA estejam particularmente relacionados à presença majoritária deste cátion na macromolécula ($20,1 \pm 0,9\%$). Estudos acerca da biodisponibilidade do MAPA revelaram um maior acúmulo de Mg^{2+} no baço, favorecendo tal hipótese. O baço é um dos principais órgãos linfóides responsáveis pela diferenciação das células envolvidas com a imunocompetência (Justo, 1996).

O papel do Mg^{2+} na função imune vem sendo considerado devido à grande variedade de enzimas dependentes de Mg^{2+} e à sua participação crítica na barreira das vias iônicas. O Mg^{2+} participa da resposta imune de várias maneiras, tendo um papel crucial em reações que afetam a resposta imune. Muitos investigadores têm encontrado uma relação entre a síntese de γ -globulinas e o Mg^{2+} (Elin, 1975; Guenther *et al.*, 1995; Galland, 1988; McCoy e Kenney, 1995; Vormann *et al.*, 1996; Windhauser *et al.*, 1993). A síntese de imunoglobulinas a partir de aminoácidos segue o modelo de síntese de proteínas e o Mg^{2+} é reconhecido como um fator essencial em muitos mecanismos envolvidos na síntese protéica (Cowan, 1995).

Também é de particular interesse o papel do Mg^{2+} no mecanismo de desgranulação de neutrófilos, o qual procede através da liberação de substâncias lisossomais quimiotáticas que podem agir sobre o material antigênico, preparando-o para a ingestão. A desgranulação também está associada ao ataque e destruição de microrganismos através do fagossomo e do lisossomo. Neste caso, o Mg^{2+} extracelular parece ter um papel regulatório importante, já que o processo de

desgranulação é aumentado pela adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e sua síntese requer Mg^{2+} (Guse *et al.*, 1996; Von Mandach *et al.*, 1993).

Muitos estudos indicam a participação do Mg^{2+} na aderência das células imunes às células-alvo. Tal aderência corresponderia à primeira etapa da citólise (Galland, 1988; Goldstein e Gomperts, 1975; Walia *et al.*, 1980).

A citólise dependente de anticorpos ocorre quando células citotóxicas naturais (células NK), granulócitos ou macrófagos destroem células-alvo ligadas a anticorpos (Male, 1996). A dependência de Mg^{2+} foi estabelecida para a lise de células tumorais e microrganismos por granulócitos e macrófagos (Grewal e Babiuk, 1980; Lichenstein, 1986; Lima *et al.*, 1973; Stankiewicz *et al.*, 1989; Williams e Cole, 1981; Elisaf e Siamopoulos, 1995; Stossel, 1996).

A investigação da capacidade do MAPA em modular a reatividade imune é de particular interesse. Excepcionalmente, os efeitos deste composto na atividade de neutrófilos é de grande importância clínica, uma vez que as terapias convencionais são, geralmente, acompanhadas por complicações secundárias advindas de uma imunodepressão, tais como infecções oportunistas e/ou eventos neoplásicos.

Nosso organismo, normalmente, está exposto a bactérias, vírus, fungos e parasitas, em especial aqueles que ocorrem na pele, na boca, nas vias respiratórias, no cólon, nas mucosas dos olhos e, até mesmo, nas vias urinárias. Muitos destes agentes são capazes de provocar doenças, caso os tecidos mais profundos sejam invadidos. Felizmente, nosso organismo possui um sistema especial para o combate aos diferentes agentes tóxicos e infecciosos. Esse sistema inclui: as barreiras fisicoquímicas, as células fagocitárias, os eosinófilos do sangue e dos tecidos, os linfócitos e várias moléculas circulantes, incluindo os mediadores solúveis com atividade sobre outras células (Mackay *et al.*, 1993).

Basicamente são os leucócitos, formados na medula óssea e no tecido linfóide, as unidades móveis do sistema protetor do organismo. No entanto, após

sua formação, eles são transportados pelo sangue para as diferentes partes do organismo onde irão atuar. Mais especificamente os leucócitos são transportados para áreas de inflamação, permitindo assim uma defesa rápida e eficiente contra qualquer agente infeccioso presente (Mackay *et al.*, 1993).

Normalmente, seis tipos diferentes de leucócitos são encontrados no sangue: 62% de neutrófilos polimorfonucleares, 23% de eosinófilos polimorfonucleares, 0,4% de basófilos polimorfonucleares, 5,3% de monócitos e 30% de linfócitos. São principalmente os neutrófilos e os macrófagos, além de outros agentes importantes, que participam da defesa natural do organismo contra um ambiente potencialmente hostil (Mackay *et al.*, 1993).

Os neutrófilos, também chamados leucócitos polimorfonucleares, respondem rapidamente ao estímulo quimiotático, iniciando imediatamente a fagocitose e destruição das partículas estranhas. Eles podem ser igualmente ativados pelas citocinas produzidas pelos macrófagos e pelas células endoteliais, construindo a principal população celular envolvida com a resposta inflamatória aguda. Os neutrófilos também possuem receptores para anticorpos do tipo IgG e para proteínas do complemento, migrando para as regiões de ativação do sistema complemento. Desta forma, eles fagocitam avidamente partículas opsonizadas, funcionando como células efetoras da imunidade humoral. Além disso, estas células estão sendo constantemente estimuladas por citocinas produzidas pelas células T e partículas opsonizadas durante a fagocitose, contribuindo com funções efetoras na resposta imune específica (Mackay *et al.*, 1993).

Há também a ação de diversos agentes oxidantes formados pelas enzimas da membrana dos fagossomos ou pelos peroxissomos. Tais agentes compreendem ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila ($\cdot OH$) e oxigênio singlete (1O_2).

Quanto ao processo de inflamação, o produto dos tecidos inflamados promove o deslocamento dos neutrófilos do sangue circulante para a área inflamada. O mecanismo envolve três etapas:

(i) Inicialmente, as paredes dos capilares são lesadas provocando aderência dos neutrófilos, processo conhecido por marginação; (ii) Em seguida, a permeabilidade aumentada dos capilares e vênulas de pequeno calibre permite a passagem dos neutrófilos, por diapedese, para o espaço do tecido; (iii) Como resultado, também observa-se o fenômeno de quimiotaxia, que faz com que os neutrófilos migrem para os tecidos lesados. Produtos celulares e bacterianos, fatores das reações de coagulação, produtos da reação antígeno-anticorpo e alguns componentes do “complemento” estão envolvidos (Mackay *et al.*, 1993).

Modelos experimentais de infecção são ferramentas úteis para se avaliar os efeitos de determinadas drogas ou substâncias sobre o sistema imunológico. O estudo da resistência do hospedeiro a bactérias facilita a avaliação dos efeitos produzidos pelo agente em estudo. A infecção pela *Listeria monocytogenes* em camundongos tem sido extensivamente utilizada como modelo de interação entre parasita e hospedeiro para o estudo da resposta imunológica (Mackaness, 1962; Hahn and Kaufmann, 1981).

Listeria monocytogenes é uma bactéria gram-positiva, de multiplicação intracelular, que provoca reações semelhantes no homem e em roedores. Seu habitat preferido são os fagócitos mononucleares e os hepatócitos. A infecção caracteriza-se por duas fases distintas: uma fase inicial de imunidade inespecífica, onde há predominância da resposta das células originárias da medula óssea e, uma fase mais tardia onde há o envolvimento das células T. Após a injeção intravenosa de uma dose subletal de *L. monocytogenes*, em camundongos, os microorganismos são rapidamente removidos da corrente sanguínea, acumulando-se nos tecidos, principalmente no baço onde a bactéria restringe-se aos fagócitos mononucleares e, em sua maior parte no fígado, onde os hepatócitos também são infectados

(Mackness, 1962; North, 1970; Hahn and Kaufmann, 1981; Lepay *et al.*, 1985; Conlan and North, 1991). Durante esta fase, mecanismos independentes das células T levam à redução do número bacteriano. Os polimorfonucleares, monócitos teciduais e células natural killer (NK) atuam no local da infecção por fatores liberados pelos próprios fagócitos infectados, como o IFN- γ , TNF, IL-1, IL-6, IL-8 e C5a (Emmerling *et al.*, 1994; Czuprynski *et al.*, 1984,1988; Baggiolini *et al.*, 1989; Bancroft *et al.*, 1989; Serushago *et al.*, 1992; Rogers *et al.*, 1992; Kopf *et al.*, 1994; Pfeffer *et al.*, 1993), formando o foco inflamatório (North, 1970; Rosen *et al.*, 1989).

A migração das células fagocitárias originárias da medula óssea ao local de replicação da bactéria é um componente essencial à resposta primária à *Listeria monocytogenes* (North, 1970; Bennet and Baker, 1977; Lepay *et al.*; 1985; Rosen *et al.*, 1989). Animais que não conseguem mobilizar estas células ao local de deposição bacteriana, ou o fazem de forma ineficiente, apresentam uma multiplicação exacerbada de *Listeria* no fígado e aumento de taxa de mortalidade (Stevenson, 1981; Gervais *et al.*, 1986; Rosen *et al.*, 1989). Estas células fagocitárias são originárias das células primitivas pluripotenciais da medula óssea, chamadas células formadoras de colônias (CFCs), as quais, podem dar origem a qualquer célula sanguínea dependendo do estímulo recebido (Metcalf, 1984; Queiroz, 1988). O crescimento, diferenciação e atividade biológica destas células são modulados por fatores estimuladores de colônias (CSFs), tais como: GM-CSF (granulócitos e macrófagos), G-CSF (granulócitos), M-CSF (macrófagos) e interleucina 3 (IL-3 ou multi-CSF) (Stevenson, 1981; Metcalf, 1984, 1989; Hume *et al.*, 1988). Elevados níveis destes fatores aparecem no soro e tecidos no período inicial da infecção dos animais (Wing *et al.*, 1984, 1985, 1987; Young e Cheers, 1986). Alguns trabalhos demonstram que o M-CSF é o fator em maior concentração, o qual possui um papel importante na produção e maturação dos

fagócitos mononucleares (Cheers *et al.*, 1988; Cheers e Stanley, 1988; Hume *et al.*, 1988; Gregory *et al.*, 1992). Níveis séricos do mesmo estão diretamente relacionados com a dose de bactéria administrada, com o aumento da migração das células da medula óssea e parecem estar inversamente correlacionadas com o número bacteriano presente no fígado e baço dos animais (Wing *et al.*, 1985, 1987; Young e Cheers, 1986; Cheers *et al.*, 1988; Cheers e Stanley, 1988). Embora os camundongos suscetíveis à bactéria apresentem elevados níveis de CSFs séricos, o número de precursores hematopoiéticos da medula óssea para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) apresenta-se diminuído no período inicial da infecção, mantendo-se em níveis abaixo do controle por vários dias (Wing *et al.*, 1984, 1985).

Apesar destas células fagocitárias expressarem potentes mecanismos de defesa antimicrobiana após sua ativação por citocinas, estas são heterogêneas no que diz respeito ao seu potencial microbicida (Kaufmann *et al.*, 1987). Em muitas células, bactérias escapam das vesículas fagocíticas para o citoplasma através da produção de um fator virulento chamado listeriolisina O (Cossart e Mengaud, 1989). Uma vez no citoplasma, o organismo replica-se e movimenta-se sendo capaz de infectar as células originárias da medula óssea e outras células fagocitárias teciduais com baixo poder de defesa bacteriana, tais como, os hepatócitos (Gregory e Wing, 1993; Wood *et al.*, 1993; Rogers *et al.*, 1994; Szalay *et al.*, 1995). Entretanto, a entrada da bactéria no citoplasma destas células permite o seu processamento e a apresentação de suas proteínas às células T, inicialmente pelas moléculas do complexo de histocompatibilidade da classe II, nos macrófagos e mais tardiamente, pelas moléculas do complexo de histocompatibilidade da classe I, nos hepatócitos (Keller *et al.*, 1980). Embora os macrófagos representem as células efetoras, a presença das células T é essencial para ativar o seu potencial antimicrobiano (Mackaness e Blanden, 1967; Mackaness e Hill, 1969). Todos os

três subtipos de células T, CD4⁺ α/β, CD8⁺ α/β e CD4⁻CD8⁻ γ/δ contribuem para a proteção contra esta bactéria (Mombaerts *et al.*, 1993; Daugelat e Kaufmann, 1996). As células CD4⁺ reconhecem a diversidade de proteínas listeriais apresentadas pelos macrófagos e modulam uma reação de hipersensibilidade do tipo tardio (Beatti *et al.*, 1991; Daugelat *et al.*, 1994; Kaufmann *et al.*, 1987; Mielke *et al.*, 1988), produzindo uma grande quantidade de IL-2 e INF-γ (Daugelat *et al.*, 1994; Kaufmann *et al.*, 1982, 1983). O papel indispensável do INF-γ na imunidade à *Listeria* tem sido demonstrado pela fatalidade da doença em animais no caso da neutralização desta interleucina por anticorpos monoclonais (Huang *et al.*, 1993; Buchmeier e Schreiber, 1985; Yang *et al.*, 1997).

As células CD4⁺ α/β responsáveis pela produção destas citocinas pertencem quase que exclusivamente ao subgrupo T helper 1 (Th1). A predominância destas células na listeriose foi atribuída à resposta imune inata no começo da infecção, uma vez que os macrófagos infectados com a *Listeria monocytogenes* produzem IL-12 e TNF-α que estimulam as células NK e a produção de INF-γ (Hsieh *et al.*, 1993; Tripp *et al.*, 1993, 1994; Wagner *et al.*, 1994^b). As células NK junto às células T γ/δ parecem ser os maiores produtores de INF-γ durante a listeriose. Experimentos recentes sugerem que as células T γ/δ modulam a produção desta citocina pelas células NK (Ladel *et al.*, 1996).

Recentemente, vários trabalhos têm demonstrado o envolvimento obrigatório de neutrófilos na fase aguda não específica da resistência à listeriose (Appelberg *et al.*, 1994; Conlan e North, 1991, 1994; Czuprynski *et al.*, 1994; Queiroz, 1988; Rogers e Unanue, 1993; Rogers *et al.*, 1994). Além disso, os neutrófilos são capazes de sintetizar e liberar citocinas (Cassatela, 1995). A administração intraperitoneal de *Listeria monocytogenes* leva a uma rápida infiltração de um número elevado de neutrófilos (Appelberg e Silva, 1989; Tripp *et al.*, 1987). A utilização de um anticorpo específico contra neutrófilos *in vivo* reduz de forma significativa a

resistência e aumenta a mortalidade na listeriose (Czuprynski *et al.*, 1994). Apesar da depleção de neutrófilos, outros parâmetros da resposta imune não específica que ocorre nas primeiras 24 e 48 horas, mediada por macrófagos, neutrófilos e células NK, é incapaz de erradicar a infecção no baço e cavidade peritoneal (Conlan e North, 1994). Células NK e células T (células CD4⁺ α/β, células CD8⁺ α/β e células T γ/δ) são necessárias devido à produção de citocinas estimuladoras do macrófago, particularmente do INF-γ (Bancroft *et al.*, 1987; Hahn e Kaufmann, 1981; Kaufmann, 1993; Mielke *et al.*, 1993; Mombaerts *et al.*, 1993). Desta forma, os polimorfonucleares e os macrófagos, através da ativação de citocinas, atuam também como células efetoras finais na listeriose.

