

ANA PAULA OTTATI RODRIGUES

**Avaliação dos efeitos do Extrato de *Chlorella vulgaris*
sobre a resposta imunológica do tipo celular em
camundongos expostos ao chumbo e infectados com
*Listeria monocytogenes***



**UNICAMP
2005**

ANA PAULA OTTATI RODRIGUES

**Avaliação dos efeitos do Extrato de *Chlorella vulgaris*
sobre a resposta imunológica do tipo celular em
camundongos expostos ao chumbo e infectados com
*Listeria monocytogenes***

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

Orientadora: Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz



**UNICAMP
2005**

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

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

R618a Rodrigues, Ana Paula Ottati
Avaliação dos efeitos do extrato de *Chlorella vulgaris* sobre a resposta imunológica do tipo celular em camundongos expostos ao chumbo e infectados com *Listeria monocytogenes*. / Ana Paula Ottati Rodrigues. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

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

1. Cumbo. 2. Células hematopoiéticas primitivas. 3. Alga. 4. Terapia quelante. 5. Imunologia. 6. Listeriose. I. Queiroz, Mary Luci de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Unicamp

Banca Examinadora da Dissertação de Doutorado

Orientador:

PROF^a DR^a MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ

Membros:

1. **PROF^a DR^a MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ**
 2. **DR. LUIZ PIANOWSKI**
 3. **PROF^a DR^a SARA T. O. SAAD**
 4. **PROF^a DR^a MARIA HELENA CATELLI DE CARVALHO**
 5. **PROF. DR. STEPHEN HYSLOP**
-

Suplentes:

1. **PROF. DR. EDSON ANTUNES**
 2. **PROF^a DR^a MARIZE CAMPOS VALADARES**
-

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

Data: 12/07/2005

Dedico este trabalho

Aos meus pais Juracy e Madeleine

Que com amor me deram a vida e deram suas vidas para que eu me tornasse uma pessoa realizada e feliz, com muita luta me deram uma boa educação e me ensinaram a ser uma pessoa sincera e a não desistir nunca dos meus sonhos.

Ao meu namorado Douglas

Que esta sempre ao meu lado em todos os momentos, me incentivando a seguir em frente e a superar dificuldades, sempre compreensivo e me fortalecendo com o seu amor.

Aos meus irmãos Marcelo e Ana Luíza

Que são meus melhores amigos, e com quem eu posso contar sempre...

Agradecimentos

A Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, que foi responsável pelo meu crescimento e amadurecimento profissional, fazendo com que pequenas conquistas se tornassem grandes aprendizados.

Aos meus amigos do Laboratório CFU, pelas horas de proveitosa convivência, assim como pela amizade.

Ao Setor de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas desta Universidade.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

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

Aos profissionais do Departamento de Comunicação Social do HEMOCAMP.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1. Estudo dos efeitos do ECV sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea	41
Figura 2. Aspecto microscópico de cultura de longa duração de células hematopoéticas da medula óssea	42
Figura 3. Número total de progenitores de granulócitos macrófagos (CFU-GM) na suspensão de células não aderentes das culturas de longa duração de células hematopoéticas da medula óssea	45
Figura 4. Estudo dos efeitos do ECV sobre a capacidade proliferativa de linfócitos	49
Figura 5. Análise quantitativa de IL-1 α no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A	51
Figura 6. Análise quantitativa de IL-6 no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A	53
Figura 7. Análise quantitativa de IL-10 no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A	55
Figura 8. Análise quantitativa de IFN- γ no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A	57
Figura 9. Análise quantitativa de TNF- α no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A	59
Figura 10. Avaliação dos efeitos do ECV em camundongos C57BL/6 com deficiência funcional do gene para IFN- γ	60
Figura 11. Estudo dos efeitos do ECV sobre a atividade das células natural killer (NK)	62
Figura 12. Aspecto microscópico da alga <i>Chlorella</i> ilustrando a deterioração da parede celular após exposição ao chumbo	65

TABELAS

Tabela 1. Número de células não aderentes viáveis coletadas semanalmente de culturas líquidas de longa duração de células da medula óssea	43
Tabela 2. Número total de células aderentes viáveis coletadas dos frascos das culturas de longa duração de células da medula óssea após 9 semanas de incubação	43
Tabela 3. Cultura clonal de precursores hematopoéticos realizadas com as células não aderentes viáveis coletadas semanalmente de culturas líquidas de longa duração de células da medula óssea	46
Tabela 4. Alterações nos níveis de chumbo sanguíneos	47
Tabela 5. Estudo dos efeitos do ECV sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea	87
Tabela 6. Estudo dos efeitos do ECV sobre a capacidade proliferativa de linfócitos	88
Tabela 7. Análise quantitativa de IL-1 α no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A	89
Tabela 8. Análise quantitativa de IL-6 no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A	90
Tabela 9. Análise quantitativa de IL-10 no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A	91
Tabela 10. Análise quantitativa de IFN- γ no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A	92
Tabela 11. Análise quantitativa de TNF- α no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A	93
Tabela 12. Estudo dos efeitos do ECV sobre a atividade das células natural killer (NK)	94

SUMÁRIO

Resumo	xi
Summary	xiii
Introdução	15
Objetivos	23
Material e Métodos	25
1. Animais	26
2. <i>Listeria monocytogenes</i>	27
3. Tratamento	28
3.1. <i>Chlorella vulgaris</i>	28
3.2. Exposição ao acetato de chumbo	28
4. Cultura clonal de precursores hematopoéticos da medula óssea	28
5. Cultura líquida de longa duração de células precursoras hematopoéticas (LTBMC)	29
6. Quantificação dos níveis de chumbo no sangue	31
7. Proliferação de linfócitos	32
7.1. Obtenção das células mononucleares do baço	32
7.2. Proliferação de linfócitos	32
8. Dosagem de citocinas (IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α) no sobrenadante de culturas de células do baço estimuladas com concanavalina A (Con A)	33
8.1. Obtenção das células mononucleares do baço	33
8.2. Obtenção do sobrenadante de culturas de células do baço	33
8.3. Dosagem de Citocinas pelo Método Imunoenzimático - ELISA de Captura ..	34
9. Realização da curva de sobrevivência	35
10. Atividade das células Natural Killer (NK)	36
10.1. Manutenção e preparação das células alvo	36
10.2. Células efectoras esplênicas para o ensaio de citotoxicidade	36
10.3. Ensaio de liberação de ^{51}Cr	37
11. Análise estatística	38

Resultados

1. Efeito do pós-tratamento com o extrato da alga <i>Chlorella vulgaris</i> (ECV) sobre a cultura clonal de precursores hematopoéticos da medula óssea	40
2. Efeito do tratamento com o extrato da alga <i>Chlorella vulgaris</i> (ECV) sobre a cultura líquida de longa duração de células precursoras hematopoéticas (LTBMC)	42
3. Efeitos do tratamento com o extrato da alga <i>Chlorella vulgaris</i> (ECV) sobre os níveis de chumbo no sangue	47
4. Efeito do tratamento com o extrato da alga <i>Chlorella vulgaris</i> (ECV) sobre a proliferação de linfócitos	48
5. Efeito do tratamento com o extrato da alga <i>Chlorella vulgaris</i> (ECV) sobre a produção de citocinas	50
5.1. Determinação de IL-1 α no sobrenadante de culturas de células esplênicas de camundongos tratados com ECV	50
5.2. Determinação de IL-6 no sobrenadante de culturas de células esplênicas de camundongos tratados com ECV	52
5.3. Determinação de IL-10 no sobrenadante de culturas de células esplênicas de camundongos tratados com ECV	54
5.4. Determinação de IFN- γ no sobrenadante de culturas de células esplênicas de camundongos tratados com ECV	56
5.5. Determinação de TNF- α no sobrenadante de culturas de células esplênicas de camundongos tratados com ECV	58
6. Efeitos do tratamento com o extrato da alga <i>Chlorella vulgaris</i> (ECV) na resistência de animais infectados com <i>Listeria monocytogenes</i>	60
7. Efeitos do tratamento com o extrato da alga <i>Chlorella vulgaris</i> (ECV) sobre a atividade das células natural killer (NK)	61
Discussão	63
Conclusões	74
Referências Bibliográficas	76
Apêndice	86

RESUMO



Neste trabalho investigamos os efeitos do extrato de *Chlorella vulgaris* (ECV) em animais expostos ao chumbo e infectados com *Listeria monocytogenes*. Para a realização dos experimentos, camundongos receberam simultaneamente doses do ECV e acetato de chumbo durante 10 dias. Ao final deste período os animais foram infectados. A capacidade do ECV de reverter a mielossupressão induzida pelo chumbo foi demonstrada pelo aumento no número de CFU-GM e restabelecimento do potencial clonogênico das células pluripotentes da medula óssea em culturas de longa duração (LTBMC). A administração da alga aumentou a atividade das células NK e a capacidade proliferativa de linfócitos nos animais expostos ao chumbo e infectados. A eficácia da *Chlorella* nestes modelos foi demonstrada pela ação quelante do ECV, onde observamos uma redução de 34% nos níveis de metal no sangue quando a alga foi administrada simultaneamente ao chumbo. Além disso, experimentos com camundongos C57BL/6 com deficiência funcional do gene para IFN- γ , demonstraram a importância dessa citocina na proteção conferida pelo ECV. O tratamento com o ECV estimulou a secreção de citocinas do tipo Th1 (IL-1, IFN- γ e TNF- α) no grupo infectado e normalizou os níveis dessas citocinas nos grupos expostos ao chumbo e infectados/expostos ao chumbo. Da mesma forma, a produção de citocinas do tipo Th2 (IL-6 e IL10) foi significativamente modulada pelo extrato da alga nos grupos expostos ao chumbo, infectados e infectados/expostos ao chumbo.

SUMMARY



In this work, we investigated the effects of *Chlorella vulgaris* extract (CVE) in lead-exposed and *Listeria monocytogenes* infected mice. Experiments were carried out in mice treated simultaneously with CVE and lead acetate for 10 days. At the end of this period, the animals were infected. The capacity of CVE to prevent the myelosuppression induced by lead was demonstrated by the increased numbers of CFU-GM in clonal assays and the restored clonogenic potential of pluripotent stem cells in long-term bone marrow cultures (LTBMC). The extract also stimulated NK cell activity and lymphocyte proliferation in lead-exposed and infected animals. A 34% reduction of blood lead levels was observed when CVE was given to mice simultaneously to lead acetate, suggesting a chelating activity of *Chlorella*. Experiments in mice lacking a functional IFN- γ gene demonstrated that this cytokine is of paramount importance in the protection afforded by CVE. The CVE treatment stimulated the secretion of Th1 cytokines (IL-1, IFN- γ e TNF- α) in the infected group, and normal levels of these cytokines were determined in the lead-exposed groups. Likewise, the production of Th2 type cytokines (IL-6 and IL-10) was modulated by the algae extract in all groups studied.