Diante do exposto, neste trabalho avaliamos os efeitos do composto MAPA sobre o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos de medula óssea para a série granulócito-macrófago (GM-CFU) no modelo experimental de infecção em camundongos por *Listeria monocytogenes*. Além disso, investigamos os efeitos deste composto sobre as atividades quimiotática, fagocitária e lítica de neutrófilos *in vitro*.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito imunomodulador da substância MAPA sob diferentes aspectos da resposta imunológica “in vivo” e “in vitro”.

- 1- Os efeitos “in vitro” do MAPA (em diferentes concentrações) na atividade funcional das células polimorfonucleares humanas (PMN) foram avaliados através de alterações nas capacidades fagocitária, lítica e quimiotática.
- 2- O crescimento e diferenciação de células precursoras da medula óssea foi avaliado em animais infectados com *Listeria monocytogenes* e submetidos ao tratamento com diferentes doses do composto.
- 3- Os efeitos do composto MAPA sobre a resistência dos camundongos BALB/c à dose letal da *L. monocytogenes* também foram avaliados.

Materiais e Métodos

1- Substância teste MAPA

O composto MAPA foi gentilmente cedido pelo Centro de Desenvolvimento de Compostos com Atividades Biológicas de São Paulo, sendo obtido a partir de culturas selecionadas de *Aspergillus oryzae*. O composto MAPA é um sólido branco, obtido como microcristais finos na forma de um agregado polimérico após 120 h de cultura em meio apropriado. A purificação é feita posteriormente, em coluna cromatográfica, como previamente descrito por Durán *et al.* (1990^a, 1993, 1995).

2- *Listeria monocytogenes*

A bactéria *Listeria monocytogenes* utilizada para infectar os animais, é um cocobacilo gram-positivo, anaeróbio facultativo, móvel por flagelo peritríquios a temperatura ambiente, facilmente cultivável em ágar-sangue. Esta cepa foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica – Hospital de Clínicas desta Universidade. Após a aquisição, a bactéria foi submetida a vários testes bioquímicos que confirmaram sua identidade. Os testes realizados demonstraram o seguinte:

- Oxidase- positivo.
- Catalase- positivo.
- Carboidratos- ação fermentativa.
- Xilose- negativo.
- Manitol- negativo.
- Bile esculina- positivo.
- Beta hemólise- positivo.
- CAMP- Test: *Staphylococcus aureus*- positivo.
Rhodococcus equi- negativo.

Para provocar infecção nos animais foi necessário determinar o número ideal de microrganismos a ser injetado. A dose ideal não deveria provocar a morte do animal muito rapidamente para que fosse possível a realização dos experimentos após a infecção. A bactéria foi mantida em meio de cultura BHI (Brain-Heart Infusion) e incubada por 24-48 horas a 37°C. As colônias obtidas nas culturas frescas de ágar-sangue foram diluídas em solução salina a 0,9% e as concentrações determinadas por espectrofotometria através da Escala de McFarland (Cobas Inocheck-Roche).

Para a manutenção da patogenicidade da bactéria a mesma foi periodicamente repassada sucessivamente por 25 vezes em camundongos, descrito a seguir. Os camundongos foram inoculados intraperitonealmente com a bactéria diluída em solução salina 0,9%. Quarenta e oito horas após a inoculação da bactéria os baços foram isolados em ambiente estéril, macerados, mantidos em BHI por 24-48 horas e, logo após, a bactéria foi isolada em placas de ágar-sangue. Após o seu isolamento, diluições da mesma foram realizadas até atingir a concentração apropriada para o uso.

Para a avaliação da sobrevivência $3,0 \times 10^8$ bactérias/animal foram inoculados intraperitonealmente. Para o estudo dos parâmetros imunológicos e hematológicos a dose subletal 1×10^5 bactérias/animal foi utilizada.

3- Estudos “in vitro”

3.1- Preparação das células de levedura

As linhagens de *Candida albicans* (ATCC 0231) e *Candida kefyr* (ATCC 4922) foram gentilmente cedidas pela Fundação Tropical de Pesquisas e

Tecnologia André Tosello (Coleção de Culturas Tropical: linhagens CCT 0776 e CCT 3434 respectivamente).

As suspensões celulares foram preparadas a partir de culturas de *C. albicans* e *C. kefyr* inoculadas no dia anterior em meio ágar-dextrose. As células coletadas foram lavadas com meio TC 199 e contadas.

As leveduras foram opsonizadas em meio TC 199 com 10% de soro humano normal tipo AB não inativado. Após 30 min. de incubação, a concentração final foi ajustada para $5,0 \times 10^6$ células/mL adicionando-se meio TC 199 (Medium 199-Sigma).

3.2- Capacidade fagocitária e lítica frente aos antígenos *Candida albicans* e *Candida kefyr*

3.2.1- Princípio do método

A capacidade fagocitária dos leucócitos pode ser detectada através de incubação “in vitro” de neutrófilos com uma suspensão celular de leveduras para que ocorra a fagocitose e consequente lise das mesmas (Queiroz *et al.*, 1994).

3.2.2- Descrição da técnica

Sangue obtido através de punção venosa foi distribuído sobre uma lâmina com as bordas esmaltadas. Após 2 h de incubação, o coágulo formado foi removido cuidadosamente e o excesso lavado com meio TC 199 (Medium 199-Sigma). As células polimorfonucleares (PMN) aderentes à superfície do vidro foram incubadas com 1 mL de uma solução de MAPA nas concentrações de 25, 50, 75 ou 1000 µg/mL diluída em TC199 mais 0,1% de DMSO (dimetil sulfóxido), mantida à temperatura ambiente durante 30 min. Foram feitas duplicatas de cada amostra. Logo após, as células foram lavadas com TC199 e incubadas com 1 mL de uma

suspensão de células de levedura opsonizadas, a uma concentração de $5,0 \times 10^6$ células/mL. Após 30 min. de incubação a 37°C , as células de levedura remanescentes em suspensão foram removidas lavando-se gentilmente as lâminas com meio TC 199.

Previamente à avaliação da capacidade lítica e fagocitária das células aderentes, as lâminas foram secas e coradas com Giemsa. Células de levedura viáveis foram diferenciadas pela sua coloração azul.

A atividade fagocitária foi expressa pelo número de leveduras fagocitadas em um total de 100 neutrófilos. A atividade lítica foi expressa como porcentagem de células de leveduras lisadas (“mortas”) dentre as células de *Candida* fagocitadas (Ballart *et al.*, 1987).

3.3- Teste do Nitroblue-tetrazolium (N.B.T.)

3.3.1- Princípio do método

Este teste consiste em verificar a capacidade do neutrófilo de reduzir o NBT a um composto de cor azul escura (Formazan), ou seja, NBT reduzido.

3.3.2- Descrição da técnica

Em um tubo de ensaio contendo 100 μL de sangue total colhido por punção venosa adicionou-se 50 μL de uma solução de MAPA nas concentrações de 25, 50 e 75 $\mu\text{g/mL}$ diluídas com 0,1% de DMSO (dimetil sulfóxido), incubando-se em banho-termostatizado a 37°C . A seguir, adicionou-se 100 μL de solução de NBT (0,1% em PBS-Phosphate Buffered Saline-Sigma), com 50 μL de endotoxina 1 mg/mL em PBS (endotoxina *Escherichia coli*-Difco). Aos controles não foram adicionadas as soluções de MAPA.

Os tubos foram incubados por 15 minutos em banho-termostatizado a 37°C. A seguir, centrifugou-se por 5 minutos a 1200 rpm. O sobrenadante foi desprezado e adicionaram-se 50 µL de soro bovino fetal. Foram feitos esfregaços deixando-se secar. A seguir, as lâminas foram coradas com Leishman por 5 minutos e diluídas com água destilada. Decorridos 15 minutos, o índice de células positivas foi observado. Apenas neutrófilos que continham um depósito azul, correspondendo ao formazan, foram consideradas células positivas.

3.4- Atividade quimiotática de neutrófilos

3.4.1- Princípio do método

Quimiotaxia é um método utilizado para o estudo quantitativo da locomoção de leucócitos. Basicamente consiste em colocar uma suspensão de leucócitos num compartimento e um agente quimiotático no outro compartimento de uma câmara de migração. Estes compartimentos são divididos por um filtro com microporos de 3 µm para neutrófilos, e de 8 a 12µm para monócitos/macrófagos. O tamanho dos microporos deve ser suficiente para permitir a migração da célula em estudo sem, no entanto, permitir sua passagem passivamente (Todd *et al.*, 1989).

3.4.2- Descrição da técnica

A partir de 5 mL de sangue colhido através de punção venosa foram separados cerca de 0,8 mL de plasma. Heparina sódica foi utilizada como anticoagulante. O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm e o sobrenadante separado juntamente com o creme leucocitário. Adicionou-se 1 mL de dextran e incubou-se por 25 minutos a 37°C. Lavou-se 3 vezes com meio TC 199. A concentração final da suspensão celular é de $2,0 \times 10^6$ células / mL.

Do plasma separado inicialmente, tomaram-se 0,5 mL e adicionou-se 0,1 mL de endotoxina 2,5% em PBS (endotoxina *Escherichia coli*-Difco). Incubou-se por 30 minutos a 37°C e a seguir, adicionou-se 4,4 mL de meio TC 199.

Preparou-se uma suspensão de MAPA nas concentrações de 25, 50 ou 75 µg/mL em meio TC199 diluída com 0,1% de DMSO, com ou sem endotoxina e colocou-se na câmara descrita abaixo.

A câmara quimiotática foi montada colocando-se um pré-filtro (Millipore AP 2501300) e um filtro (Millipore SSWPO 1300) no interior de um dos orifícios de uma placa de cultura. Para cada amostra foram preparadas duas câmaras, uma contendo 0,25 mL de plasma com endotoxina e a outra contendo 0,25 mL de meio TC 199. Uma amostra continha 0,25 mL de TC199 mais a suspensão de MAPA nas devidas concentrações com endotoxina e a outra continha MAPA mais TC199. A seguir, 0,2 mL da suspensão de $2,0 \times 10^6$ células/mL num receptáculo raso e circular, de diâmetro ligeiramente menor ao do orifício da placa foi invertida sobre o filtro no interior do orifício. Incubou-se por 30 minutos a 37°C em câmara úmida.

Os filtros foram lavados em meio TC 199 e fixados por 20 minutos em propanol-2 (álcool isopropílico). A coloração foi realizada passando-se os filtros pela seguinte bateria (2 minutos cada etapa): água destilada, hematoxilina, água destilada, propanol-2 e xilol.

A leitura foi feita utilizando-se objetiva de imersão e medindo-se a distância de migração das células através de ajustes no micrômetro até atingir o plano onde se encontram no máximo 5 células (Akenzua e Amienheme, 1981).

4-Estudos “in vivo”

4.1- Animais

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

- a) animais controle, sem tratamento;
- b) animais infectados com *L. monocytogenes*;
- c) animais infectados com *L. monocytogenes*, submetidos a diferentes protocolos de tratamento com MAPA;
- d) animais controle, não infectados por *Listeria*, submetidos aos mesmos tratamentos com MAPA empregados no item c.

A administração do MAPA foi realizada por via subcutânea em doses padronizadas, utilizando-se solução salina 0,9% como veículo de administração. Aos animais controle não infectados foi administrado MAPA em diferentes doses durante 7 dias. Os animais infectados e tratados receberam MAPA durante 7 dias, sendo infectados com *L. monocytogenes* no último dia de tratamento e sacrificados 48 e 72 h após a infecção. As doses utilizadas de MAPA foram 0,5; 2,0; 5,0 ou 7,5 mg/Kg.

4.2- Cultura Clonal de Precusores Hematopoiéticos de Medula Óssea (CFCs) de Camundongos

Para enumerar estas células clonogênicas é importante que todas as células multipotenciais presentes na cultura sejam induzidas a proliferar e que as condições de cultura sejam ajustadas para se evitar um número exagerado de colônias em cada placa de petri com consequente superposição das mesmas, de modo a permitir a

identificação de cada colônia. Também é importante que o fator estimulador de crescimento (CSF) seja utilizado em concentrações supramáximas. Além disso, a escolha do soro bovino fetal deve ser feita cuidadosamente devido a variação em atividade dos vários lotes e marcas.

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

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

O número de células na suspensão foi contado em câmara hemacitométrica após diluição (1:10) das células em eosina 10%.

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

- 30% de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Difco) 2x concentrado
- 20% de soro bovino fetal
- 50% de ágar (0,6%) (Bacto-ágar-Difco).

A seguir, adicionou-se ao meio o volume apropriado de células a 37°C. Ressuspendeu-se as células e distribuiu-se volumes de 2 mL em cada placa de petri (35 mm), já contendo o estímulo apropriado. Deixou-se gelificar e incubou-se por 7 dias a 37°C em presença de 5% de CO₂. Após este período contou-se o número de colônias formadas em microscópio de dissecação com aumento de 40x.

4.3- Preparação do Fator Estimulador do Crescimento de Colônias (CSF). Meio Condicionado de Células Esplênicas (SCM)

Baços de camundongos BALB/c foram removidos sob condições assépticas e passados delicadamente através de peneira de aço inoxidável estéril. Preparou-se

uma suspensão com $2,0 \times 10^6$ células/mL em meio RPMI- 1640 (Sigma) contendo 10% de soro humano inativado (30 min. a 56°C) ou 19% de soro fetal bovino. Adicionou-se ao meio $5,0 \times 10^{-5}$ M de 2-mercaptoetanol (concentração final) e 0,05 mL de “ pokeweed mitogen “ por mL de meio. Incubou-se por 7 dias a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO_2 no ar. Centrifugou-se o sobrenadante e filtrou-se em filtros milipore. A atividade funcional do CSF foi determinada através dos estímulos produzidos sobre o crescimento clonal de células progenitoras hematopoiéticas em meio semi-sólido. A titulação deste lote de SCM demonstrou que uma diluição de até 1:4 forneceu resultados que estão dentro dos níveis de resposta supramáxima. Os resultados em duplicata da titulação realizada em cultura de 7 dias estão apresentados na Tabela 1.

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

DILUIÇÃO SCM	CFU-GM ^a
1:1	91±2
1:2	85±3
1:4	88±2
1:8	63±1
1:16	48±4
1:32	29±3
1:64	6±4
1:168	0

*Número de células da medula óssea utilizado= 1×10^5 células/mL.