INTRODUÇÃO



Chlorella vulgaris é uma alga verde unicelular, cujo extrato é considerado um modificador da resposta biológica, como demonstrado pela sua capacidade de aumentar as defesas do hospedeiro contra infecções virais e bacterianas, em camundongos normais e imunossuprimidos (TANAKA et al., 1986; HASEGAWA et al., 1994, 1995, 1997; DANTAS E QUEIROZ, 1999; QUEIROZ et al., 2003), tumores (TANAKA et al., 1984; KONISHI et al., 1985; MORIMOTO et al., 1995; NODA et al., 1998; HASEGAWA et al., 2002), úlcera gástrica (TANAKA et al., 1997) e estresse (HASEGAWA et al., 2000), além de contribuir na eliminação pelo organismo de substâncias tóxicas como os inseticidas organoclorados (PORE, 1984).

O uso da *C. vulgaris* para a remoção de metais pesados como chumbo, cádmio, cromo e níquel de ambientes aquáticos tem sido amplamente investigado nos últimos anos (WILDE e BENNEMAN, 1993; LUSTIGMAN et al., 1995; VEGLIO e BEOLCHINI, 1997; WONG et al., 1997; CARR et al., 1998; LÓPEZ et al., 1998; MATSUNAGA et al., 1999; SLAVEYKOVA e WILKINSON, 2002). Estes estudos indicam que esta alga possui propriedade quelante, promovendo o seqüestro do metal através de uma organela citoplasmática denominada cloroplasto. O mecanismo pelo qual o cloroplasto promove a captação do metal parece estar relacionado aos seus constituintes polissacarídicos, protéicos, lipídicos e principalmente à presença de grupos funcionais como sulfato, fosfato, carboxila e amino em sua composição (VEGLIO e BEOLCHINI, 1997; WONG et al., 1997; LÓPEZ et al., 1998; TRAVIESO et al., 1999). Resultados recentes do nosso laboratório demonstram esta importante atividade quelante da alga no modelo experimental de infecção com *Listeria monocytogenes* (QUEIROZ et al.,

2003). Nesta avaliação observamos uma redução nos níveis séricos de chumbo em animais submetidos ao tratamento com o extrato aquoso de *Chlorella vulgaris* (ECV). Estes dados são relevantes, sugerindo uma contribuição deste efeito na proteção dos animais contra a infecção.

Em consequência de seu amplo emprego industrial, destacando-se entre outras, a indústria extrativa, petrolífera, de acumuladores, de tintas e corantes, cerâmica, gráfica e bélica, o chumbo é um dos metais que mais freqüentemente polui o meio ambiente e também é responsável por um grande número de intoxicações. Desta forma, a exposição crônica de indivíduos a esse metal é bastante freqüente, sendo decorrente principalmente da exposição ocupacional, ingestão de água e alimentos contaminados. Após absorvido, esse metal exerce seus efeitos tóxicos sobre o sistema hematopoético, gastrintestinal, nervoso e reprodutor (SALGADO, 1996).

Exposição a metais pesados como o chumbo altera de forma significativa os parâmetros da resposta imunológica. Estudos na literatura demonstram que em camundongos expostos ao chumbo ocorre um comprometimento da proliferação e diferenciação dos precursores hematopoéticos envolvidos com a série granulocítica-macrofágica (CFU-GM), assim como na resposta destas células ao fator estimulador de crescimento de macrófagos (CSF-1) (KOWOLENKO et al., 1989, 1991; BINCOLETTO e QUEIROZ, 1996; QUEIROZ et al., 2003).

Além disso, estudos sugerem que o efeito imunotóxico do chumbo sobre a produção de células hematopoéticas também está relacionado às alterações induzidas por este metal no estroma medular (MISZTA, 1989; VAN DEN HEUVEL

et al., 2001), o qual compreende o tecido da medula óssea envolvido na regulação da maturação das células-tronco hematopoéticas (LICHTMAN, 1981; DEXTER, 1982; ALLEN e DEXTER, 1984; GUEST e UETRECHT, 2001).

Um outro modelo envolvido no comprometimento do sistema hematopoético é a infecção com *Listeria monocytogenes*. Estudos demonstram que em animais infectados com *L. monocytogenes* há um decréscimo no número de células progenitoras, macrófagos e neutrófilos da medula óssea e um aumento na atividade estimuladora de colônias do soro (DANTAS e QUEIROZ, 1999; QUADROS et al., 1999; QUEIROZ et al., 2000; MELO et al., 2001; QUEIROZ et al., 2003). Em camundongos, a erradicação ou controle da infecção com este microrganismo depende da ativação dos mecanismos bactericidas dos macrófagos por linfocinas produzidas por linfócitos T CD4+. A resposta Th1 relaciona-se com a produção de IFN- γ e resolução da infecção, enquanto a resposta Th2 com a produção de IL-4 e IL-10 e disseminação da infecção (MEDEIROS et al., 1998). No entanto, mesmo antes de ocorrer esta reação de imunidade tipo tardio, a resposta inflamatória de macrófagos e neutrófilos é fundamental para a sobrevivência do animal (HAHN e KAUFMANN, 1981; BUSCH e PAMER, 1999; GULERIA e POLLARD, 2001; KIM et al., 2001).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram uma diminuição na resistência à infecção com *L. monocytogenes* de animais expostos ao chumbo. Um dos fatores associados ao comprometimento da resposta imunológica seria a ação mielotóxica do chumbo sobre macrófagos e neutrófilos em estágio de crescimento e diferenciação. Já está bem estabelecido na literatura que a

integridade da resposta mielopoética é essencial para a resistência inicial dos animais infectados com este microrganismo (BINCOLETTO e QUEIROZ, 1996; QUEIROZ et al., 2003).

Os macrófagos possuem um papel fundamental durante a infecção pela *L. monocytogenes* pela ativação de diferentes mecanismos reguladores como a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α e IL-12), as quais estimulam as células NK a secretarem IFN- γ (GULERIA e POLLARD, 2001; KIM et al., 2001; STOIBER et al., 2001; GOLDFINE e WADSWORTH, 2002). Esta citocina, por sua vez, promove a ativação de macrófagos e uma maior expressão das moléculas da classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) (KIM et al., 2001). Uma das alterações induzidas pelo chumbo é a redução na produção de IFN- γ , contribuindo para a diminuição da resistência imunológica (KOWOLENKO et al., 1991; KIM e LAWRENCE, 2000; KIM et al., 2000). Além disso, essa redução nos níveis de IFN- γ interfere na transcrição de genes IL-1 e TNF- α e moléculas do MHC das classes I e II, o que implica na inibição da fase de reconhecimento do antígeno na resposta imunológica (YUCESYOY et al., 1999; SANTARELLI et al., 2003).

A inibição da atividade metabólica de macrófagos por metais pesados como o chumbo, em particular a redução de IL-1 e TNF- α , contribui para modular o espectro de citocinas produzidas, aumentando a síntese de IL-4 e IL-10 e inibindo a produção de IFN- γ . Este fato estaria associado ao aumento na proliferação de linfócitos com função Th2 observada após a exposição ao chumbo (HEO et al., 1996, 1997, 1998; KROCOVA et al., 2000; FLOHE et al., 2002).

Evidências apontam para o papel da IL-10 na mielossupressão induzida pelo chumbo em animais infectados com *L. monocytogenes*. A exposição ao chumbo provoca um aumento na produção dessa citocina, a qual é responsável por inibir a proliferação de células T e bloquear a ação estimuladora do TNF- α nos macrófagos (SANTARELLI et al., 2003). Além disso, a IL-10 favorece a produção de citocinas do tipo Th2 e inibição daquelas associadas ao fenótipo Th1: IL-1, IL-12, IL-6, TNF- α , GM-CSF e IFN- γ , as quais possuem um papel relevante na listeriose (BUSCH e PAMER, 1999).

Segundo LAWRENCE e colaboradores o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th2, com alterações nos níveis de IL-6 e de glicocorticóides devido à ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA), está associado à diminuição da resistência à *L. monocytogenes* (KISHIKAWA e LAWRENCE, 1998; KIM e LAWRENCE, 2000; KIM et al., 2001). De fato, já está bem estabelecido na literatura que a listeriose murina é responsável por ativar quase exclusivamente as células Th1, induzidas pela resposta imune inespecífica, a qual é dirigida por células NK, neutrófilos, macrófagos e citocinas pró-inflamatórias liberadas na fase inicial da infecção (DANTAS et al., 1999; QUEIROZ et al., 2000). BANCROFT et al. (1987, 1989) também demonstraram que o uso de anticorpos monoclonais anti-IFN- γ e a depleção das células NK previamente à infecção levam à exacerbação da doença em 24 horas.

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que o ECV é capaz de ativar as células NK e aumentar a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-2 e IFN- γ (DANTAS et al., 1999; QUEIROZ et al., 2002).

Resultados similares foram obtidos por HASEGAWA et al. (1997) no modelo murino da síndrome da imunodeficiência adquirida (MAIDS).

Além disso, vários estudos demonstram a importância das células fagocíticas na expressão das propriedades farmacológicas da *C. vulgaris*. Resultados do nosso laboratório (DANTAS e QUEIROZ, 1999) e da literatura (KONISHI et al., 1985, 1990; HASEGAWA et al., 1989, 1994) indicam que o efeito antibacteriano da alga está relacionado à estimulação da geração destas células nos órgãos hematopoéticos e à ativação de suas funções efetoras. Neste sentido, VACEK et al. (1990) demonstraram uma ativação de células progenitoras hematopoéticas pelo ECV, aumentando a resistência dos animais a uma dose letal de radiação gama. Um aumento tanto no número como na capacidade proliferativa de CFU-S (unidades formadoras de colônias no baço – “stem cells”) e de CFU-GM foi observado na medula óssea dos animais tratados logo após a irradiação. Simultaneamente, um aumento na atividade estimuladora de colônias (CSA) do soro foi detectado após o tratamento (VACEK et al., 1990). Resultados similares foram obtidos após mielossupressão com 5-fluorouracil (KONISHI et al., 1996) e também nos modelos murinos de infecção com *Listeria monocytogenes* (DANTAS e QUEIROZ, 1999) e *Escherichia coli* (KONISHI et al., 1990).

Segundo HASEGAWA et al. (1997, 2000), a atividade imunomoduladora da *C. vulgaris* está relacionada, pelo menos em parte, ao aumento na produção de GM-CSF, IL-1 α , IL-12 e TNF- α por macrófagos. Além do papel clássico de GM-CSF e IL-1 α na mielopoese e no recrutamento de fagócitos para a periferia (METCALF, 1985; BROXMEYER et al., 1987), em conjunto com IL-6, estas

citocinas também regulam a produção e quimioatração de granulócitos para sítios periféricos em resposta à infecção (HASEGAWA et al., 2000).

OBJETIVOS



Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito profilático da administração do Extrato de *Chlorella vulgaris* (ECV) como agente quelante do chumbo e na proteção do organismo contra infecção com *L. monocytogenes*. Os parâmetros avaliados foram:

- ❖ cultura clonal de precursores hematopoéticos da medula óssea;
- ❖ cultura líquida de longa duração de células precursoras hematopoéticas (LTBMC);
- ❖ quantificação dos níveis de chumbo no sangue;
- ❖ proliferação de linfócitos;
- ❖ dosagem de citocinas (IL-1; IL-6; IL-10; IFN- γ e TNF- α) no sobrenadante de células do baço estimuladas com Concanavalina A (Con A).
- ❖ realização da curva de sobrevida;
- ❖ atividade das células Natural Killer (NK).

MATERIAL E MÉTODOS



1. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos BALB/c machos, com idade de 7 semanas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Os animais foram mantidos agrupados em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura constante de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 horas. O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e água fornecidas *ad libitum*. Os animais foram aclimatados às condições do laboratório durante um período de 72 horas previamente à realização dos experimentos. Os animais foram divididos em grupos e submetidos ao tratamento de acordo com o protocolo experimental a seguir:

- ❖ animais controle tratados por dez dias, por via oral, com o veículo água destilada, na mesma dose-volume/peso corporal administrada aos animais tratados com o ECV;
- ❖ animais tratados por dez dias consecutivos, por via oral, com o extrato de *C. vulgaris* (ECV) na dose de 50 mg/kg;
- ❖ animais expostos por dez dias consecutivos ao acetato de chumbo na dose de 1300 ppm;
- ❖ animais infectados com uma dose subletal de *L. monocytogenes* de 5×10^3 bactérias/mL;
- ❖ animais expostos ao chumbo e, em seguida, infectados com *L. monocytogenes*;
- ❖ animais tratados com o ECV e expostos ao chumbo;

- ❖ animais tratados com o ECV e, em seguida infectados com *L. monocytogenes*;
- ❖ animais tratados com o ECV, expostos ao chumbo e em seguida, infectados com *L. monocytogenes*.

2. *Listeria monocytogenes*

Para a manutenção da patogenicidade desta bactéria, a mesma foi periodicamente repassada por vinte e cinco vezes em camundongos, através da inoculação intraperitoneal da *Listeria monocytogenes* em solução salina 0,85%. Quarenta e oito horas após a inoculação deste microrganismo, os baços dos camundongos foram isolados em ambiente estéril, macerados e mantidos em BHI por 24-48 horas. Para obtenção das colônias, a *Listeria monocytogenes* foi plaqueada em ágar-sangue e incubada por 24 horas em estufa a 37°C. Após o isolamento das colônias de bactérias, estas foram diluídas até atingir a concentração apropriada para o uso.

Para a infecção dos animais, a bactéria *L. monocytogenes*, isolada pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica (HC-UNICAMP), foi incubada em meio de cultura BHI por 24-48 horas a 37°C. As colônias obtidas das culturas frescas de ágar-sangue foram ressuspendidas em solução salina 0,85% e a concentração determinada espectrofotometricamente, utilizando-se a Escala de McFarland como padrão (Vitek Colorimeter). A infecção dos animais foi realizada pela administração intraperitoneal de 5×10^3 bactérias/mL de *Listeria*.

3. Tratamento

3.1. *Chlorella vulgaris*: O extrato liofilizado da alga *Chlorella vulgaris* foi gentilmente doado pelo Dr. Takashi Hasegawa, Research Laboratories, Chlorella Industry Co. Ltd. (Japão). A análise química da composição do extrato, fornecida pelo fabricante, demonstrou a presença de 44,0 g de proteína, 39,5 g de carboidratos e 15,4 g de ácidos nucléicos em 100 g de extrato seco.

Para o tratamento dos animais, o ECV foi ressuspenso em água destilada a 40°C e doses de 50 mg/kg foram administradas por via oral (gavagem), durante dez dias consecutivos. A dose de ECV utilizada foi estabelecida a partir de experimentos anteriores (DANTAS e QUEIROZ, 1999).

3.2. Exposição ao acetato de chumbo: Camundongos receberam doses de 1300 ppm de acetato de chumbo (Merck) em água de beber durante 10 dias consecutivos. Esta dose permitiu que alterações imunológicas fossem detectadas, sem que os animais fossem a óbito por intoxicação aguda (BINCOLETTO e QUEIROZ, 1996). O quadro clínico, sinais e sintomas apresentados por esses animais foram: pilo-ereção, fezes escuras, perda do apetite e emagrecimento.

4. Cultura clonal de precursores hematopoéticos da medula óssea

Após sacrificar o animal por deslocamento cervical e realizar assepsia da pele com álcool 70%, o fêmur foi exposto. A cartilagem foi removida sobre o orifício na extremidade distal e o osso cortado na junção superior. A medula óssea foi transferida com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo meio RPMI 1640 (Gibco).

O número de células na suspensão foi determinado em câmara hemacitométrica após diluição 1:10 das células em azul de Tripán 1% e a concentração ajustada para 1×10^5 células/mL.

A seguir, foi preparado o meio de cultura contendo ágar, que consistiu de:

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

O volume apropriado de células da medula óssea (1×10^5 células/mL) foi então adicionado e alíquotas de 2 mL foram distribuídas em cada placa de Petri (35 mm) contendo 0,1 mL do estímulo apropriado (meio condicionado de células do baço – SCM 1:1). Após geleificar, as placas foram incubadas por 7 dias, a 37°C, em presença de 5% de CO₂ no ar. Após este período, o número de colônias foi contado em microscópio de dissecação em aumento de 40X.

A celularidade total da medula óssea foi determinada a partir da contagem do número de células de cada suspensão em azul de Tripán 1%, em câmara hemacitométrica.

5. Cultura líquida de longa duração de células precursoras hematopoéticas (LTBMC)

Após sacrificar os animais (n = 9) por deslocamento cervical e realizar assepsia da pele com álcool 70%, os dois fêmures de cada animal foram coletados em tubos do tipo Falcon (15 mL) contendo meio RPMI 1640. Após remoção da cartilagem e lavagem com meio de cultura RPMI 1640, a medula

óssea e as células do estroma medular dos fêmures foram transferidas com o auxílio de agulha e seringa para um tubo do tipo Falcon (50 mL) contendo meio de cultura Fischer (Sigma) suplementado com estreptomicina 100 mg/L, penicilina 100 mg/L, HEPES 25 mmol/L, L-glutamina 2 mmol/L, bicarbonato de sódio 25 mmol/L, hidrocortisona 1 μ mol/L e 20% de soro eqüino (meio completo). A seguir, a viabilidade das células foi determinada em câmara hemacitométrica pelo método de exclusão do corante azul de Tripán 1% e o volume da suspensão total de células estromais (correspondente aos 9 animais) foi ajustado com meio completo. Um volume de 10 mL de suspensão celular (aproximadamente 2×10^6 células/mL) foi aliqotado por frasco de cultura T25 (5 frascos de 25 cm²). Os frascos foram, então, incubados a 33°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ no ar para a formação da densa camada de células aderentes. As culturas foram monitoradas semanalmente com auxílio de microscópio óptico.

Semanalmente, 5 mL da suspensão de células (sobrenadante) de cada frasco de cultura foram transferidos para um tubo tipo Falcon (“pool” de todos os frascos) e 5 mL de meio de cultura completo (novo) foram adicionados às culturas. Na quarta semana, após retirar 5 mL do sobrenadante, as culturas foram repopuladas com 5 mL de meio completo contendo células da medula óssea e do estroma medular dos fêmures de animais da mesma idade e submetidos aos mesmos tratamentos. Os frascos foram, então, incubados nas mesmas condições. O “pool” da suspensão de células coletado dos frascos foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos e o botão de células ressuspendido em 1 mL de meio

RPMI 1640 para avaliação da viabilidade das células pelo método de exclusão do corante azul de Tripan.

Após a estabilização da hematopoese, a cultura clonal das células presentes no sobrenadante foi realizada semanalmente, com o objetivo de quantificar o número de precursores hematopoéticos produzido pelas células aderentes derivados do estroma medular. A cultura clonal foi realizada essencialmente como descrita no item 4, com o “pool” das células progenitoras obtidas da cultura líquida de todos os frascos de cultura.

Na última semana de experimento, todo o sobrenadante dos frascos de cultura foi coletado. A seguir, foram adicionados 2 mL de solução de tripsina 0,25%/EDTA 0,02% para descolar as células aderentes. A tripsina foi inativada pela adição de 5-10 mL de meio RPMI 1640 contendo 20% de soro fetal bovino (SFB) e a viabilidade das células determinada pelo método de exclusão do corante azul de Tripan (DEXTER et al., 1977; SPOONCER et al., 1993).

6. Quantificação dos níveis de chumbo no sangue

A concentração de chumbo no sangue foi medida por espectrofotometria atômica de absorção (Zeiss, FMD4) de acordo com o método de extração de quelação direta (Hessel, 1968) pelo Laboratório Prevlab (Campinas/SP). A exatidão e a precisão deste método foram determinadas através da análise padronizada do sangue bovino obtida do Laboratório Koulson. Os resultados foram $43 \pm 7 \mu\text{g/dL}$ (valor do controle $45 \pm 7 \mu\text{g/dL}$) para 5 amostras. A

concentração de chumbo na amostra foi determinada comparando sua absorvância com a da curva padrão realizada com amostras controle.

7. Proliferação de linfócitos

A capacidade proliferativa de linfócitos avalia as propriedades funcionais dos linfócitos de acordo com a sua resposta *in vitro* a mitógenos, como a Concanavalina A (Con A) (Sigma Chemical Co, USA). Nesta cultura verifica-se a competência funcional dos linfócitos determinando desta forma, a resposta imunológica através do método de redução do tetrazolium.

7.1. Obtenção das células mononucleares do baço: Os baços dos animais foram coletados assepticamente e colocados em tubos do tipo Falcon (15 mL) contendo meio RPMI 1640 (Cultilab). As células foram liberadas cuidadosamente com auxílio de um macerador, e as hemácias foram lisadas adicionando-se tampão de lise (NH_4Cl 0,85% - Tris 15mM, pH 7,2) ao botão celular previamente concentrado. Após 3 lavagens com meio RPMI, as células foram ajustadas a uma concentração de 1×10^6 células/mL em meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co, USA) suplementado com 5% de soro bovino fetal, penicilina (100 μg), hepes 25 mM, 2-mercaptoetanol (1:100) e glutamina (216 mg/mL).

7.2. Proliferação de linfócitos: Nos orifícios da placa de microcultura de 96 orifícios foram adicionados 200 μL da suspensão celular enriquecida com 5% de SBF e 10 μL de solução de Con A (concentração final de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Concomitantemente foram incubadas células de cada amostra sem Con A. O ensaio foi realizado em triplicata para cada animal. As placas foram mantidas 72

horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, a solução de MTT (Kit – Boehringer Mannheim) foi adicionada e a placa de cultura e incubada por mais 4 horas. Logo após, adicionou-se à solução solubilizante do MTT e efetuou-se a leitura em ELISA a 570 nm.

8. Dosagem de citocinas (IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α) no sobrenadante de culturas de células do baço estimuladas com concanavalina A (Con A)

8.1. Obtenção das células mononucleares do baço: Os baços dos animais foram coletados assepticamente e colocados em tubos do tipo Falcon (15 mL) contendo meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co, USA). As células foram liberadas cuidadosamente com auxílio de um macerador e as hemácias foram lisadas adicionando-se tampão de lise (NH₄Cl 0,85% - Tris 15 mmol/L, pH 7,2) ao botão celular previamente concentrado. Após 3 lavagens com meio RPMI, as células foram ajustadas a uma concentração de 1×10^6 células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 μ g/mL), Hepes (25 mmol/L), bicarbonato de sódio (25 mmol/L), L-glutamina (2 mmol/L) e 2-mercaptoetanol (0,05 mmol/L) (meio completo).