^aResultados obtidos em duplicata por diluição.

5-Efeitos *in vitro* do composto MAPA nos números de células formadoras de colônias de medula óssea (CFU-GM)

O fator estimulante de colônias para granulócito-macrófago (GM-CSF) foi fornecido por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). O GM-CSF é um ácido glicoprotéico com um peso molecular de 22 KDa expresso em fator recombinante *Escherichia coli*. A formação de colônias foi estimulada por uma inclusão nas culturas de 0,025 ng/mL de GM-CSF quando 1×10^5 células da medula óssea foram cultivadas em 1 mL de ágar. Esta concentração de GM-CSF foi determinada por uma curva linear de dose-resposta realizada em nosso laboratório antes do início dos experimentos.

6- Realização da curva de sobrevivida

Com o intuito de observar uma possível proteção dos animais tratados com o composto MAPA realizou-se uma curva de sobrevivida. Considerou-se quatro grupos experimentais: animais controles e infectados com *Listeria monocytogenes* $3,0 \times 10^8$ bactérias/animal e, animais tratados com MAPA nas doses de 0,5; 5,0 e 7,5 mg/Kg por 7 dias e infectados logo após, com a mesma concentração de bactéria.

7- Estatística

Para a avaliação das variáveis CFU-GM utilizou-se análise de variância. Quando detectado diferenças estatísticas entre os grupos utilizou-se o teste de contraste de Tukey.

Para a avaliação das variáveis das atividades fagocitária, lítica e quimiotática de neutrófilos utilizou-se análise de variância e também o teste de contraste de Tukey.

Para a curva de sobrevida dos gupos infectado e infectado e tratado utilizou-se o teste Log-rank.

Para todos os grupos considerou-se estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

Resultados

Estudos *in vitro*

1- Capacidade fagocitária e lítica frente aos antígenos *Candida albicans* e *Candida kefyr*

Foram estudadas as atividade fagocitária e lítica de neutrófilos frente à *C. albicans* e *C. kefyr* em 6 indivíduos normais, cujas células polimorfonucleares foram incubadas com o composto MAPA nas concentrações de 25, 50, 75 ou 1000 µg/mL (Figuras 1, 2, 3 e 4).

De acordo com a Figura 1 podemos observar que a capacidade fagocitária encontra-se significativamente aumentada em presença do antígeno *C. albicans* em todas as concentrações utilizadas, em relação ao controle. Por outro lado, com 25 e 1000 µg/mL observamos uma redução significativa na capacidade fagocitária quando comparada às concentrações de 50 e 75 µg/mL. A capacidade fagocitária em presença de *C. kefyr* apresentou-se aumentada com as concentrações de 50, 75 e 1000 µg/mL em relação ao controle (Figura 3), sendo que as concentrações de 75 e 1000 µg/mL apresentaram aumento significativo quando comparadas às concentrações de 25 e 50 µg/mL. No estudo da atividade lítica dos neutrófilos observamos um aumento significativo com as concentrações de 25, 50 e 75 µg/mL frente à *C. albicans*, sendo que a concentração de 1000 µg/mL não apresentou diferença significativa em relação ao controle (Figura 2). Quanto à atividade lítica frente à *C. kefyr* observamos um aumento significativo com as concentrações de 50, 75 e 1000 µg/mL. Por outro lado, a concentração de 25 µg/mL não modificou essa resposta em relação ao controle (Figura 4).

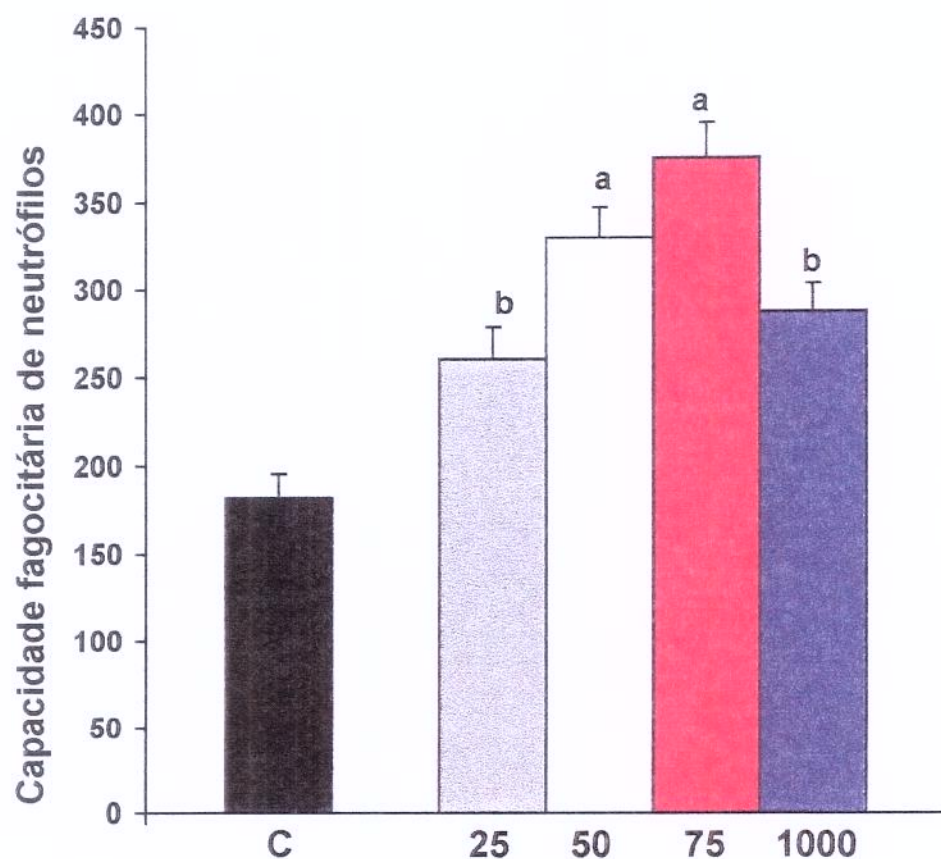


Figura 1- Atividade fagocitária de neutrófilos frente ao antígeno *C. albicans* em indivíduos normais (n=6), cujos polimorfonucleares foram incubados com o composto MAPA em diferentes concentrações.

C=controle; 25, 50, 75 ou 1000= polimorfonucleares incubados com 25, 50, 75 ou 1000 $\mu\text{g/mL}$. ANOVA-Tukey. a = $P < 0,05$ em relação ao controle e às concentrações de 25 e 1000. b = $P < 0,05$ em relação ao controle.

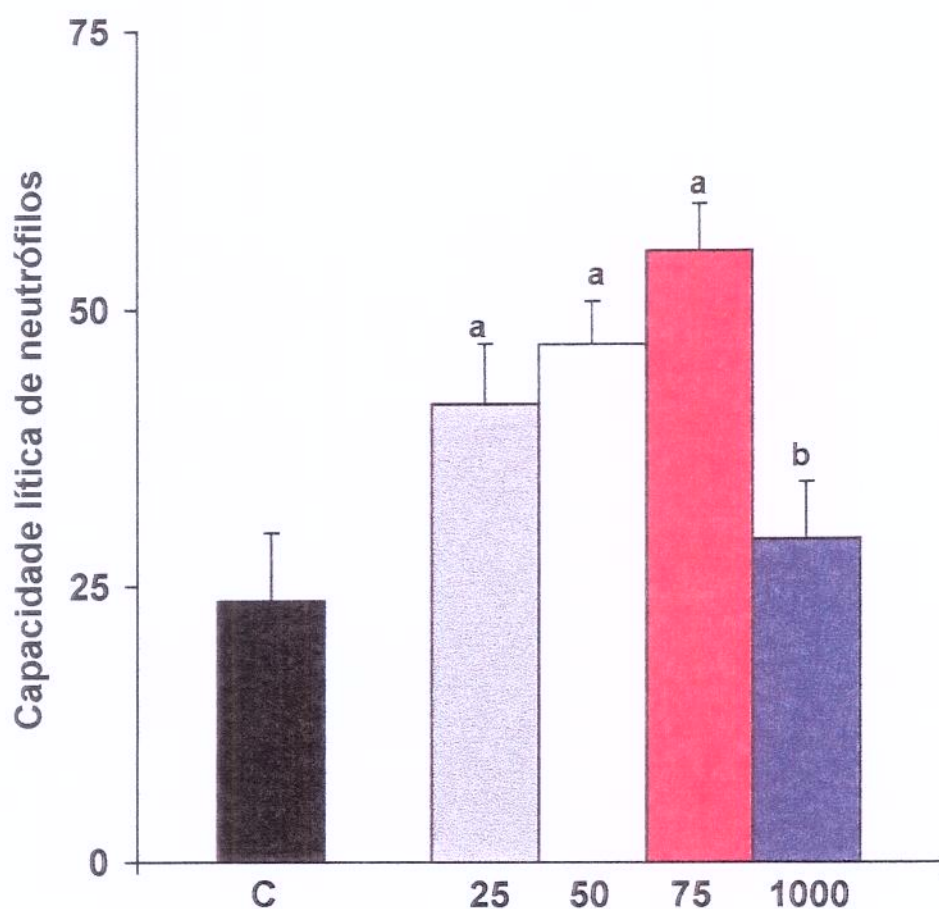


Figura 2- Atividade lítica de neutrófilos frente ao antígeno *C. albicans* em indivíduos normais (n=6), cujos polimorfonucleares foram incubados com o composto MAPA em diferentes concentrações.

C=controle; 25, 50, 75 ou 1000= polimorfonucleares incubados com 25, 50, 75 ou 1000 µg/mL. ANOVA-Tukey. a= P< 0,05 em relação ao controle. b= P< 0,05 em relação aos 25, 50 e 75.

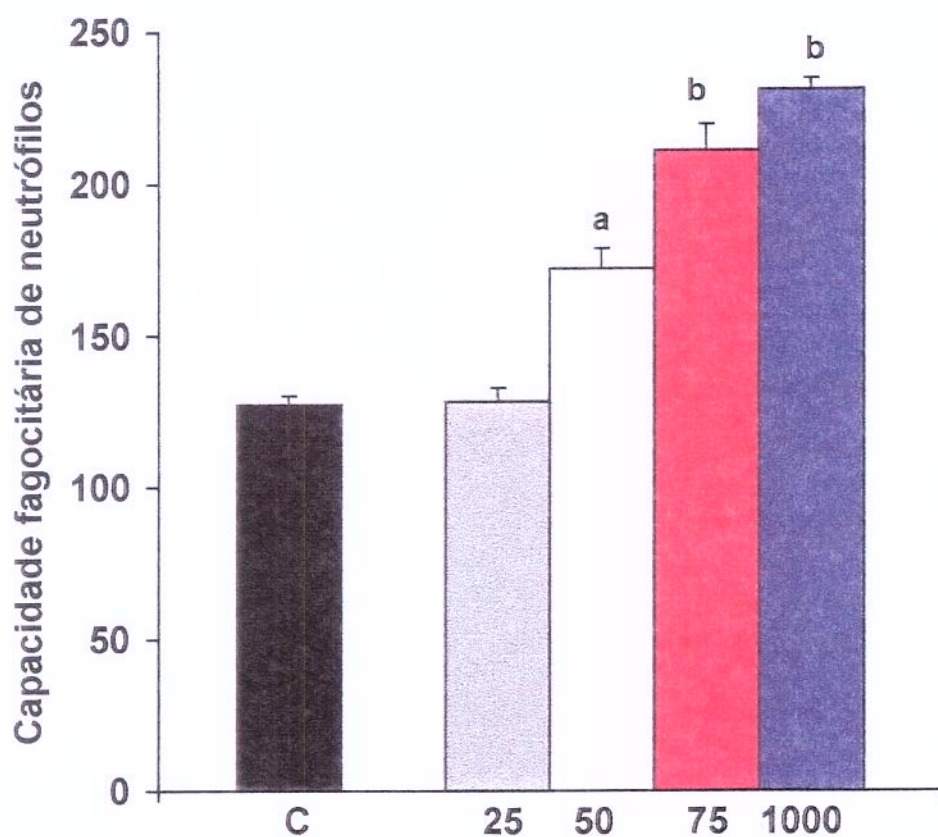


Figura 3- Atividade fagocitária de neutrófilos frente ao antígeno *C. kefyri* em indivíduos normais (n=6), cujos polimorfonucleares foram incubados com o composto MAPA em diferentes concentrações.

C=controle; 25, 50, 75 ou 1000= polimorfonucleares incubados com 25, 50, 75 ou 1000 µg/mL. ANOVA-Tukey. a= $P < 0,05$ (Teste t-Student) em relação ao controle. b= $P < 0,05$ em relação aos 25 e 50.

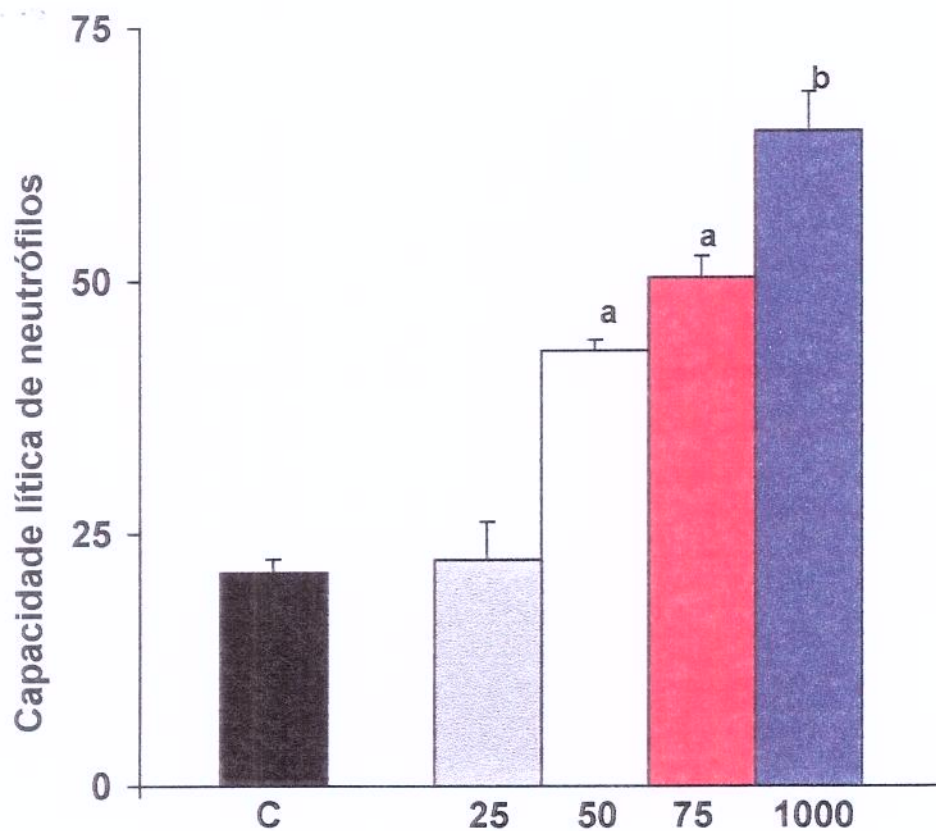


Figura 4- Atividade lítica de neutrófilos frente ao antígeno *C. kefyr* em indivíduos normais (n=6), cujos polimorfonucleares foram incubados com o composto MAPA em diferentes concentrações.