8.2. Obtenção do sobrenadante de culturas de células do baço: Para a dosagem de citocinas foi utilizado o sobrenadante de culturas de células esplênicas estimuladas por 48 h com Con A. As suspensões celulares utilizadas nestas culturas foram preparadas conforme descrito no item 10.1.

Nos poços da placa de cultura (24 wells) contendo 800 μL de meio completo foram adicionados 200 μL da suspensão celular (1×10^6 células/mL) e 50 μL de Con A (concentração final: 2,5 $\mu\text{g/mL}$). A placa foi incubada em estufa úmida contendo 5% de CO_2 , a 37°C . Após 48 horas, o sobrenadante correspondente a cada amostra foi coletado e armazenado a -20°C até a dosagem das citocinas em estudo. Com o objetivo de verificar estimulação espontânea, células de cada amostra foram incubadas na ausência do estímulo.

8.3. Dosagem de Citocinas pelo Método Imunoenzimático - ELISA de

Captura: A dosagem das citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α foi realizada pelo método imunoenzimático ELISA de captura (PharMingen, USA) utilizando-se os seguintes Kits (BD OptEIA™ ELISA Set):

- ❖ BD OptEIA™ ELISA Set Mouse IL-1 α (Código: 550347);
- ❖ BD OptEIA™ ELISA Set Mouse IL-6 (Código: 555240);
- ❖ BD OptEIA™ ELISA Set Mouse IL-10 (Código: 555252);
- ❖ BD OptEIA™ ELISA Set Mouse IFN- γ (Código 555138);
- ❖ BD OptEIA™ ELISA Set Mouse TNF- α (Mono/Mono) (Código: 555268).

Os sobrenadantes obtidos das culturas foram colocados em duplicata em microplacas de 96 poços (NUNC-Maxisorp, DM) previamente sensibilizadas com 100 μL dos anticorpos de captura diluídos em tampão fosfato-salina (PBS), pH 7,0 e incubou-se “overnight” a temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/Tween) e as reações inespecíficas bloqueadas com 200 μL de PBS contendo 10% de SBF (PBS/SBF) por uma hora a temperatura ambiente. Após este período, as

placas foram lavadas quatro vezes com PBS/Tween e os anticorpos monoclonais anti-citocina de camundongo marcados com biotina diluídos em PBS/SBF foram adicionados. Após uma hora de incubação a temperatura ambiente, as placas foram lavadas seis vezes com PBS/Tween. Adicionou-se 100 µL de uma solução de avidina-peroxidase (Sigma) diluída em PBS/SBF (1:400 de uma solução 1 mg/mL). Após trinta minutos de incubação, adicionou-se 100 µL do substrato (10 µL H₂O₂ 30% e 5 mg de dihidroclorato de o-fenilenodiamina (Sigma) em 10 mL de tampão citrato, pH 4,35). Dihidroclorato de o-fenilenodiamina é um cromógeno apropriado para o uso em protocolos de ELISA que utilizam conjugados com peroxidases. Assim, a enzima avidina-peroxidase atua sobre este substrato havendo formação de um produto final solúvel e de cor castanha. A formação do produto final foi determinada por espectrofotometria a 492 nm em um leitor de ELISA (Labsystem). Visto que a relação entre os valores de absorbância a 492 nm e as concentrações padrões de citocina presentes na solução descreve uma função linear, pode-se calcular a concentração de citocina presente na amostra. Os resultados foram expressos em pg/mL.

9. Realização da curva de sobrevida

Para o estudo dos efeitos do tratamento com o ECV (50 mg/kg) na resistência dos animais C57BL/6 com deficiência funcional do gene para IFN- γ , os mesmos foram tratados por 10 dias consecutivos com o extrato da alga e em seguida infectados com *L. monocytogenes*. Este estudo foi realizado para investigar a importância da produção de IFN- γ endógeno após o tratamento com o

ECV. Para a realização deste experimento utilizamos uma dose letal 100x maior que a utilizada em camundongos BALB/c (4×10^6 bactérias/animal), devido a linhagem C57BL/6 ser resistente a *L. monocytogenes*.

10. Atividade das células Natural Killer (NK)

10.1. Manutenção e preparação das células alvo: A linhagem de célula tumoral YAC-1, linfoma originário de A/Sn induzido pelo vírus Maloney, cresce em suspensão e foi mantida em cultura contínua em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com HEPES 25 mmol/L, L-glutamina 2 mmol/L, penicilina 100 mg/L, estreptomicina 100 mg/L, 2-mercaptoetanol 2×10^{-5} mol/L, bicarbonato de sódio 25 mmol/L (meio completo) e 20% de soro fetal bovino (SFB), em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Para o ensaio de citotoxicidade, 5×10^6 células alvo foram lavadas 2 vezes com meio RPMI 1640 completo e suplementado com 20% de SFB e ressuspensas em 0,2 mL de SFB. As células foram marcadas com 100 µCi de Na₂⁵¹CrO₄ por 90 minutos a 37°C sob agitação periódica. A seguir, as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI 1640 completo e suplementado com 10% de SFB a uma concentração de 1×10^5 células/mL.

10.2. Células efectoras esplênicas para o ensaio de citotoxicidade: Baços de camundongos foram coletados assepticamente e homogeneizados utilizando-se meio RPMI 1640. As células mononucleares foram separadas em gradiente de ficoll-hypaque (d=1,077), lavadas e ressuspensas em 10 mL de meio RPMI 1640 completo e suplementado com 10% de SFB e incubadas em placas de Petri de plástico (100 x 20 mm) por 2 horas em estufa úmida a 37°C e 5% CO₂. Após

este período, as células não aderentes (sobrenadante) foram cuidadosamente aspiradas da placa, lavadas e ressuspensas em meio RPMI 1640 completo e suplementado com 10% de SFB a uma concentração de 5×10^6 células/mL. A atividade citotóxica das células NK foi avaliada contra as células alvo YAC-1 (célula de referência para NK) no ensaio de liberação de ^{51}Cr .

10.3. Ensaio de liberação de ^{51}Cr : Em microplacas de cultura (Corning – 96 wells) foram adicionados 100 μL da suspensão de células efectoras, efetuando-se diluições seriadas em triplicatas, e com reserva de 3 pocinhos para lise máxima (100 μL de Triton X-100 50%) e outros 3 para a lise espontânea (100 μL de meio de cultura). A seguir, 100 μL de células alvo previamente marcadas com ^{51}Cr foram distribuídos nos pocinhos de reação e controles. Após centrifugação a 800 rpm por 5 minutos, a placa foi incubada por 4 h em estufa úmida a 37° e 5% CO_2 . A seguir, a placa foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm e 100 μL do sobrenadante foram transferidos para tubos plásticos. A leitura foi realizada em contador gama e os resultados expressos em porcentagem de lise específica.

$$\text{Porcentagem de lise específica} = \frac{\text{lise teste} - \text{lise espontânea}}{\text{lise máx.} - \text{lise espontânea}} \times 100$$

Os resultados foram obtidos nas proporções de células efectoras/células alvo 50:1, 25:1, 12,5:1 e 6,75:1. Para a expressão dos resultados e comparação entre os grupos, a atividade lítica das células NK foi expressa na proporção 50:1.

11. Análise estatística

Para verificar a ocorrência de diferenças significativas entre os grupos estudados foi utilizada análise de variância (ANOVA). Nos casos em que houve diferença significativa, o teste de Tukey foi utilizado para testar as diferenças mínimas existentes entre todos os grupos. Em todas as medidas o α foi de 5% bicaudal ($P < 0,05$).

RESULTADOS



1. Efeito do pós-tratamento com o extrato da alga *Chlorella vulgaris* (ECV) sobre a cultura clonal de precursores hematopoéticos da medula óssea

Os efeitos do tratamento com o ECV administrado simultaneamente ou após a exposição ao chumbo sobre o número de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) foram avaliados. Como podemos observar, a *C. vulgaris* foi eficaz tanto no tratamento profilático como terapêutico de animais expostos ao chumbo.

Os resultados representados na figura 1 A e B, tabela 5 (apêndice) demonstraram que tanto a exposição ao chumbo como a infecção com *L. monocytogenes* nas 48 e 72 horas, quando avaliados separadamente, causaram uma redução significativa no número de CFU-GM em relação ao controle ($P < 0,05$). O comprometimento da resposta mielopoética foi ainda maior quando os animais foram expostos ao chumbo e infectados, pois o número de CFU-GM observado nestes grupos foi estatisticamente menor em relação ao grupo de animais apenas infectados, nos três períodos estudados (24, 48 e 72 h) ($P < 0,05$). É interessante observar nesta figura, que o tratamento com o ECV normalizou os níveis de CFU-GM no grupo de animais expostos ao chumbo e infectados/expostos ao chumbo.