C=controle; 25, 50, 75 e 1000= polimorfonucleares incubados com 25, 50, 75 ou 1000 µg/mL. ANOVA-Tukey. a= P< 0,05 em relação ao controle e à 25. b= P< 0,05 em relação ao controle e à 25, 50 e 75.

2- Teste do Nitroblue-tetrazolium (N.B.T.)

A capacidade do neutrófilo de reduzir o corante nitroblue-tetrazolium (NBT) foi estudada em 6 indivíduos normais, cujas células polimorfonucleares foram incubadas por 15 ou 30 minutos com diferentes concentrações do composto MAPA (25, 50 e 75 $\mu\text{g/mL}$).

Conforme o histograma (Figura 5), podemos observar uma resposta dose-dependente dos neutrófilos incubados por 15 ou 30 minutos com MAPA nas concentrações de 25, 50 e 75 $\mu\text{g/mL}$. Embora a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ não tenha apresentado nenhuma diferença em relação ao controle quando incubada por 15 minutos, após 30 minutos notamos claramente esta diferença.

Estes resultados *in vitro* demonstram que o composto MAPA tem ação direta sobre as células polimorfonucleares.

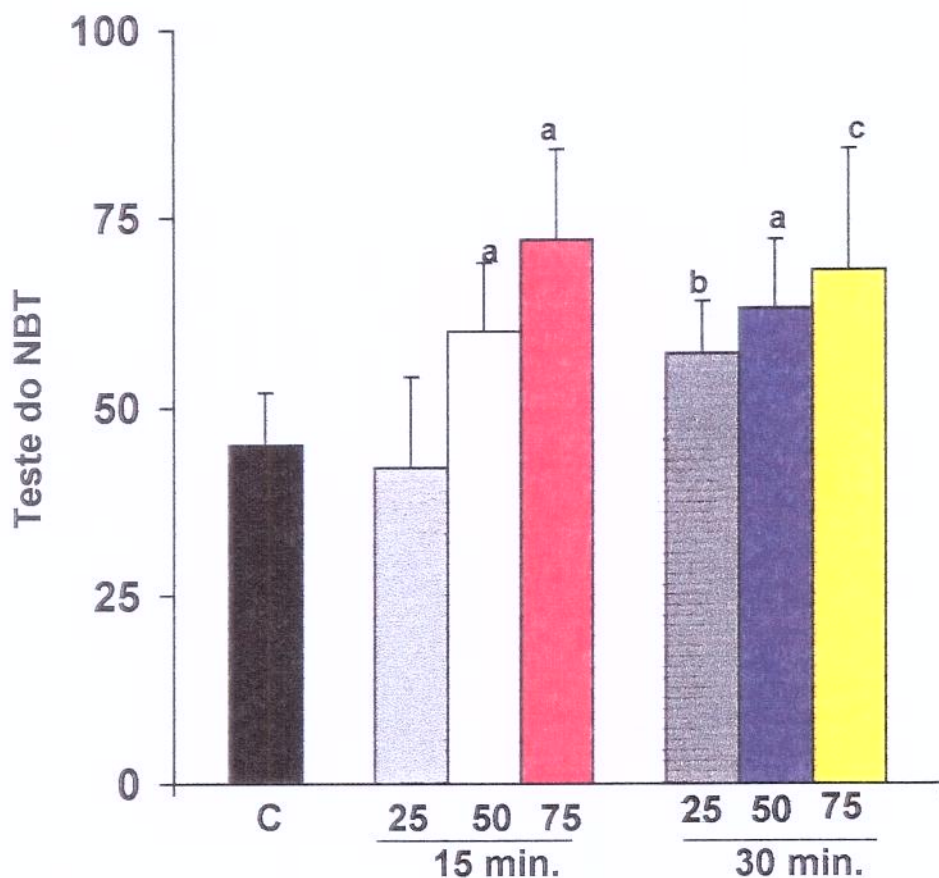


Figura 5- Capacidade redutora do NBT por neutrófilos de indivíduos normais, incubados com o composto MAPA nas concentrações 25, 50 ou 75 µg/mL em tempos diferentes: 15 e 30 minutos.

C=controle; 25, 50 ou 75= células polimorfonucleares incubadas com 25, 50 ou 75 µg/mL do composto MAPA. ANOVA-Tukey. a= P<0,05 em relação ao controle e à 25 (15 min.). b= P< 0,05 em relação ao controle e à 25 (15 min.). c= P< 0,05 em relação ao controle e à 50 (15 min.).

3- Atividade quimiotática de neutrófilos

A atividade quimiotática de neutrófilos foi estudada em 6 indivíduos normais, cujos polimorfonucleares foram incubados com 25, 50 ou 75 $\mu\text{g/mL}$ do composto MAPA (Figura 6).

Embora com as concentrações de 25 ou 50 $\mu\text{g/mL}$ de MAPA não tenha havido nenhuma diferença significativa na atividade quimiotática de neutrófilos, quando comparada ao controle, um aumento significativo foi observado com a concentração de 75 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$ - Teste t-Student).

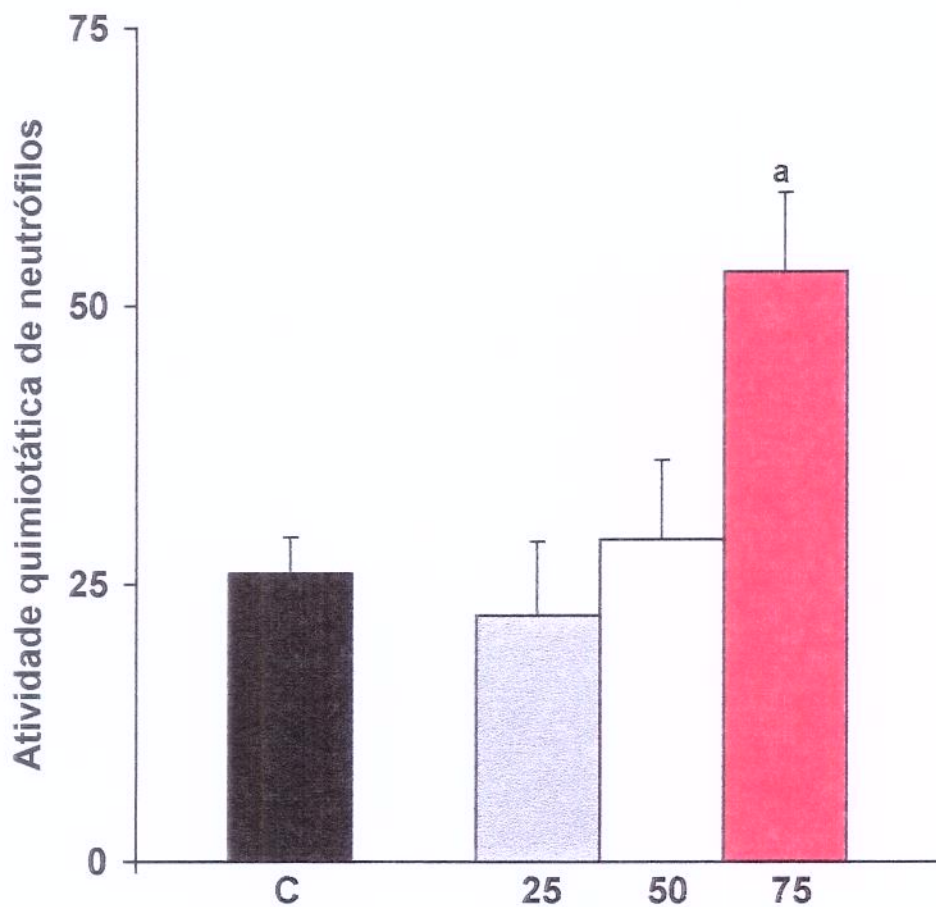


Figura 6- Atividade quimiotática de neutrófilos em indivíduos normais, cujos polimorfonucleares foram incubados com o composto MAPA.

C=controle; 25, 50 ou 75= polimorfonucleares incubados com 25, 50 ou 75 µg/mL. ANOVA-Yukey. a = $P < 0,05$ em relação ao controle.

Estudos *in vivo*

4- Cultura Clonal de Precusores Hematopoiéticos de Medula Óssea (CFU-C) em Camundongos

Os efeitos da administração do composto MAPA sobre o crescimento e diferenciação dos precusores hematopoiéticos da medula óssea (CFU-GM) estão representados na Figura 7. A inoculação de uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (1×10^5 bactérias/animal) levou a uma diminuição no número de colônias de precusores hematopoiéticos (CFU-GM) às 48 e às 72 horas após a infecção, em relação ao grupo controle. Por outro lado, o tratamento de animais normais não-infectados com a dose de 5,0 mg/Kg de MAPA produziu um aumento no número de CFU-GM da medula óssea. O tratamento com MAPA de animais infectados produziu às 48 horas de infecção um aumento nos números de CFU-GM, em relação aos animais infectados no mesmo período experimental e em relação aos grupos controle, nas doses de 2,0 mg/Kg e 5,0 mg/Kg. Este aumento persistiu nas avaliações realizadas 72 horas após a inoculação da bactéria nas mesmas doses observadas às 48 horas. Por outro lado, o tratamento com MAPA nas concentrações de 0,5 mg/Kg e 7,5 mg/Kg não mostrou diferença significativa em relação ao controle e aos grupos infectados.

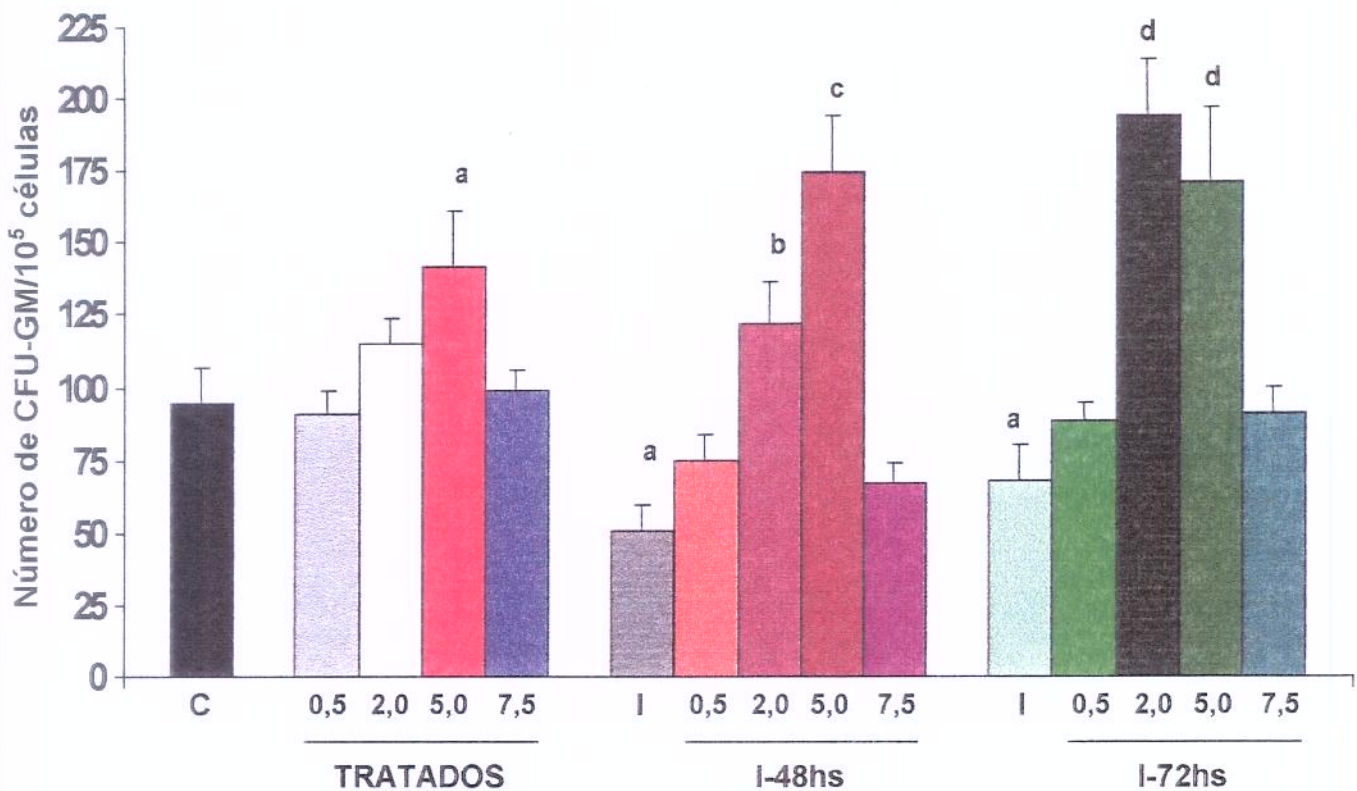


Figura 7- Número de células formadora de colônias de granulócitos e macrófagos na medula óssea de camundongos tratados por 7 dias consecutivos com diferentes doses de MAPA, (0,5-7,5 mg/Kg) e infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^5 bactérias/animal) ao término do tratamento. Os animais foram sacrificados 48 e 72 horas após a infecção. ANOVA-Tukey ($P < 0,05$).

C=controle; 0,5; 2,0; 5,0 ou 7,5 = doses (mg/Kg) utilizadas no tratamento. TRATADOS = animais não infectados; I-48 h = sacrificados 48 h após a infecção; I-72 h = sacrificados 72 h após a infecção; I = somente infectados.

a=significativo em relação ao controle. b=significativo em relação ao controle e à I (I-48 h). c= significativo em relação ao controle, à I (I-48 h) e à 2,0 (I-48 h). d= significativo em relação ao controle e à I (I-72 h).

5- Efeitos *in vitro* do composto MAPA no crescimento e diferenciação de precursores hemtopoiéticos de granulócitos-macrófagos da medula óssea de camundongos normais.

Nenhuma alteração foi observada após incubação de células progenitoras normais da medula óssea com concentrações de 5,0; 25; 50; 100 e 200 µg/mL do composto MAPA, na presença do GM-CSF. Nestas concentrações, o composto MAPA não foi capaz de estimular a formação do CFU-GM na ausência ou presença do estímulo (Tabela 2).

Tabela 2- Efeitos *in vitro* do composto MAPA no crescimento e diferenciação de precursores hemtopoiéticos de granulócitos-macrófagos da medula óssea de camundongos normais.

CONCENTRAÇÕES	MÉDIAS DOS NÚMEROS DE COLÔNIAS*	
	MAPA	MAPA+0,025 ng/mL de CSF-GM
5,0 µg/mL	02±2,0	99±4,0
25 µg/mL	03±1,0	88±4,0
50 µg/mL	04±0,0	100±3,0
100 µg/mL	03±1,0	91±1,0
200 µg/mL	02±0,0	89±1,0
CONTROLE ⁺	04±2,0	
GM-CSF CONTROLE [#]	84±1,0	

Culturas de células por 7 dias na presença das concentrações de MAPA indicadas na ausência ou presença de 0,025 ng/mL de GM-CSF (volume final de 0,1 mL). As soluções de MAPA foram preparadas em solução salina/DMSO 0,1%.

*Médias das colônias contadas±desvio padrão de três experimentos.

+ Lâminas controles que receberam um volume igual de diluente.

Lâminas controles que receberam 0,025 ng/mL de GM-CSF.

6- Efeitos do tratamento com MAPA na sobrevida de animais infectados pela *L. monocytogenes*

Os resultados do tratamento por 7 dias consecutivos com 0,5, 5,0 ou 7,5 mg/Kg de MAPA na sobrevida dos animais (n=20 por grupo) infectados com a dose letal de *L. monocytogenes* (3×10^8 bactérias/animal) encontra-se na Figura 8. Os animais foram observados por 30 dias após a inoculação da bactéria. No grupo controle, a primeira morte ocorreu no quarto dia e o restante dos animais morreu até o oitavo dia de infecção. A mortalidade no grupo de camundongos previamente tratados com 0,5 mg/Kg de MAPA iniciou-se no sexto dia de infecção onde observamos o óbito de 7 animais. Entre o oitavo e o décimo dias este grupo apresentou mortalidade adicional de 10 animais, resultando numa sobrevida de 3 animais ($P < 0,05$ em relação aos controles). O grupo de animais tratados com 5,0 mg/Kg de MAPA apresentou os 4 primeiros óbitos no oitavo dia de infecção. Entre o décimo e o décimo quarto dias foram registrados mais 8 mortes, resultando numa sobrevida de 8 animais ($P < 0,05$ em relação aos controles). O grupo tratado com 7,5 mg/kg de MAPA não apresentou diferença significativa em relação ao do grupo controle.

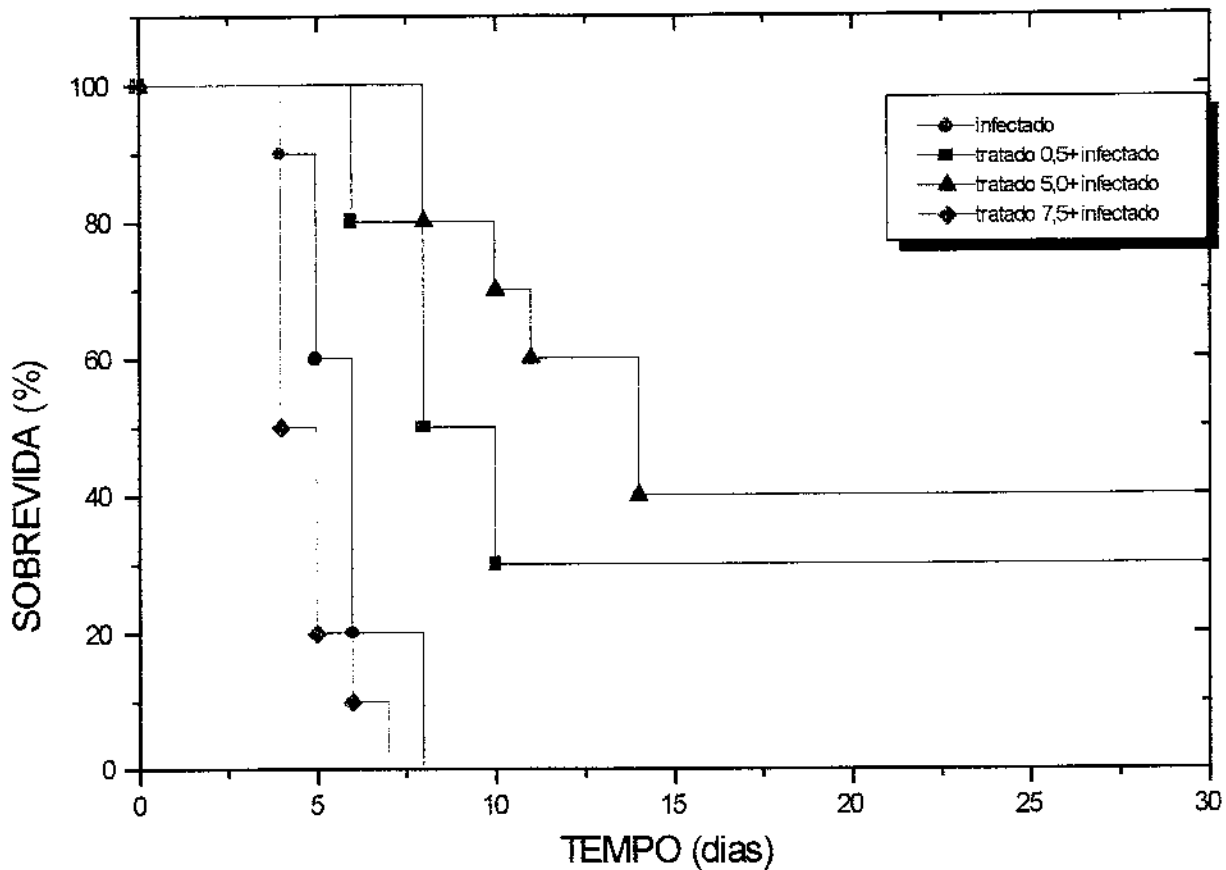


Figura 8- Curva de sobrevida dos grupos infectados e infectados/tratados. Após infecção pela *L. monocytogenes* (3×10^8 bactérias/animal), a mortalidade dos animais foi avaliada por um período de 30 dias (Kaplan-Meier). Os resultados obtidos nos grupos tratados com 0,5 ou 5,0 mg/Kg e infectados foram significativamente diferentes em relação ao grupo controle (Log-rank- $P < 0,05$) $n=20$ animais/grupo.

Discussão

Estudos *in vitro*

1- Capacidade fagocitária e lítica de neutrófilos frente aos antígenos *C. albicans* e *C. kefyr*

Experimentos obtidos, neste trabalho, com o estudo da atividade funcional de neutrófilos de sangue periférico humano demonstraram um aumento nas capacidades fagocitária e lítica de neutrófilos frente ao composto MAPA.

Estes resultados permitem avaliar *in vitro* o sistema de defesa do organismo onde estão envolvidos processos de engolfamento e de digestão de antígenos. Estes processos são realizados por células chamadas fagocíticas mononucleares, os monócitos e os macrófagos, além dos neutrófilos polimorfonucleares.

O antígeno é opsonizado antes de ser fagocitado. No engolfamento é estabelecido o contato do antígeno com a célula fagocítica e sua consequente invaginação, formando-se assim o vacúolo fagocítico ou fagossoma. A seguir, ocorre a digestão do antígeno e grânulos das células fagocitárias liberam seu conteúdo formando o fagolisossoma. Os neutrófilos contêm dois tipos de grânulos que são importantes na morte bacteriana. Os grânulos azurófilos contêm a mieloperoxidase e uma bateria de enzimas hidrolíticas e o outro tipo de grânulos contêm enzimas como a lisozima, lactoferrina, entre outras (Stites, 1987).

Concomitante à ingestão e à formação do fagolisossoma ocorrem alterações no metabolismo oxidativo, resultando numa “explosão respiratória” caracterizada por um aumento acentuado no consumo de oxigênio, da oxidação da glicose pela via das pentoses e da geração de grandes quantidades de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de ânion superóxido (O_2^-), ambos altamente reativos (Perlingeiro *et al.*, 1994; 1995).

A base bioquímica para a “explosão respiratória” é a ativação inicial da NADPH-oxidase. O NADPH é gerado pela via das pentoses. Nesta reação os ânions superóxido ocorrem como intermediários e podem dar origem ao oxigênio e peróxido de hidrogênio, através de uma reação de dismutação.

Os mecanismos microbicidas oxidativos podem ser mediados ou não pela mieloperoxidase (MPO-dependente ou MPO-independente). Nos processos MPO-dependentes, a mieloperoxidase combina-se com seu substrato, o H_2O_2 , formando um complexo enzima-substrato, que pode oxidar uma variedade de compostos doadores de elétrons, entre eles os haletos (Cl^- , I^-). Este processo pode resultar em halogenação, formação e geração de oxigênio. Estes compostos podem lisar o microorganismo através da oxidação de grupos sulfidrílicos ou pela peroxidação de lipídios e também pela formação de aldeídos e cloraminas, potentes agentes bactericidas (Klebanoff, 1980; Queiroz *et al.*, 1997).

Nossos resultados mostram um aumento significativo na capacidade fagocítica de neutrófilos quando estes foram incubados com as concentrações de 25, 50 e 75 $\mu g/mL$ frente à *C. albicans* e com as concentrações de 50, 75 ou 1000 $\mu g/mL$ frente à *C. kefyr*. Quanto à capacidade lítica destes fagócitos, ocorreu um aumento significativo nas concentrações de 25, 50 ou 75 $\mu g/mL$ frente à *C. albicans* e em 50, 75 ou 1000 $\mu g/mL$ frente à *C. kefyr*. A enzima mieloperoxidase presente em neutrófilos é uma enzima importante no processo de lise de certos antígenos como a *C. albicans* (Bogomolski-Yahalom e Matzner, 1995; Queiroz *et al.*, 1997). Por outro lado, na lise de *C. kefyr* as células fagocíticas utilizam-se de outros mecanismos MPO-independentes (Lehrer, 1978; Ballart *et al.*, 1987). No entanto, o aumento observado para a fagocitose e lise frente aos dois antígenos sugere que o composto pode atuar sobre diferentes mecanismos de destruição. O fato da *C. albicans* utilizar mieloperoxidase e a observação do aumento já com 25 $\mu g/mL$ do composto, sugere que pode estar havendo uma ativação nesta via

metabólica. Enquanto a redução do NBT por neutrófilos com 1000 µg/mL de MAPA poderá representar toxicidade sobre a atividade desta enzima, uma vez que resultados na literatura mostram que aumento na concentração de Mg²⁺ inibe a atividade do ATP (adenosina trifosfato), aumentando a permeabilidade de membrana e diminuindo a fagocitose (Galland, 1988; Guse *et al.*, 1996).

Poucos são os estudos que demonstram as ações do composto MAPA sobre o sistema imunológico. No entanto, as alterações da resposta biológica observadas por esse composto sugerem a possibilidade de que a atividade imunomoduladora do MAPA esteja relacionada à presença do magnésio, como um dos principais componentes da macromolécula (Galland, 1988; Durán *et al.*, 1993, 1997). Muitos estudos indicam a participação do magnésio na aderência das células imunes às células-alvo. Tal aderência corresponderia à primeira etapa da citólise (Galland, 1988; Durán *et al.*, 1997).

O magnésio também pode aumentar a desgranulação de neutrófilos, a qual ocorre através da liberação de substâncias lisossomais que são quimiotáticas e podem agir sobre o material antigênico preparando-o para a ingestão. A desgranulação também está associada ao ataque e destruição de organismos através da interação intracelular do fagossomo e do lisossomo (Durán *et al.*, 1997). Embora o magnésio extracelular pareça não estar envolvido diretamente, ele tem importante papel regulatório, já que o processo de desgranulação é aumentado pela adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e o magnésio é requerido em sua síntese.

2- Teste do Nitro-tetrazolium (N.B.T.)

A capacidade do neutrófilo de reduzir o corante nitroblue tetrazolium (NBT) foi observada como um estudo adicional da função fagocitária e lítica, uma vez que o corante é internalizado pela célula, sendo então reduzido pelos íon superóxido. O teste nos dá informação sobre a função metabólica, uma vez que a redução

intracelular depende da ativação da via hexose monofosfato, a qual é necessária em atividades microbicidas normais (Wilkson, 1981). Uma estimulação na via hexose monofosfato seguida da oxidação da glicose e iodinação da proteína, a qual é mediada pela enzima mieloperoxidase, acontece após a ingestão de uma variedade de partículas pelos neutrófilos. Em paralelo, há mudanças no metabolismo oxidativo e consequente aumento do consumo de oxigênio pelas células e da produção de peróxido de hidrogênio, o qual é uma das espécies reativas do oxigênio (Klebanoff, 1988; Bogomolski-Yahalom e Matzner, 1995; Goldstein, 1988).

Nossos resultados da capacidade de redução do NBT pelos neutrófilos sugerem uma interferência do composto MAPA na produção de óxido nítrico (NO). As enzimas NO sintase (NOS) são fundamentais para o controle da biossíntese de NO. Diversas isoformas já foram isoladas e purificadas. Há uma distinção essencial entre as formas “indutíveis” (expressas em resposta a estímulos patológicos como microrganismos invasivos) e as formas ditas “constitutivas” da enzima que estão presentes em condições fisiológicas. A indução é estimulada por lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos e/ou algumas das citocinas sintetizadas em resposta aos LPS, incluindo INF- γ , fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e IL-1. O átomo de nitrogênio no NO deriva do resíduo terminal guanidínico da L-arginina, e o oxigênio do O₂ molecular (Assreuy *et al.*, 1993; Karupiah *et al.*, 1993; LuScher *et al.*, 1994). A hipótese de uma interferência na produção de óxido nítrico (NO) advém da análise química do composto MAPA que contém a arginina como um aminoácido majoritário (Durán *et al.*, 1990, 1993).

3- Capacidade quimiotática de neutrófilos

A quimiotaxia é iniciada pela ligação de “quimioatraentes” a receptores específicos da membrana plasmática. A ocupação destes receptores induz rápidas alterações no potencial transmembrânico da célula, mudanças nos níveis de nucleotídeos cíclicos e fluxo de íons, sendo muito importante o influxo de cálcio extracelular, assim como um aumento na sua liberação dos estoques intra-celulares, aumento na utilização de oxigênio e glicose, alterações na fluidez e composição fosfolipídica da membrana. A reorganização dos elementos do citoesqueleto como estrutura microtubular e filamentos de actina assim como os receptores de membrana parecem ser de fundamental importância na orientação da direção da migração.