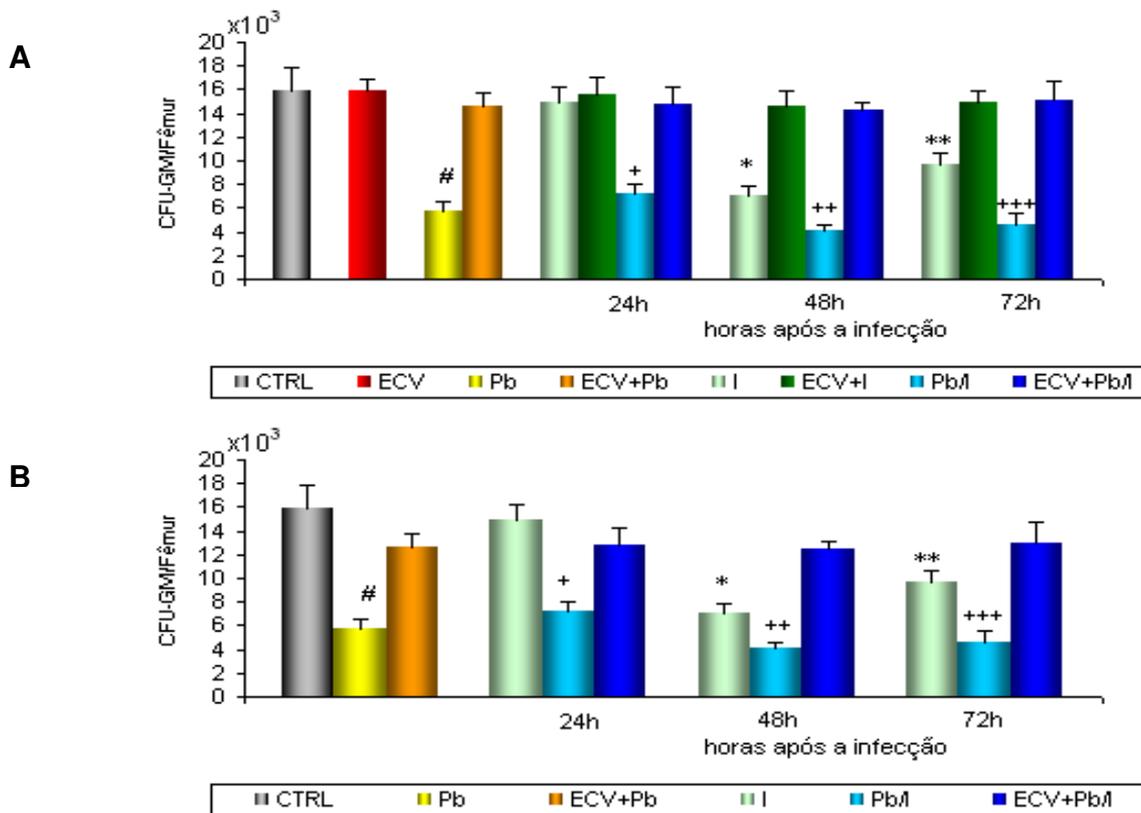


Figura 1: Estudo dos efeitos do ECV sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c expostos ao chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *L. monocytogenes* (5×10^3 bactérias/mL). **A.** O tratamento com o ECV iniciou-se simultaneamente a exposição ao chumbo. **B.** O tratamento com o ECV iniciou-se 24 horas após a administração do chumbo. Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. Resultados expressos como médias \pm DP de 6 animais por grupo. # $P < 0,05$ em relação ao CTRL e ECV+Pb; + $P < 0,05$ em relação ao CTRL, I 24 e ECV+Pb/I 24; * $P < 0,05$ em relação ao CTRL e I 24 e Pb/I 48; ++ $P < 0,05$ em relação CTRL, Pb/I 24 e ECV+Pb/I 48; ** $P < 0,05$ em relação ao CTRL, I 24, Pb/I 72; +++ $P < 0,05$ em relação ao CTRL, Pb/I 24 e ECV+Pb/I 72. ANOVA; teste de Tukey.

2. Efeito do tratamento com o extrato da alga *Chlorella vulgaris* (ECV) sobre a cultura líquida de longa duração de células precursoras hematopoéticas (LTBMC)

Com estes experimentos avaliamos o efeito do extrato de *Chlorella vulgaris* (ECV) sobre o estabelecimento do estroma hematopoético em animais expostos ao chumbo, infectados e infectados/expostos ao chumbo. Estromas densos e confluentes, capazes de manter a proliferação de células da medula óssea por um longo período, foram observados após a 3^a semana de incubação das culturas correspondentes aos animais controle (figura 2) e tratados com o ECV. As culturas foram mantidas por um período de 9 semanas, quando um declínio acentuado no número de células viáveis do sobrenadante foi observado, resultados estes consistentes com a literatura (SPOONCER et al., 1993).

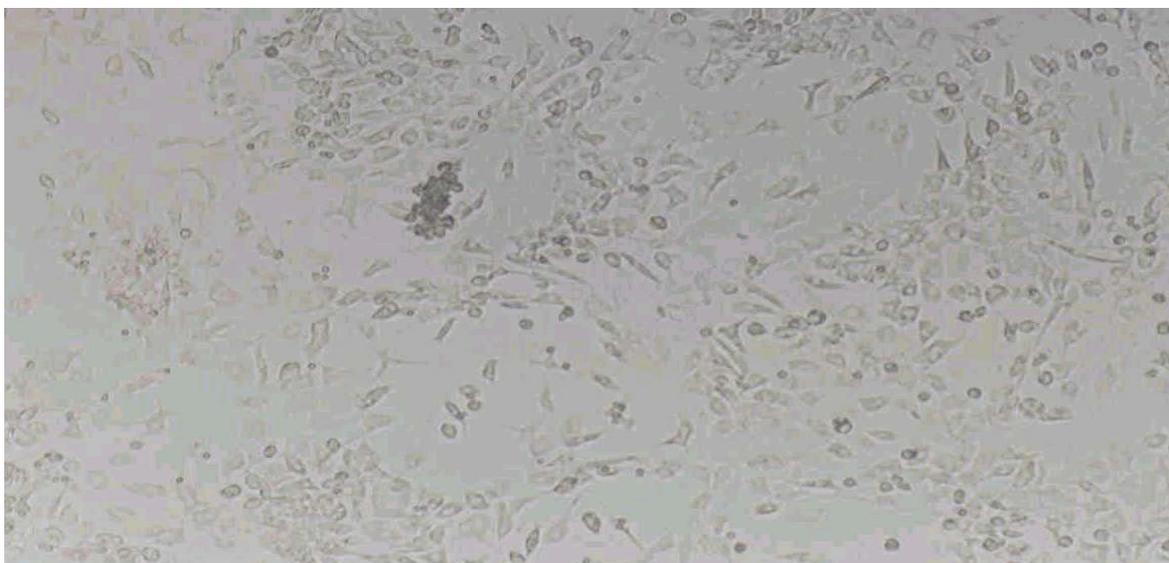


Figura 2: Aspecto microscópico de cultura de longa duração de células hematopoéticas da medula óssea de camundongos BALB/c controles após 3 semanas (X200).

Os resultados obtidos para a contagem semanal de células viáveis não aderentes presentes no sobrenadante das culturas até a 9ª semana estão apresentados na tabela 1. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas neste parâmetro entre os grupos. Da mesma forma, a contagem das células aderentes, coletadas de cada frasco de cultura ao final do experimento, foi similar para todos os grupos estudados (tabela 2).

Tabela 1: Número de células não aderentes viáveis coletadas semanalmente de culturas líquidas de longa duração de células da medula óssea^a.

Parâmetros x 10 ⁵								
Semana	Controle	ECV	Pb	ECV+Pb	I	ECV/I	Pb/I	ECV/Pb/I
1	45	46	44	49	40	43	40	47
2	33	36	30	36	30	39	32	37
3	15	14	15	12	11	17	16	15
4	09	09	10	07	07	12	10	09
5	44	46	43	42	45	47	39	44
6	15	14	08	13	11	16	09	14
7	11	09	08	10	06	13	05	10
8	09	08	04	10	03	10	03	11
9	08	08	03	07	03	09	02	09

^a As culturas foram repopuladas na 4ª semana. Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção com *L. monocytogenes*.

Tabela 2: Número total de células aderentes viáveis coletadas dos frascos das culturas de longa duração de células da medula óssea após 9 semanas de incubação^a.

Parâmetros x 10 ⁵								
n	Controle	ECV	Pb	ECV+Pb	I	ECV/I	Pb/I	ECV/Pb/I
1	5	4	3	3	5	3	4	2
2	4	4	1	4	2	4	2	3
3	4	4	2	2	2	5	3	4
4	2	3	4	4	4	3	2	3
5	2	1	3	5	2	2	3	4
média	3,4	3,2	2,6	3,6	3	3,4	2,8	3,2
DP	1,342	1,304	1,140	1,140	1,414	1,140	0,837	0,836

^a Os animais foram infectados sacrificados 48 horas após a infecção com *L. monocytogenes*.

Os resultados obtidos nos ensaios de cultura clonal realizados com as células não aderentes estão apresentados na figura 3 e tabela 3.

Como podemos observar as células derivadas da medula óssea de animais tratados com o ECV mantiveram a produção de progenitores comprometidos com a linhagem mielóide (CFU-GM), embora com uma capacidade limitada de auto-duplicação. Por outro lado, uma intensa diminuição no potencial clonogênico da LT BMC contendo estroma derivado de células de animais expostos ao chumbo, infectados e infectados/expostos ao chumbo ($P < 0,05$) foi observado desde a 5ª semana. É interessante destacar que o tratamento com o ECV produziu uma recuperação no potencial clonogênico das culturas derivadas de animais submetidos a esses mesmos protocolos experimentais de infecção e exposição ao chumbo ($P < 0,05$).

Além disso, estes achados corroboram com a observação de várias áreas ricas em células hematopoéticas primitivas (“cobblestone”) nas culturas de animais tratados com o ECV, mesmo após um longo período de incubação (9 semanas). Este efeito também foi evidente ao compararmos as culturas dos grupos de animais infectados e/ou expostos ao chumbo que receberam o ECV com seus respectivos controles ($P < 0,05$). Estas áreas são a origem da produção prolongada das células hematopoéticas (SPOONCER et al., 1993), e seu desenvolvimento foi drasticamente inibido pela exposição ao chumbo e/ou à infecção.

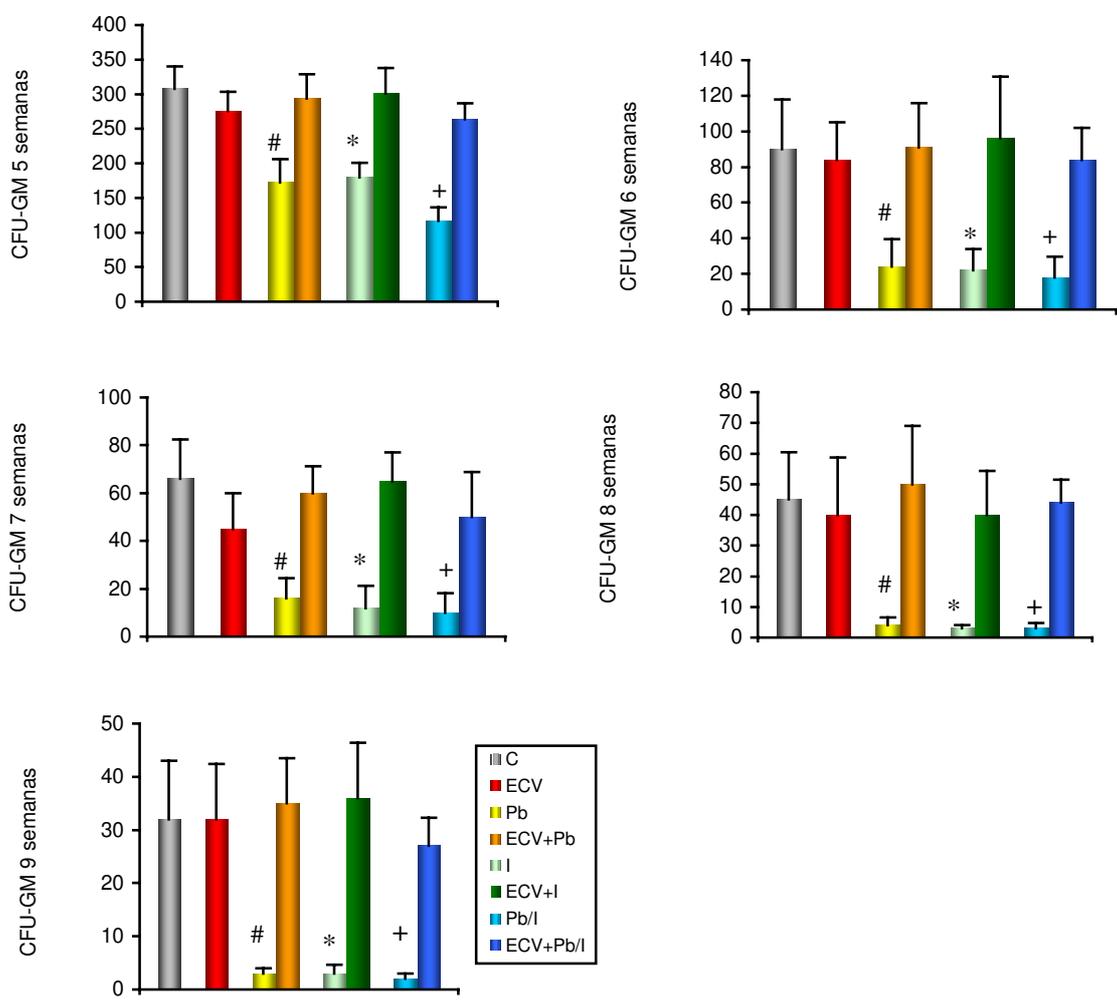


Figura 3: Número total de progenitores de granulócitos macrófagos (CFU-GM) na suspensão de células não aderentes das culturas de longa duração de células hematopoiéticas da medula óssea de camundongos BALB/c expostos ao chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e tratados simultaneamente com 50 mg/kg do extrato de *Chlorella vulgaris* (ECV). Ao término deste período, os animais foram infectados com uma dose subletal de 5×10^3 bactérias/mL de *L. monocytogenes* e sacrificados 48 horas após a infecção. Os resultados foram expressos como média \pm DP da triplicata e representam o número de precursores no “pool” de células da suspensão coletada de 5 frascos de cultura. #P<0,05 em relação ao controle e ECV+Pb; *P<0,05 em relação ao controle e ECV+I; +P<0,05 em relação ao controle e ECV+Pb/I.

Tabela 3: Cultura clonal de precursores hematopoéticos realizadas com as células não aderentes viáveis coletadas semanalmente de culturas líquidas de longa duração de células da medula óssea.

Semana	Controle	ECV	Pb	ECV+Pb	I	ECV/I	Pb/I	ECV/Pb/ I
5	308	276	172	294	180	301	117	264
6	90	84	24	91	22	96	18	84
7	66	45	16	60	12	65	10	50
8	45	40	04	50	03	40	03	44
9	32	32	03	35	03	36	02	27

Resultados representam a média \pm DP da triplicata.

3. Efeitos do tratamento com o extrato da alga *Chlorella vulgaris* (ECV) sobre os níveis de chumbo no sangue

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na tabela 4. Para a quantificação dos níveis de chumbo no sangue, o ECV foi administrado simultaneamente ou após a exposição ao chumbo. Nesta tabela, podemos observar uma redução nos níveis de chumbo do sangue dos animais que receberam o tratamento simultâneo com o ECV (34%). Nos grupos de animais que receberam pós-tratamento de 3 ou 10 dias com o ECV observamos uma redução de 13,5 e 17,5% respectivamente.

Tabela 4: Alterações nos níveis de chumbo sanguíneos de camundongos BALB/c expostos ao chumbo e tratados com ECV. Os animais foram tratados durante 10 dias consecutivos com o ECV simultaneamente a exposição ao chumbo, e por 3 e 10 dias após a exposição por 10 dias ao chumbo.

Nível de Chumbo no sangue ($\mu\text{g}/\%$)					
ECV+Pb (Simultâneo)		ECV+Pb (10 dias)		ECV+Pb (3 dias)	
Pb	ECV+Pb	Pb	ECV+Pb	Pb	ECV+Pb
106	70	40	33	52	45
Redução = 34%		Redução = 17,5%		Redução = 13,5%	

4. Efeito do tratamento com o extrato da alga *Chlorella vulgaris* (ECV) sobre a proliferação de linfócitos

Os efeitos da administração de 50 mg/kg do ECV por 10 dias consecutivos na capacidade proliferativa de linfócitos provenientes do baço de animais expostos ao chumbo, infectados e infectados/expostos ao chumbo estão apresentados na figura 4, tabela 6 (apêndice). O tratamento com o ECV de animais normais não produziu alterações na proliferação de linfócitos, quando comparado com o controle. Da mesma maneira, nenhum efeito foi observado devido à infecção dos animais com *L. monocytogenes*. Por outro lado, um aumento estatisticamente significativo ($P < 0,05$) na resposta proliferativa das células esplênicas à concanavalina A foi obtido para os grupos de animais expostos ao chumbo, infectados ou não. Entretanto, uma reversão deste efeito foi observada quando estes animais foram previamente tratados com o ECV, uma vez que a resposta ao estímulo foi similar a dos controles.

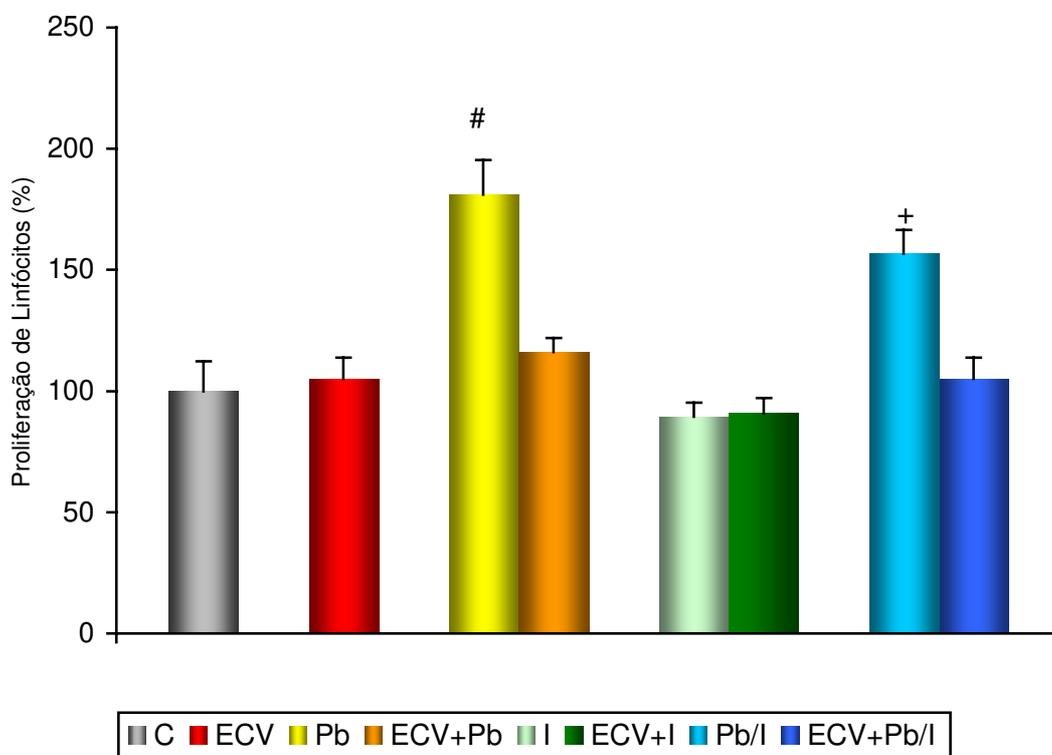


Figura 4: Estudo dos efeitos do ECV sobre a capacidade proliferativa de linfócitos de camundongos BALB/c expostos ao chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e tratados simultaneamente com 50 mg/kg do extrato de *Chlorella vulgaris* (ECV). Ao término deste período, os animais foram infectados com uma dose subletal de 5×10^3 bactérias/mL de *L. monocytogenes* e sacrificados 48 horas após a infecção. Resultados expressos como médias \pm DP de 6 animais por grupo. # $P < 0,05$ em relação ao controle e ECV+Pb; + $P < 0,05$ em relação ao controle e ECV+Pb/I. ANOVA; teste de Tukey.

5. Efeito do tratamento com o extrato da alga *Chlorella vulgaris* (ECV) sobre a produção de citocinas

O efeito da alga *C. vulgaris* sobre a produção das citocinas IL-1 α , IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α foi avaliado em culturas de células de baço, obtidos dos camundongos dos diferentes grupos experimentais, estimuladas com Con A por 48 horas.

5.1. Determinação de IL-1 α no sobrenadante de culturas de células esplênicas de camundongos tratados com ECV

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na figura 5, tabela 7 (apêndice). O tratamento de animais normais com o ECV produziu um aumento estatisticamente significativo nos níveis de IL-1 α em relação ao controle ($P < 0,05$). Nos grupos de animais expostos ao chumbo e infectados/expostos ao chumbo observou-se uma redução estatisticamente significativa nos níveis desta citocina, em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). Porém, quando os animais foram submetidos ao tratamento com o ECV, níveis normais desta citocina foram detectados no sobrenadante das culturas. No grupo de animais infectados, um aumento pronunciado na secreção desta citocina foi observado quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$). O tratamento desses animais com o ECV estimulou a produção de IL-1 α pelas células do baço, pois um aumento estatisticamente significativo desta citocina, em relação ao grupo apenas infectado ($P < 0,05$) foi determinado após 48 h de cultura na presença de Con A.

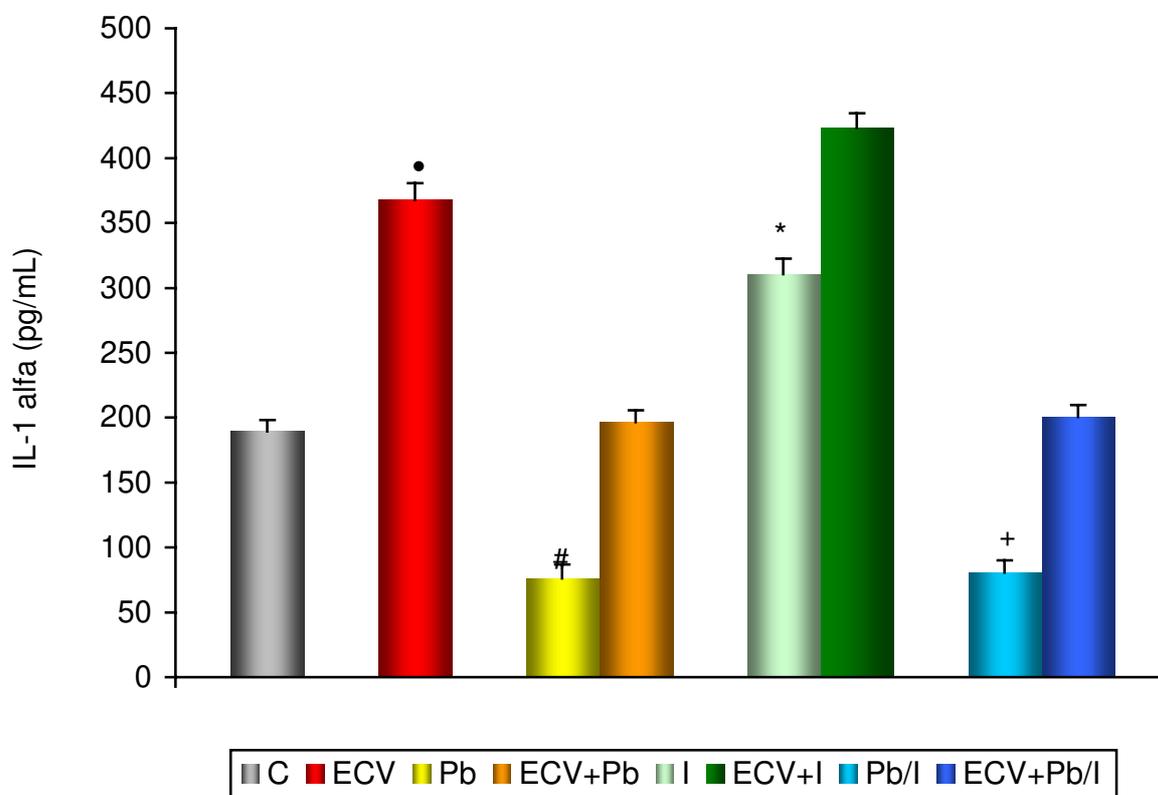


Figura 5: Análise quantitativa de IL-1 α no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A. Camundongos BALB/c foram expostos ao chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e tratados simultaneamente com 50 mg/kg do extrato de *Chlorella vulgaris* (ECV). Ao término deste período, os animais foram infectados com uma dose subletal de 5×10^3 bactérias/mL de *L. monocytogenes* e sacrificados 48 horas após a infecção. Resultados expressos como médias \pm DP de 6 animais por grupo. •P<0,05 em relação ao controle; #P<0,05 em relação ao controle e ECV+Pb; *P<0,05 em relação ao controle, Pb/I e ECV+I; +P<0,05 em relação ao controle e ECV+Pb/I. ANOVA; teste de Tukey.