Existem evidências na literatura de que o composto por ter Mg^{2+} como componente majoritário, pode ativar o sistema complemento. O passo mais importante na cascata do complemento é a clivagem de C3 por enzimas chamadas C3-convertases. Esta reação gera o fragmento maior, a opsonina, o qual se liga aos complexos imunes, permitindo a ligação aos receptores de opsonina nos neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos B. A ligação da opsonina à membrana, ativa a via alternativa do complemento (APC) neste sítio. A opsonina também transforma C3-convertases em C5-convertases, as quais ativam os componentes efetores C5 e C9, gerando princípios de complemento vasoativo, quimiotático e citolítico. As vias clássica e alternativa formam ambas C3-convertases, porém em resposta a estímulos diferentes. Na via clássica da C3-convertase, ocorre a geração de outro fragmento quando C1 se liga a um complexo imune, IgM ou IgG. A ligação de C1 ativa a enzima dependente de Mg^{2+} , C1s-convertase, a qual catalisa a conversão de C4 e C2 a C4b2b. A função imune normal em indivíduos que são deficientes em C1s-convertase sugere que a atividade deste componente, dependente de Mg^{2+} , não é crítica para a atividade da via clássica (Galland, 1988; Durán *et al.*, 1997).

Em contraste, a atividade da via alternativa do complemento (APC) é completamente dependente de Mg^{2+} *in vitro*. A lenta interação de C3 com fatores B, D e properdina produz uma C3-convertase preliminar que continuamente gera pequenas quantidades de opsoninas no sangue, independente da presença de substâncias ativadoras. O fator B se liga à opsonina que, na presença de Mg^{2+} , é clivado pelo fator D e libera o fragmento Ba, revelando o sítio de ligação de C3 em Bb. O produto é a amplificação da C3-convertase da via alternativa, assim chamada porque sua geração é parte de uma retroalimentação positiva que amplifica a clivagem de C3 e é responsável pela ativação, biologicamente efetiva, da APC. A via alternativa é engatilhada por numerosas substâncias solúveis tais como endotoxinas bacterianas e glúten e por certos componentes das membranas de micróbios e células de mamíferos. Sua atividade tem importância conhecida, por gerar complexos solúveis de antígeno-anticorpo, na citotoxicidade de células tumorais, em células infectadas (por vírus, parasitas e fungos), e na atividade bactericida do soro humano (Galland, 1988; Grewal e Babiuk, 1980).

O fragmento C5a formado tanto pela via clássica como pela via alternativa apresenta atividade quimiotática, ou seja, é capaz de promover a migração de leucócitos de uma área de menor para outra de maior gradiente de concentração de substâncias quimiotáticas. O C5a é capaz de se ligar a receptores específicos em neutrófilos que são atraídos para as regiões contendo maior concentração deste fragmento (Galland, 1988; Durán *et al.*, 1997). Além disso, o C5a induz ainda aumento das propriedades aderentes de neutrófilos, o que permite a aderência destas células ao endotélio vascular, preparando-as para diapedese e quimiotaxia; este fragmento possivelmente ativa a “explosão respiratória”.

4- Cultura Clonal de Precursores Hematopoiéticos de Medula Óssea (CFU-GM) em Camundongos

No presente estudo nós demonstramos que em determinadas concentrações o composto MAPA pode reverter o efeito mielossupressivo observado 48 e 72 h após a infecção por *L. monocytogenes*. Nossos resultados demonstraram este efeito mieloprotetor quando os animais foram pré-tratados com MAPA na dose de 5,0 mg/Kg durante 7 dias antes da infecção pela bactéria, aumentando os números de CFU-GM da medula óssea destes animais.

O envolvimento das células maduras da série monocítica e granulocítica é fundamental à resposta inicial do animal à *L. monocytogenes*. A medula óssea serve como sítio primário de geração e maturação de precursores hematopoiéticos. O crescimento e diferenciação das células formadoras de colônias (CFU-GM) é acelerado em resposta à *L. monocytogenes*, ocorrendo também um aumento dos níveis de fatores estimuladores do crescimento celular no soro destes animais (Rogers *et al.*, 1994; Zhan *et al.*, 1998; Quadros *et al.*, 1999).

A diminuição do número de precursores hematopoiéticos de camundongos BALB/c no início da infecção pela *L. monocytogenes* está bem documentada na literatura. Este efeito parece estar relacionado com o aumento da diferenciação destas células primitivas em células maduras e, com a migração das células primordiais da medula óssea para outros tecidos hematopoiéticos secundários, como o baço (North, 1970; Lepay *et al.*, 1985; Rosen *et al.*, 1989; Rogers *et al.*, 1994). O aumento dos números de CFU-GM da medula óssea dos animais previamente tratados com 2,0 e 5,0 mg/Kg do composto MAPA e infectados com *L. monocytogenes* parece ser de particular importância para a resistência dos camundongos à bactéria. A este respeito, um aumento rápido do número de precursores hematopoiéticos é característico em uma infecção primária à *L. monocytogenes* em camundongos BALB/c, o qual se mantém por vários dias (Wing *et al.*, 1985, 1987; Gregory e Wing, 1993; Gregory *et al.*, 1996).

Características semelhantes foram encontradas em animais resistentes à bactéria onde não há diminuição do número de CFU-GM na medula óssea (Sandarangani *et al.*, 1980; Young e Cheers, 1986).

Os fatores estimuladores de colônias têm um papel importante no crescimento e na diferenciação das células precursoras da medula óssea (Metcalf, 1984; 1989). Vários autores demonstraram que animais infectados pela *L. monocytogenes* apresentam níveis elevados de fatores estimuladores de colônias durante a infecção, quais sejam G-CSF e GM-CSF que são os fatores encontrados em maior concentração no soro e em alguns órgãos como o baço e o fígado (Wing *et al.*, 1984, 1985; Cheers e Stanley, 1988; Cheers *et al.*, 1988; Gregory *et al.*, 1992). O GM-CSF pode estimular a proliferação e a diferenciação de células do sistema pluripotente, desse modo, influenciando a migração destas células durante a infecção. Esta citocina pode também ativar a maturação de neutrófilos, aumentando a quantidade de fatores citocidas secretados por estas células. Czuprynski *et al.* (1994) demonstraram que a depleção de neutrófilos pela administração de um anticorpo monoclonal específico anti-granulócítico altera a resistência de camundongos à infecção por *L. monocytogenes*. Além disso, apesar dos macrófagos e dos neutrófilos serem as células efetoras da resposta inicial à *L. monocytogenes*, as células natural killer (NK) parecem ter também um papel primordial nesse estágio da infecção (Poston e Kurlander, 1991; Bancroft, 1993). Macrófagos infectados pela bactéria produzem IL-1, TNF- α e IL-12 que estimulam as células NK a produzirem INF- γ , que por sua vez, estimula a atividade antimicrobiana e citotóxica dos macrófagos (Hahn e Kaufmann, 1981; Conlan e North, 1991; Appelberg *et al.*, 1994; Rogers *et al.*, 1994).

Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que os parâmetros avaliados da resposta imunológica para a fase inespecífica, parecem contribuir para a resistência do animal. Observamos também que o composto

MAPA aumenta a sobrevivência dos animais infectados quando tratados por 7 dias consecutivos com as doses de 0,5, 5,0 ou 7,5 mg/Kg de MAPA e infectados com a dose letal de 3×10^8 bactérias/animal. As doses de 0,5 e 5,0 mg/Kg ofereceram maior proteção, sendo que 30% dos animais tratados com 0,5 mg/Kg e 40% dos tratados com 5,0 mg/Kg sobreviveram à dose que foi letal em 100% dos animais controle. No entanto, com 7,5 mg/Kg de MAPA todos os animais morreram em até 8 dias, não havendo proteção contra a infecção. Quando doses maiores da substância MAPA foram administradas (7,5 mg/Kg) o aparecimento de um efeito desfavorável sobre a infecção foi observado. A habilidade de agentes antineoplásicos tem sido limitada pela mielossupressão quando doses escalonadas são utilizadas, demonstrando que doses maiores podem ser inibitórias para o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea (Fisher *et al.*, 1994).

Diante do exposto, podemos sugerir que o aumento produzido por determinadas concentrações do composto MAPA na resistência dos camundongos infectados com a *L. monocytogenes* está relacionado à modulação da resposta imunológica na sua fase inespecífica, através do aumento de precursores da medula óssea para granulócitos-macrófagos.

Conclusões

Este estudo sobre as alterações imunológicas provocadas pelo composto MAPA em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* e em indivíduos normais, cujas células polimorfonucleares foram incubadas com MAPA, permite concluir:

1. A capacidade fagocitária de neutrófilos apresentou-se aumentada frente à *Candida albicans* nas concentrações de 25, 50, 75 ou 1000 µg/mL da droga MAPA, enquanto que frente à *C. kefyr* o aumento ocorreu nas concentrações de 50, 75 ou 1000 µg/mL. No entanto, a atividade lítica frente ao antígeno *C. albicans* apresentou-se aumentada ($P < 0,05$ - Teste t de Student) nas concentrações de 25, 50 ou 75 µg/mL do composto MAPA e nas concentrações de 50, 75 ou 1000 µg/mL frente à *C. kefyr*. Estes resultados sugerem uma interferência do composto na aderência dos fagócitos, bem como o processo de desgranulação de neutrófilos.
2. A capacidade do neutrófilo de reduzir o corante nitroblue tetrazolium apresentou-se aumentada nas concentrações testadas (50 µg/mL e 75 µg/mL) do composto, sendo que esta alteração sugere uma interferência na produção do óxido nítrico (NO).
3. A atividade quimiotática de neutrófilos apresentou-se aumentada ($P < 0,05$ - Teste t de Student) na concentração de 75 µg/mL do composto MAPA, apontando uma ação no sistema complemento.
4. Aumento no número de colônias de precursores hematopoiéticos da medula óssea (GM) nos animais tratados e infectados 48 e 72 horas após a inoculação da bactéria. Este aumento parece ser de particular importância para a resistência dos camundongos à bactéria.

Referências Bibliográficas

- Akenzua, G. I. e Amiengheme, O. R.- Inhibitor of in vitro neutrophil migration in serum of children with homozygous sickle cell gene during pain crises. **Br. J. Haematol.**, 47, 345 (1981).
- Allen, R. C.- Biochemiexcitation: Chemiluminescence and the study of biological oxygenation reactions. Em Adam, Wecilento, G. (eds). Chemical and Biological Generation of Excited States. **Academic Press, New York**, 1982, pag. 309.
- Appelberg, R. e Silva, M. T. - T cell dependent chronic neutrophilia during mycobacterial infections. **Clin. Exp Immun.**, 78, 478 (1989).
- Appelberg, R.; Castro, A. G. e Silva, M. T.- Neutrophils as effector cells of T-cell mediated, acquired immunity in murine listeriosis. **Immun.**, 83, 302 (1994).
- Assreuy, J.; Cunha, F. Q.; Liew, F. Y.; Moncada, S.- Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.**; 108, 837 (1993).
- Baggiolini, M.; Wals, A. e Kinkel, S. L.- Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. **J. Clinical Inv.**, 84, 1049 (1989).
- Bancroft, G. J.; Schreiber, R. D.; Bosma, G. C.; Bosma, M. J. e Unanue, E. R.- T cell independent mechanism of macrophage activation by interferon- γ . **J. Immun.**, 139, 1104 (1987).
- Bancroft, G. J.; Sheehan, K. C. F.; Schreiber, R. D. e Unanue, E. R.- Tumor necrosis factor is involved in the T cell independent pathway of macrophage activation in Scid mice. **J. Immun.**, 143, 130 (1989).

- Bancroft, G. J.; Schreiber, R. D. e Unanue, E. R.- Natural immunity: A T-cell-independent pathway of macrophage activation defined in the SCID mouse. **Immun. Rev.**, 124, 5 (1991).
- Bancroft, G. J.- The role of natural killer cells in innate resistance to infection. **Curr. Op. Immun.**; 5, 503 (1993).
- Ballart, I. J.; Diez, R. A. e Sem, L.- Comparison of Candida killing activity by chemiluminescence and cytomorphological methods in human phagocytes. **J. Immun. Met.**, 97, 268 (1987).
- Beatti, I. A.; Swaminathan, B. e Ziegler, H. K.- Cloning and characterization of T cell-reactive protein antigens from *Listeria monocytogenes*. **Inf. and Immun.**, 58, 2803 (1991).
- Beckerman, K. P.; Rogers, H. W.; Corbett, J. A.; Schreiber, R. D.; McDaniel, M. L. e Unanue, E. R.- Release of nitric oxide during the T cell independent pathway of macrophage activation. **J. Immun.**, 150, 888 (1993).
- Beller, B. I.; Kiely, J. M. e Unanue, E. R.- Regulation of macrophage populations. I. Preferential induction of Ia-rich peritoneal exudates by immunological stimuli. **J. Immun.**, 124, 1426 (1980).
- Beller, B. I. e Ho, K.- Regulation of macrophage populations. V. Evaluation of the control of macrophage Ia expression *in vitro*. **J. Immun.**, 129, 971 (1982).
- Bennett, M. e Baker, E. E.- Marrow-dependent cell function in early stages of infection with *Listeria monocytogenes*. **Cell. Immun.**, 33, 210 (1977).

- Bincoletto, C. e Queiroz, M. L. S.- The effects of lead on the bone marrow stem cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Vet. Human. Toxicol.**, 38, 186 (1996).
- Bogomolski-Yahalom, V. e Matzner, Y.- Disorders of neutrophil function. **Blood Rev.**, 9, 183 (1995).
- Buchmeier, N. A. e Schreiber, R. D.- Requirement of endogenous interferon- γ production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82, 7404 (1985).
- Cassatela, M. A.- The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immun. Today**, 16, 21 (1995).
- Cheers, C.; Haigh, A. M.; Kelso, A.; Metcalf, D.; Stanley, E. R. e Young, A. M.- Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection separated determinations of macrophage-; granulocyte-; granulocyte-macrophage- and multi-CSFs. **Inf. and Immun.**, 56, 251 (1988).
- Cheers, C. e Stanley, E. R.- Macrophage production during murine listeriosis: colony-stimulating factor 1 (CSF-1) binding cells genetically resistant and susceptible mice. **Inf. and Immun.**, 56, 2978 (1988).
- Conlan, J. W. e North, R. J.- Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. **J. Exp. Med.**, 174, 744 (1991).
- Conlan, J. W. e North, R. J.- Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by granulocyte-depleting monoclonal antibody. **J. Exp. Med.**, 179, 259 (1994).