5.2. Determinação de IL-6 no sobrenadante de culturas de células esplênicas de camundongos tratados com ECV

Os resultados referentes aos efeitos do ECV sobre a produção de IL-6 estão representados na figura 6, tabela 8 (apêndice). O tratamento de animais normais com o ECV não modificou a produção de IL-6. Por outro lado, tanto a exposição ao chumbo como a infecção com *Listeria monocytogenes* causou um aumento estatisticamente significativo na produção desta citocina em relação aos controles ($P < 0,05$), sendo mais pronunciado quando os animais foram submetidos aos dois tratamentos em conjunto ($P < 0,05$, camundongos infectados/expostos ao chumbo x camundongos somente infectados). É interessante ressaltar que a produção desta citocina nos grupos expostos ao chumbo, infectados e infectados/expostos ao chumbo foi significativamente modulada pelo extrato da alga, pois valores similares ao do grupo controle foram determinados na análise dos sobrenadantes das culturas.

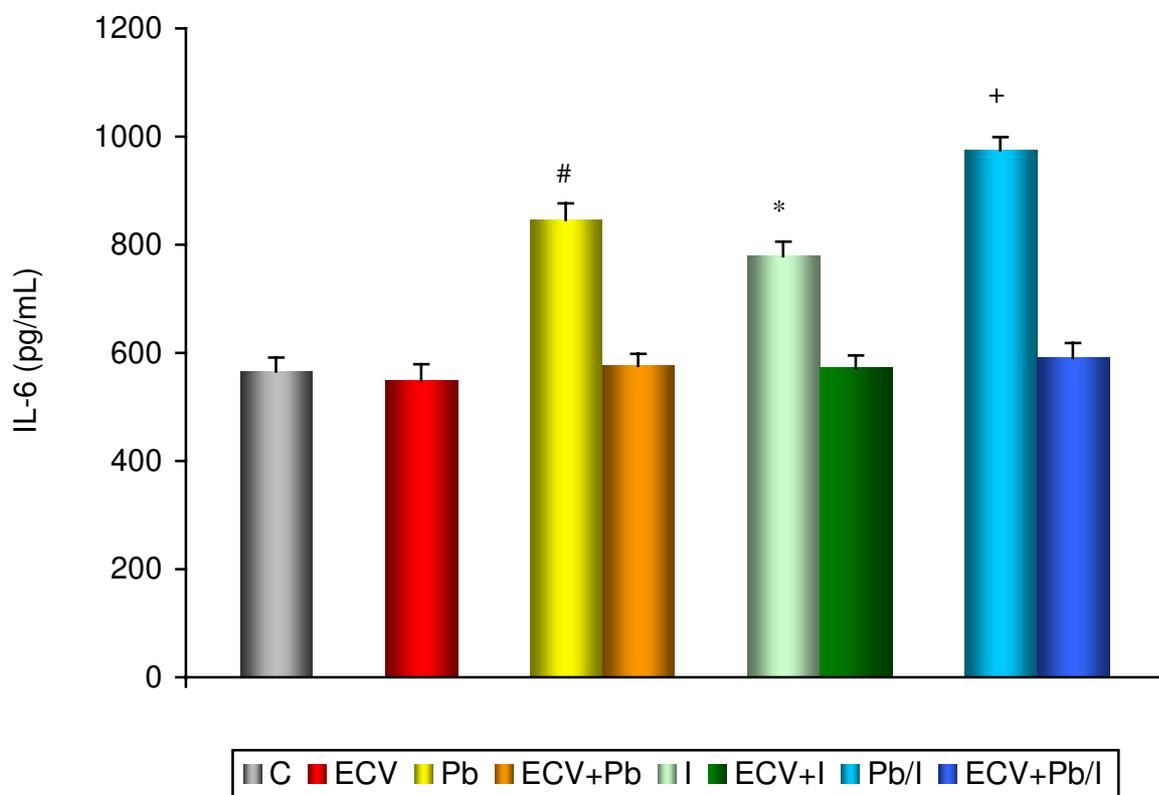


Figura 6: Análise quantitativa de IL-6 no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A. Camundongos BALB/c foram expostos ao chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e tratados simultaneamente com 50 mg/kg do extrato de *Chlorella vulgaris* (ECV). Ao término deste período, os animais foram infectados com uma dose subletal de 5×10^3 bactérias/mL de *L. monocytogenes* e sacrificados 48 horas após a infecção. Resultados expressos como médias \pm DP de 6 animais por grupo. # $P < 0,05$ em relação ao controle e ECV+Pb; * $P < 0,05$ em relação ao controle, Pb/I e ECV+I; + $P < 0,05$ em relação ao controle e ECV+Pb/I. ANOVA; teste de Tukey.

5.3. Determinação de IL-10 no sobrenadante de culturas de células esplênicas de camundongos tratados com ECV

Não observamos nenhuma alteração significativa na dosagem desta citocina no grupo de animais normais tratados com o ECV. Da mesma forma, o grupo de animais infectados não modificou os níveis de IL-10 quando comparado com o controle (Figura 7, tabela 9-apêndice).

Porém, a produção de IL-10 aumentou significativamente nos grupos de animais expostos ao chumbo e infectados/expostos ao chumbo ($P < 0,05$), sendo normalizada para ambos os grupos quando o tratamento com o ECV foi realizado (Figura 9, tabela10-apêndice).

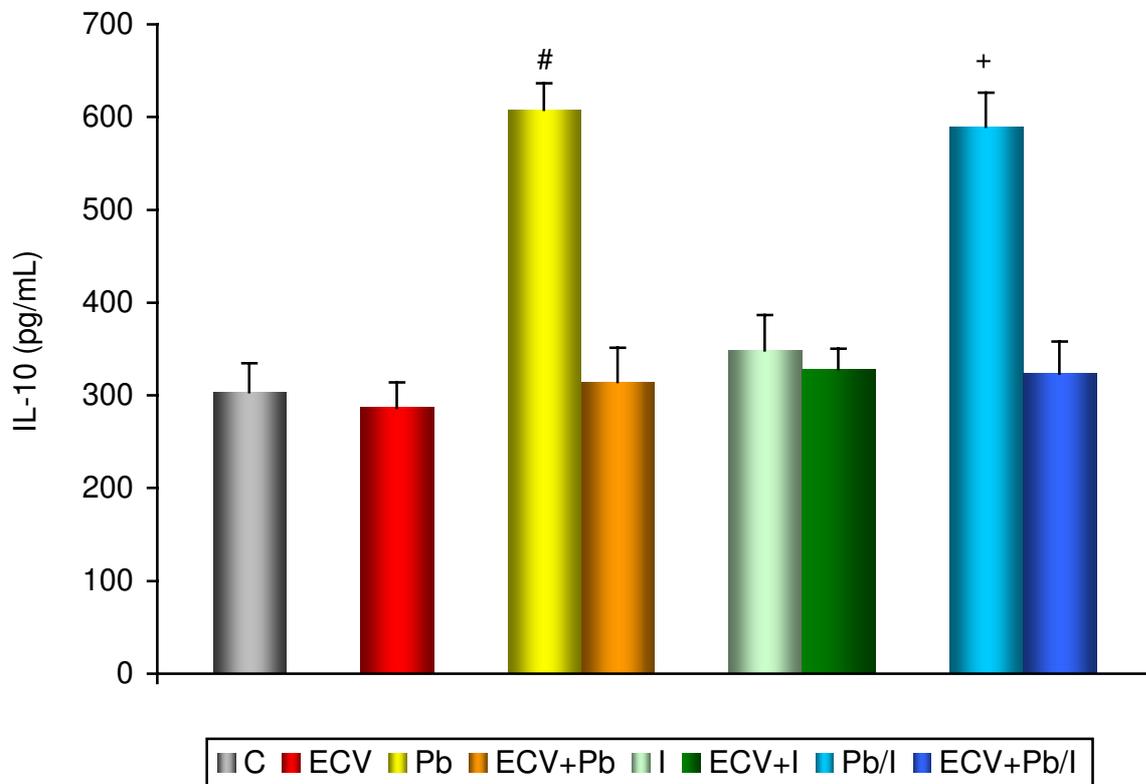


Figura 7: Análise quantitativa de IL-10 no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A. Camundongos BALB/c foram expostos ao chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e tratados simultaneamente com 50 mg/kg do extrato de *Chlorella vulgaris* (ECV). Ao término deste período, os animais foram infectados com uma dose subletal de 5×10^3 bactérias/mL de *L. monocytogenes* e sacrificados 48 horas após a infecção. Resultados expressos como médias \pm DP de 6 animais por grupo. # $P < 0,05$ em relação ao controle e ECV+Pb; + $P < 0,05$ em relação ao controle e ECV+Pb/I. ANOVA; teste de Tukey.

5.4. Determinação de IFN- γ no sobrenadante de culturas de células esplênicas de camundongos tratados com ECV

A avaliação da produção de IFN- γ foi realizada no sobrenadante de culturas de células esplênicas estimuladas com Con A por 48 horas. Os resultados estão representados na figura 8, tabela 10 (apêndice). O tratamento de animais normais com o ECV não modificou a produção de IFN- γ , quando comparado aos controles. No grupo de animais expostos ao chumbo e infectados/expostos ao chumbo observou-se uma redução estatisticamente significativa nos níveis desta citocina, em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). Quando esses animais foram submetidos ao tratamento com o ECV houve uma recuperação dos níveis desta citocina, atingindo valores normais. No grupo de animais infectados, um aumento pronunciado na liberação desta citocina foi observado quando comparado aos controles ($P < 0,05$). Neste grupo o tratamento com o ECV potencializou a produção de IFN- γ , que foi estatisticamente superior a do grupo apenas infectado ($P < 0,05$).