- Cossart, P. e Menegaud, J.- *Listeria monocytogenes*: a model system for the molecular study of intracellular parasitism. **Mol. Biol. and Med.**, 6, 474 (1989).
- Cowan, J. A. (ed.)- The biological chemistry of magnesium. **VCH-New York, NY**, 1995.
- Czuprinski, C. J.; Henson, P. M. e Campbell, P. A.- Killing of *Listeria monocytogenes* by inflammatory neutrophils and monuclear phagocytes from immune and non-immune mice. **J. Leukocyte Biol.**, 35, 208 (1984).
- Czuprinski, C. J.; Brown, J. F.; Young, K. M.; Cooley, J. e Kurtz, R. S.- Effects of murine recombinant interleukin 1 α on the host response to bacterial infection. **J. Immun.**, 140, 968 (1988).
- Czuprinski, C. J.; Brown, J. F.; Moroushek, N.; Wagner, R. D. e Steinberg, H.- Neutrophil depletion by administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. **J. Immun.**, 152, 1836 (1994).
- Daugelat, S.; Ladel, C. H.; Schoel, B. e Kaufmann, S. H. E.- Antigen-specific T cell responses during primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection. **Inf. and Immun.**, 62, 1888, (1994).
- Daugelat, S. e Kaufmann, S. H. E.- Role of the Th1 and Th2 cells in bacterial infections. In: Th1 and Th2 cells in health and disease. **Chemical Immun.**, 63, 96 (1996).
- Dunn D. L.- Use of novel therapeutic agents for the treatment of serious infection. **Am. J. Surgery**, 166, 449 (1993).

- Durán, N. e Nunes, O. D. S.- Characterization of an aggregated polymer from *Penicillium* sp. (PB-73 strain). **Brazil. J. Med. Biol. Res.**, 23, 1289 (1990)a.
- Durán, N.; Haun, M.; Pereira-da-Silva, L.; Pisani, R.; Pisani, F. J. C.; Souza-Brito, A. R. M.; Mazetto, M. N. e Nunes, O. D. S.- Comparison of the antiviral activity and toxicity of the protein magnesium ammonium phospholinoleate anhydride polymer with other antiviral drugs. **Brazil. J. Med. Biol. Res.**, 23, 1303 (1990)b.
- Durán, N.; Souza-Brito, A. R. M.; Haun, M.; Nunes, O. D. S.; De Oliveira, J. A.; Hetem, S.; Vargas, L.; Saavedra, I. e Justo, G. Z.- SB-73. An Immunostimulant. **Drugs Fut.**; 18, 327 (1993).
- Durán, N.; Justo, G. Z.; Esposito, E. e Nunes, I. A.- Revised structure and new activities of the immunomodulador SB-73 obtained from *A. oryzae*. **X Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Serra Negra**, 1995, pág. 403.
- Durán, N.; Justo, G. Z.; Souza-Brito, A. R. M.; Rettori, O. e Vieira-Matos, A. N.- SB 73/MAPA: protein magnesium ammonium phospholinoleate-palmitoleate anhydride. **Drugs Fut.**; 22, 454 (1997).
- Elin, R. J.- The effect of magnesium deficiency in mice on serum immunoglobulin concentrations and antibody plaque forming cells. **Proc. Soc. Biol. Med.**, 148, 620 (1975).
- Elisaf, M. e Siamopoulos, K. C.- Bacteremia-induced hypomagnesemia. **Magnesium-Bull.**, 17, 70 (1995).
- Emmerling, P.; Finger, H. e Bockemuhl, J.- *Listeria monocytogenes* infection in nude mice. **Infec. And Immun.**, 12, 439 (1979).

- Fisher, D. C. and Peters, W. P.- Advances in the clinical use of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to intensify cancer chemotherapy. **Curr. Op. Hematol.**; 1, 221 (1994).
- Galland, L.- Magnesium and immune function an overview. **Magnesium**, 7, 290 (1988).
- Gervais, A.; Morris-Hooke, A.; Tran, T. A. e Skamene, E.- Analysis of macrophage bacterial function in genetically resistant and susceptible mice using the temperature-sensitive mutant of *Listeria monocytogenes*. **Infec. and Immun.**, 54, 321 (1986).
- Goldstein, I. M.- Complement: Biologically active products. In Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates (Eds), chapter 4, p. 65. **Raven Press: New York**, (1988).
- Goldstein, P. e Gomperts, B. D.- Non-T cell-mediated cytolysis of antibody-coated sheep red blood cells requires Mg^{2+} , but not Ca^{2+} : an argument against a conventional stimulus secretion mechanism for cytolysis. **J. Immun.**, 144, 1264 (1975).
- Gregory, S. H.; Wing, E. J.; Twardy, D. J.; Shaddock, R. K. e Lin, H. S.- Primary listerial infections are exacerbated in mice administered neutralizing antibody to macrophage colony-stimulating factor. **J. Immun.**, 149, 193 (1992).
- Gregory, S. H. e Wing, E. J.- Interferon-gama inhibits the replication of *Listeria monocytogenes* in hepatocytes. **J. Immun.**, 151, 1409 (1993).
- Gregory, S. H.; Sagnimeni, A.; Uling, E. J.- Bacteria in the bloodstream are trapped in the liver and killed by immigrating neutrophils. **J. Immun.**; 157, 2520 (1996).

- Grewal, A. S. e Babiuk, L. A.- Complement-dependent, polymorphonuclear neutrophil-mediated cytotoxicity of herpes virus-infected cells: possible mechanism(s) of cytotoxicity. **Immun.**, 40, 151 (1980).
- Guenther, T.; Schuemann, K. e Vormann, J.- Tumor necrosis factor- α , prostanoids and immunoglobulins in magnesium deficiency. **Magnesium-Bull.**, 17, 109 (1995).
- Guse, B. V. L. e Mayer, G. W.- Regulation of cADP-ribose-induced Ca^{2+} and inorganic phosphate. **J. Biol. Chem.**, 271, 23946 (1996).
- Hahn, H. e Kaufmann, S. H. E.- The role of cell-mediated immunity in bacterial infections. **Ver. Infect. Dis.**, 3, 1221 (1981).
- Hibbs, J. B.; Taintor, R. R.; Vavrin, Z. e Rachlin, E. M.- Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 157, 87 (1988).
- Hollinshead, A.- Immunotherapy trials: current status and future directions with special emphasis on biological drugs. **Springer Sem. Immunopathol.**, 9, 85 (1986).
- Huang, S.; Hendriks, W.; Althagea, A.; Hemmi, S.; Bluethmann, H.; Kamijo, R.; Vilcet, J.; Zinkernagel, R. M. e Aguet, M.- Immune response in mice that lack the interferon-g receptor. **Sci.**, 259, 1745 (1993).
- Hume, D. A.; Pavli, P.; Donahue, R. E. e Fidler, I. J.- The effect of human recombinant macrophage colony-stimulating factor (CFS-1) on the murine mononuclear phagocyte system in vivo. **J. Immun.**, 141, 3409 (1988).

- Hsieh, C. S.; Macatonia, S. E.; Tripp, C. S.; Wolf, S. F.; O'Garra, A. e Murphy, K. M.- Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. **Sci.**, 260, 549 (1993).
- Justo, G. Z.- Biodisponibilidade e atividade antineoplásica de um novo modificador da resposta biológica. **Dissertação de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP**, 1996.
- Karupiah, G.; Xie, Q.; Buller, M. L.; Nathan, C.; Duarte, C.; Mac-Micking, J. D.- Inhibition of viral replication by interferon- γ -induced nitric oxide synthase. **Sci.**, 261, 1448 (1993).
- Kaufmann, S. H. E.; Hahn, H.; Simon, M. M.; Rollinghoff, M. e Wagner, H.- Interleucina 2 induction in Lyt1+23-T cells from *Listeria monocytogenes* immune mice. **Inf. and Immun.**, 37, 1294 (1982).
- Kaufmann, S. H. E.; Hahn, H.; Berger, R. e Kircher, H.- Interferon-gama production by *Listeria monocytogenes*-specific T cells active in cellular antibacterial immunity. **Eur. J. Immun.**, 13, 268 (1983).
- Kaufmann, S. H. E.; Hug, E.; Vath, U. e De Libero, G.- Specific lysis of *Listeria monocytogenes*- infected macrophages by class II- restricted L3T4+ T cells. **Eur. J. Immun.**, 17, 246 (1987).
- Kaufmann, S. H. E.- Immunity to intracellular bacteria. **Ann. Ver. Immun.**, 11, 129 (1993).
- Kaufmann, S. H. E.- Immunity to intracellular microbial pathogens. **Immun. Today**, 16, 338 (1995).

- Keller, D. I.; Kiely, J. M. e Unanue, E. R.- Regulation of macrophage populations. I. Preferential induction of Ia-rich peritoneal exudates by immunological stimuli. **J. Immun.**, 124, 1433 (1980).
- Klebanoff, S. J.- Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. **Ann. Int. Med.**; 93, 489 (1980).
- Kopf, M.; Baumann, H.; Freer, G.; Freudenberg, M.; Lamers, M.; Kishimoto, T.; Zinkernagel, R.; Bluethmann, H.; Kohler, G.- Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6 deficient mice. **Nat.**, 368, 342 (1994).
- Ladel, , C. H.; Blum, C. e Kaufmann, S. H. E.- Control of natural killer cell-mediated innate resistance against the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes* by γ/δ lymphocytes. **Inf. and Immun.**, 64, 1749 (1996).
- Lehrer, R. I.- Functional aspects of a second mechanisms of candidacidal activity by human neutrophils. **J. Clin. Invest.**; 48, 1488 (1978).
- Lepay, D. A.; Steinman, R. M.; Nathan, C. F.; Murray, H. W. e Chon, Z. A.- Liver macrophages in murine listeriosis: cell-mediated immunity is correlated with na influx of macrophages capable of generating reactive oxygen intermediates. **J. Exp. Med.**, 161, 1512 (1985).
- Lichenstein, A.- Spontaneous tumor cytolysis mediated by inflammatory neutrophils: dependence upon divalent cations and reduced oxygen intermediates. **Blood**, 67, 657 (1986).
- Lima, A. O.; Javierre, M. Q.; Da Silva, W. D. e Massudas, N. K.- Trypsin as a potent activator of immune phagocytosis by macrophages. **Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.**, 6, 387 (1973).

- LuScher, T. F.- The endothelium and cardiovascular disease- a complex relation. N. **Engl. J. Med.**; 330, 1083 (1994).
- Mackness, G. B.- Cellular resistance to infections. **J. Exp. Med.**, 116, 381 (1962).
- Mackness, G. B. e Blanden, R. V.- Cellular immunity. **Progress in Allergy**, 11, 89 (1967).
- Mackness, G. B. e Hill, W. C.- The effect anti-lymphocyte globulin on cell-mediated resistance to infection. **J. Exp. Med.**, 129, 1012 (1969).
- Mackay, C. R.- Immunological memory. **Adv. Immun.**, 53, 217 (1993).
- McCoy, J. H. e Kenney, M. A.- Magnesium and immune function. Em Guy, B. ed. **Handb. Met.-Ligand Interact. Biol. Fluids: Bioinorg. Med. Marcel Dekker Inc., N. Y.**, 2, 871 (1995).
- Metcalf, D.- The bioassay of colony stimulating factors. In the hematopoietic colony stimulating factors. **Elsevier, Amsterdam**, 187 (1984).
- Metcalf, D.- Hematopoietic growth factors 1. **Lancet**, 8642, 827 (1989).
- Mielke, M. E. A.; Ehlers, S. e Hahn, H.- T-cell subsets in delayed-type hypersensitivity, protection and granuloma formation in primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection in mice: superior role of Lyt-2 T cells in acquired immunity. **Inf. and Immun.**, 56, 1925 (1988).
- Mielke, M. E. A.; Ehlers, S. e Hahn, H.- The role of cytokines in experimental listeriosis. **Immunobiol.**, 189, 285 (1993).

- Mombaerts, P.; Amoldi, J.; Russ, F.; Tonegawa, S. e Kaufmann, S. H. E.- Different roles of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in immunity against an intracellular bacterium. **Nat.**, 365, 56 (1993).
- Moncada, S.; Palmer, R. M. J. e Hibbs, E. A.- Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, 43, 109 (1991).
- Myata, M.; Mitsuyama, M.; Ogata, N.; Nomoto, K. e Takeya, K.- Two steps in the generation of acquired resistance against *Listeria monocytogenes*: accumulation and activation of macrophages. **Immun.**, 47, 247 (1982).
- Nathan, C. F.; Murray, H. W.; Wiebe, M. E. e Rubin, B. Y.- Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J. Exp. Med.**, 158, 670 (1983).
- Newborg, M. R. e North, J. R.- On the mechanism of T cell-independent anti-*Listeria* resistance in nude mice. **J. Immun.**, 124, 571 (1980).
- North, R. J.- The relative importance of blood monocytes and fixed macrophages to the expression of cell-mediated immunity to infection. **J. Exp. Med.**, 132, 534 (1970).
- Perlingeiro, R. C. R. e Queiroz, M. L. S.- Polimorphonuclear phagocytosis and killing in workers exposed to inorganic mercury. **Intern. J. of Immunopharmac.**, 16, 1011 (1994).
- Perlingeiro, R. C. R. e Queiroz, M. L. S.- Regulatory oversight of biochemical pesticides by the U. S. environmental agency: health effects considerations. **Reg. Toxicol. Pharmac.**, 19, 115 (1995).

- Pfeffer, K.; Matsuyama, T. M.; Wakeham, A.; Kishihara, K.; Shahinin, A.; Wegmann, K.; Ohashi, P. S.; Kronke, M. e Mark, T. W.- Mice infected deficient for the 55 kD tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. **Cell.**, 73, 467 (1993).
- Poston, R. M. and Kurlander, R. A. J.- Analysis of the time course of INF- γ m RNA and protein production during murine listeriosis. **J. Immun.**; 146, 4333 (1991).
- Quadros, M. R.; Souza-Brito, A. R. M.; Queiroz, M. L. S.- *Petiveria alliacea* l. extract protects mice against *Listeria monocytogenes* infection-effects on bone marrow progenitor cell. **Immunopharmacol. and Immunotoxic.**; 21, 109 (1999).
- Queiroz, M. L. S.- Células pluripotenciais hematopoiéticas em cultura-revisão bibliográfica. **Ciência e Cultura**, 40, 421 (1988).
- Queiroz, M. L. S.; Almeida, M.; Hoehr, N. F.- Defective neutrophil function in workers occupationally exposed to lead. **Pharmac. and Toxicol.**, 72, 73 (1993).
- Queiroz, M. L. S.; Costa, F. F.; Bincoletto, C.; Perlingeiro, R. C. R.; Dantas, D. C. M.; Cardoso, M. P. e Almeida, M.- Engulfment and killing capabilities of neutrophils and phagocytic splenic function in persons occupationally exposed to lead. **Int. J. Immunopharmac.**, 16, 239 (1994).
- Queiroz, M. L. S.; Perlingeiro, R. C. R.; Bincoletto, C. Souza, C. A.; Toledo, H.- Defective neutrophil functions in workers exposed to hexachlorobenzene. **Human and Exp. Toxicol.**, 16, 322 (1997).
- Rogers, H. W.; Sheehan, K. C. F.; Brunt, L. M.; Dower, S. K.; Unanue, E. R. e Schreiber, R. D.- Interleukin-1 participates in the development of anti-*Listeria*

- responses in both normal and Scid mice. **Proc. Natl. Ac. Sci. USA**, 89, 1015 (1992).
- Rogers, H. W. e Unanue, E. R.- Neutrophils are involved in acute, non-specific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. **Infec. Immunity**, 61, 5090 (1993).
- Rogers, H. W.; Tripp, C. S.; Schreiber, R. D. e Unanue, E. R.- Endogenous IL-1 is required for neutrophil recruitment and macrophage activation during murine listeriosis. **J. Immun.**, 153, 2101 (1994).
- Rosen, H.; Gordon, S. e North, R. J.- Exacerbation of murine listeriosis by a monoclonal antibody specific for type 3 complement receptor of myelomonocytic cells. Absence of monocytes at infective foci allows *Listeria* to multiply in non phagocytic cells. **J. Exp. Med.**, 170, 37 (1989).
- Ruco, L. P. e Meltzer, M. S.- Macrophage activation for tumor cytotoxicity: tumoricidal activity by macrophages from C3H/HeJ mice requires at least two activation stimuli. **Cell. Immun.**, 63, 98 (1996).
- Sandarangani, C.; Skamene, E. e Kongshavn, P. A. L.- Cellular basis for genetically determined enhanced resistance of certain mouse strains to listeriosis. **Inf. and Immun.**, 28, 386 (1980).
- Serushago, B. A.; Yoshikai, Y.; Handa, T.; Mitsuyama, M.; Muramori, K.; Nomoto, K.- Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rh G-CSF) on murine resistance against *Listeria monocytogenes*. **Immun.**, 75, 480 (1992).

- Stankiewicz, M.; Migdalska, A.; Bankowska, E. e Jeska, E. L.- Complement activation, phagocytosis, tumor growth and parasitic infection after magnesium supplementation in diet of mice. **Magnesium**, 8, 87 (1989).
- Steeg, P. S.; Moore, R. N.; Johnson, H. M. e Oppenheim, J. J.- Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by a lymphokine with immune interferon activity. **J. Exp. Med.**, 156, 1780 (1982).
- Stevenson, M. M.; Kongshavn, P. A. L. e Skamene, E.- Genetic linkage of resistance to *Listeria monocytogenes* with macrophage inflammatory response. **J. Immun.**, 127, 407 (1981).
- Stites, D. P.; Stobo, J. D. and Wells, J. V.- Basic and Clinical Immunology, 6 ed., pág. 96, **Appleton and Lange** (1987).
- Stossel, T. P.- Quantitative studies of phagocytosis kinetic effects of cations and heat-labile opsonin. **J. Cell. Biol.**, 58, 346 (1996).
- Strannegaard, O.- Recent advances in the treatment of human immunodeficiency virus infections with interferons and other biological response modifiers. **Adv. Pharmacol.**, 32, 249 (1995).
- Szalay, G.; Hess, J. e Kaufmann, S. H. E.- Restricted replication of *Listeria monocytogenes* in a gamma interferon-activated murine hepatocyte line. **Inf. and Immun.**, 63, 3195 (1995).
- Todd, Sanford e Davidson.- Diagnósticos clínicos e conduta terapêutica por exames laboratoriais. 16a ed., vol. 1 e 2, **Ed. Manole, São Paulo-SP** (1989).

Tripp, C. S.; Needleman, P. e Unanue, E. R.- Monocyte migration explains the changes in macrophage arachidonate metabolism during the immune response. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 83, 9655 (1987).

Tripp, C. S.; Wolf, S. H. e Unanue, E. R.- Interleukin 12 and tumor necrosis factor α are costimulants of interferon- γ production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and IL-10 is a physiologic antagonist. **Proc. Natl. Ac. Sci. USA**, 90, 3729 (1993).

Tripp, C. S.; Gately, M. K.; Hakimi, J. e Unanue, E. R.- Neutralization of IL-12 decreases resistance to Listeria in SCID and CB-17 mice. **J. Immun.**, 152, 1887 (1994).

Vetvicka, V.; Thornton, B. P. e Ross, G. D.- Soluble β -glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD 116/ CD 18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of C3b-opsonized target cells. **J. Clin. Invest.**, 98, 50 (1990).

Von Mandach, U.; Burgi, M. e Huch, R.- Magnesium sulphate increases lymphocyte adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in humans. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, 35, 324 (1993).

Vormann, J.; Michalsky, L. e Gunther, T.- Cellular and humoral immunity in rats after gestational zinc or magnesium deficiency. **J. Nutr. Biochem.**, 7, 327 (1996).

Zhan, Y. F.; Lieschke, G. J.; Grail, D.; Dunn, A. R. e Cheers, C.- Essential roles for granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF in

sustained hematopoietic response of *Listeria monocytogenes*-infected mice. **Blood**, 91, 863 (1998).

Wagstaff, J.- The role of biological response modifiers in the management of patients with colorectal cancer. **Eur. J. Cancer**, 31A, 718, 1323 (1995).

Wagner, R. D.; Steinberg, H.; Brown, H. e Czuprynski, C. J.- Recombinant interleukin-12 enhances resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. **Microbial Pathogenesis**, 17, 186 (1994).

Walia, A. S.; Shaw, D. R. e Fuson, E. W.- Different divalent cation requirements for binding IgM complexes to lymphocytes and macrophages. **J. Exp. Med.**, 151, 1528 (1980).

Wherry, J. C.; Shreiber, R. D. e Unanue, E. R.- Regulation of γ -interferon production by natural killer cells in SCID mice: roles of tumor necrosis factor and bacterial stimuli. **Infect. Immunity**, 59, 1709 (1991).

Wilson, C. and Kay, M. A.- Immunomodulation to enhance gene therapy. **Nat. Med.**, 1, 887 (1995).

Wilkson, P. C.- Neutrophil leukocyte function tests. In Techniques in Clinical Immunology. Thompson R. A., (Ed.), chapter 13, p. 276, **Blackwell Scientific Publications** (1981).

Williams, A. J. and Cole, P. J.- Polymorphonuclear leukocyte membrane-stimulated oxidative metabolic activity: the effect of divalent cations and cytochalasins. **Immunology**, 44, 847 (1981).

- Windhauser, M. M., Kappel, L. C. and Hegsted, M.- The humoral immune response in marginally and severely magnesium deficient rats. **J. Nutr. Biochem.**, 35, 324 (1993).
- Wing, E. J.; Waheed, A. e Shadduck, R. K.- Changes in serum colony-stimulating factor and monocytic progenitor cells during *Listeria monocytogenes* infection in mice. **Inf. and Immun.**, 45, 184 (1984).
- Wing, E.; Barbczynski, L. K.; Waheed, A. e Shadduck, R. K.- Effect of *Listeria monocytogenes* infection on serum levels of colony-stimulating factor and number of progenitor cells in immune and non-immune animals. **Inf. and Immun.**, 49, 328 (1985).
- Wing, E.; Magee, D. M. e Barczynski, L. K.- Analysis of colony-stimulating factors and macrophage progenitor cells in mice immunized against *Listeria monocytogenes* by adoptive transfer. **Inf. and Immun.**, 55, 1847 (1987).
- Wood, P. R.; Spanidis, V.; Frangos, K. e Cheers, C.- The *in vitro* bactericidal activity of peritoneal and spleen cells from *Listeria* – resistant or susceptible mice. **Cell. Immunol.**, 99, 160 (1986).
- Wood, S.; Maroushek, N. e Czuprynski, C. J.- Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line. **Inf. and Immun.**, 61, 3072 (1993).
- Yang, J.; Kawamura, I. e Mitsuyama, M.- Requirement of initial production of gamma interferon in the generation of protective immunity of mice against *Listeria monocytogenes*. **Inf. and Immun.**, 65, 77 (1997).

Young, A. M. e Cheers, C.- Colony-forming and colony-stimulating activity during listeriosis in genetically resistant or susceptible mice. **Cell. Immunology**, 97, 237 (1986).

Apêndice

Tabela 1- Capacidade fagocitária e lítica de neutrófilos frente à *C. albicans* em indivíduos normais (n=6), cujos polimorfonucleares foram incubados com o composto MAPA em diferentes concentrações por 30 minutos.

CAPACIDADE FAGOCITÁRIA E LÍTICA DE NEUTRÓFILOS FRENTE À <i>C. albicans</i>										
DOAD	CONTROLES		25		50		75		1000	
	FAGO	% LISE	FAGO	% LISE	FAGO	% LISE	FAGO	% LISE	FAGO	% LISE
A.M.	192	15,62	292	35,32	312	42,25	356	54,25	282	35,81
L.M.	204	28,92	252	45,89	316	45,16	348	53,51	292	25,05
D.R.	180	19,57	256	45,00	325	42,74	369	54,45	301	30,82
D.P.	167	20,30	255	47,74	354	50,01	389	56,56	287	27,74
S.S.	175	30,85	269	32,27	348	51,02	387	57,02	306	34,62
L.S.	177	27,00	238	37,00	322	49,87	401	58,01	256	21,31
X	182,5	23,71	260,3	41,49	329,5	46,84	375	55,63	287,3	29,22
DP	13,30	6,05	18,4	5,41	17,36	3,93	20,06	1,80	16,16	5,12

DOAD = Doadores; **25, 50, 75 ou 1000** = polimorfonucleares incubados com 25, 50, 75 ou 1000 µg/mL do composto MAPA; **FAGO** = capacidade fagocitária; **% LISE** = capacidade lítica; **X** = média dos resultados; **DP** = desvio padrão.

Tabela 2- Capacidade fagocitária e lítica de neutrófilos frente à *C. kefyi* em indivíduos normais (n=6), cujos polimorfonucleares foram incubados com o composto MAPA em diferentes concentrações por 30 minutos.

CAPACIDADE FAGOCITÁRIA E LÍTICA DE NEUTRÓFILOS FRENTE À <i>C. kefyi</i>										
DOAD	CONTROLES		25		50		75		1000	
	FAGO	% LISE	FAGO	% LISE	FAGO	% LISE	FAGO	% LISE	FAGO	% LISE
A.M.	123	21,03	130	18,96	177	45,02	234	68,36	235	69,36
L.M.	125	23,60	133	17,32	182	43,20	245	64,58	231	65,33
D.R.	127	19,87	121	21,78	169	41,56	284	63,21	228	67,80
D.P.	131	21,04	125	25,23	165	43,00	265	68,74	226	59,06
S.S.	130	20,13	132	26,32	166	43,19	284	71,02	236	61,36
L.S.	126	21,30	130	25,02	173	42,36	248	70,05	230	65,38
X	127	21,16	128,5	22,43	172	43,05	260	67,66	231	64,71
DP	3,03	1,32	4,59	3,69	6,63	1,15	21,08	3,09	3,89	3,87

DOAD = Doadores; **25, 50, 75** ou **1000** = polimorfonucleares incubados com 25, 50, 75 ou 1000 µg/mL do composto MAPA; **FAGO** = capacidade fagocitária; **% LISE** = capacidade lítica; **X** = média dos resultados; **DP** = desvio padrão.

Tabela 3- Capacidade do neutrófilo reduzir o corante Nitroblue Tetrazolium em indivíduos normais (n=6), sendo incubado com o composto MAPA em diferentes concentrações e tempos.

TESTE DO NITROBLUE-TETRAZOLIUM							
DOAD	C	INCUBAÇÃO COM O COMPOSTO MAPA					
		POR 15 MINUTOS			POR 30 MINUTOS		
		25	50	75	25	50	75
A.M.	51	29	52	75	50	59	73
L.M.	56	31	60	76	51	59	81
D.R.	40	54	70	66	65	67	42
F.M.	38	57	72	51	55	75	58
D.P.	39	46	52	79	66	68	84
V.R.	44	33	55	86	56	50	68
X	45	42	60a	72a	57b	63a	68c
DP	7	12	9	12	7	9	16

DOAD = Doadores; **C** = controles; **25, 50 ou 75** = polimorfonucleares incubados com 25, 50 ou 75 µg/mL do composto MAPA; **X** = média dos resultados; **DP** = desvio padrão.

a = significativo em relação ao controle e à 25 (por 15 minutos); b = significativo em relação à 25 (por 15 minutos); c = significativo em relação ao controle e à 50 (por 15 minutos).

Tabela 4- Atividade quimiotática de neutrófilos em indivíduos normais (n=6), cujos polimorfonucleares foram incubados com o composto MAPA.

ATIVIDADE QUIMIOTÁTICA DE NEUTRÓFILOS				
DOAD	CONTROLES	25	50	75
A.M.	26	27	30	47
L.M.	22	10	36	54
D.R.	24	24	24	48
D.P.	33	29	18	46
S.S.	27	21	29	58
L.S.	24	22	37	64
X	26	22,16	29	53a
DP	3,24	6,67	7,21	7,16

DOAD = Doadores; **25, 50 ou 75** = polimorfonucleares incubados com 25, 50 ou 75 µg/mL do composto MAPA; **X** = média dos resultados; **DP** = desvio padrão.

a= significativo em relação ao controle.

Tabela 5- Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c não tratados ou tratados com MAPA, infectados com *Listeria monocytogenes* e sacrificados 48 e 72 horas após a inoculação da bactéria.

CFU-GM*															
AN	CONTROLES					INFECTADOS									
						APÓS 48 HORAS					APÓS 72 HORAS				
	C	0,5	2,0	5,0	7,5	I	0,5	2,0	5,0	7,5	I	0,5	2,0	5,0	7,5
1	98	92	127	159	105	53	70	118	172	59	78	82	169	159	78
2	95	78	112	160	110	57	65	114	204	61	71	85	194	157	95
3	120	99	115	128	88	30	82	110	182	72	70	79	197	159	100
4	95	88	116	140	94	61	90	139	149	70	68	90	210	155	79
5	86	86	126	149	90	54	80	114	164	63	73	83	215	160	101
6	85	105	115	130	102	52	78	119	196	78	42	91	210	210	80
7	81	87	111	157	100	45	69	118	175	74	69	101	190	214	98
8	95	90	101	103	101	51	67	149	149	71	68	102	165	155	97
X	94	91	115	141	99	50	75	122	174	68	67,3	89	194	171	91
DP	12	8,2	8,3	20 ^a	7,5	9,4 ^a	8,7	14 ^b	20 ^c	6,7	10 ^a	8,6	19 ^d	25 ^d	10

C = controles; 0,5; 2,0; 5,0 ou 7,5 = doses (mg/Kg) utilizadas no tratamento; I = somente infectados; X = média dos resultados; DP = desvio padrão.

a= significativo em relação ao controle; b = significativo em relação ao controle e à I (após 48 horas); c = significativo em relação ao controle, à I (após 48 horas) e à 2,0 (após 48 horas); d = significativo em relação ao controle e à I (após 72 horas).