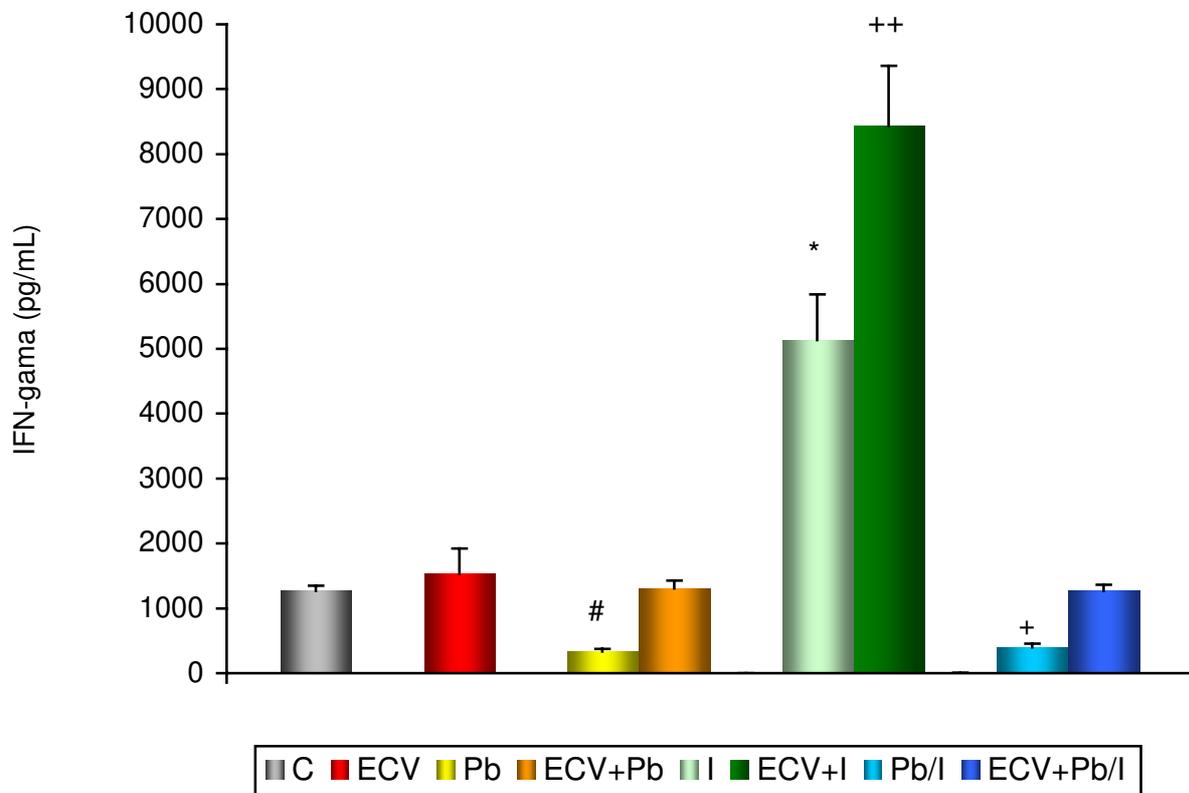


Figura 8: Análise quantitativa de IFN- γ no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A. Camundongos BALB/c foram expostos ao chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e tratados simultaneamente com 50 mg/kg do extrato de *Chlorella vulgaris* (ECV). Ao término deste período, os animais foram infectados com uma dose subletal de 5×10^3 bactérias/mL de *L. monocytogenes* e sacrificados 48 horas após a infecção. Resultados expressos como médias \pm DP de 6 animais por grupo. # $P < 0,05$ em relação ao controle e ECV+Pb; * $P < 0,05$ em relação ao controle, Pb/I e ECV+I; ++ $P < 0,05$ em relação ao controle; + $P < 0,05$ em relação ao controle e ECV+Pb/I. ANOVA; teste de Tukey.

5.5. Determinação de TNF- α no sobrenadante de culturas de células esplênicas de camundongos tratados com ECV

Os resultados referentes às dosagens de TNF- α estão apresentados na figura 9, tabela 11 (apêndice). Nesta avaliação, observamos um aumento estatisticamente significativo na produção de TNF- α em relação ao controle, tanto no grupo de animais normais tratados com o ECV como no grupo infectado com *Listeria monocytogenes* ($P < 0,05$). Este aumento foi ainda mais evidente quando animais infectados com a bactéria foram previamente tratados com o ECV ($P < 0,05$).

No grupo de animais expostos ao chumbo, infectados ou não, uma redução estatisticamente significativa nos níveis dessa citocina foi observada, quando comparada ao controle ($P < 0,05$). Entretanto, o tratamento com o ECV produziu níveis normais desta citocina no sobrenadante das culturas referentes aos grupos de animais expostos ao chumbo e infectados/expostos ao chumbo.

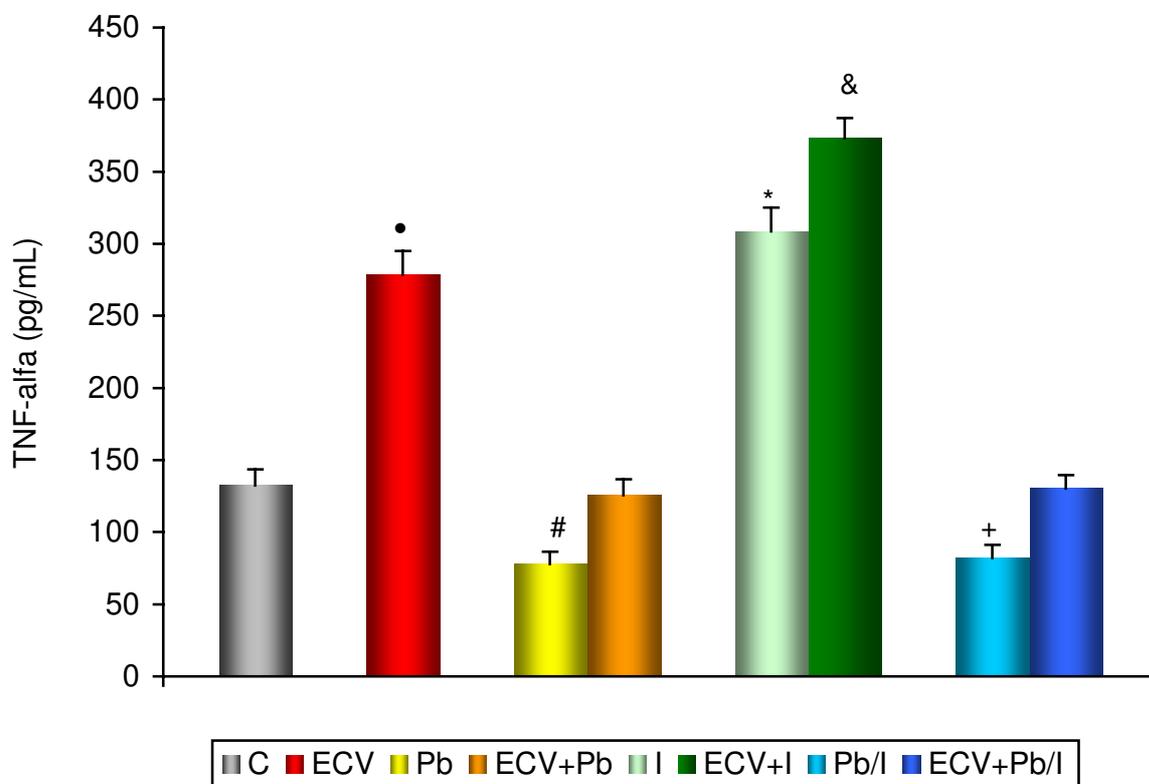


Figura 9: Análise quantitativa de TNF- α no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A. Camundongos BALB/c foram expostos ao chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e tratados simultaneamente com 50 mg/kg do extrato de *Chlorella vulgaris* (ECV). Ao término deste período, os animais foram infectados com uma dose subletal de 5×10^3 bactérias/mL de *L. monocytogenes* e sacrificados 48 horas após a infecção. Resultados expressos como médias \pm DP de 6 animais por grupo. •P<0,05 em relação ao controle; #P<0,05 em relação ao controle e ECV+Pb; *P<0,05 em relação ao controle, Pb/I e ECV+I; &P<0,05 em relação ao controle; +P<0,05 em relação ao controle e ECV+Pb/I. ANOVA; teste de Tukey.

6. Efeitos do tratamento com o extrato da alga *Chlorella vulgaris* (ECV) na resistência de animais infectados com *Listeria monocytogenes*

A análise dos resultados apresentados na figura 10 com camundongos C57BL/6 resistentes a *L. monocytogenes* demonstraram uma sobrevivência de 100%. Conforme esperado para a dose utilizada, nenhuma sobrevivência foi observada quando os camundongos C57BL/6 com deficiência funcional do gene para IFN- γ foram infectados. Além disso, o tratamento com o ECV não protegeu estes animais do efeito letal da bactéria.

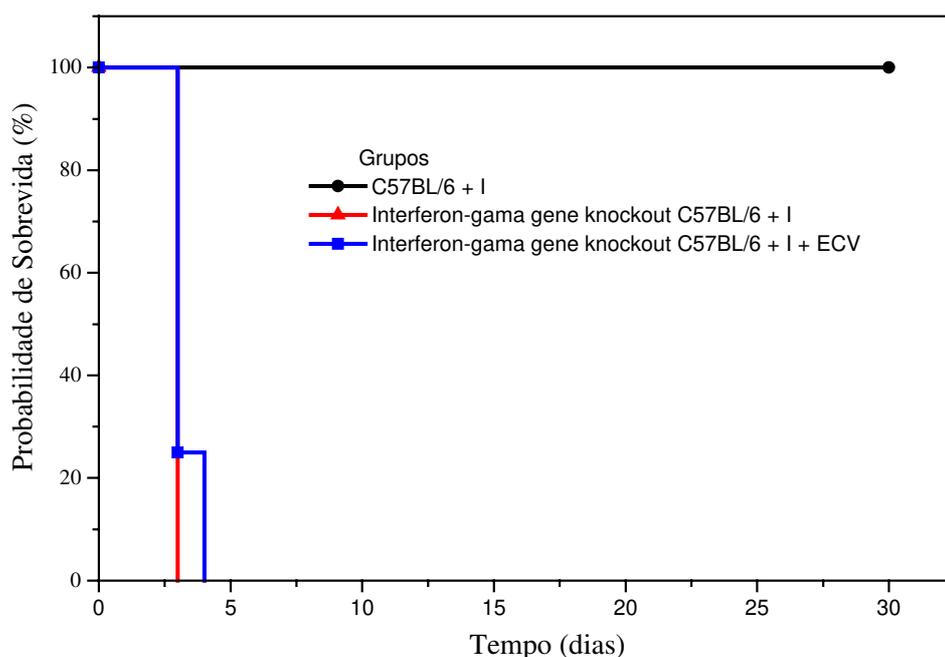
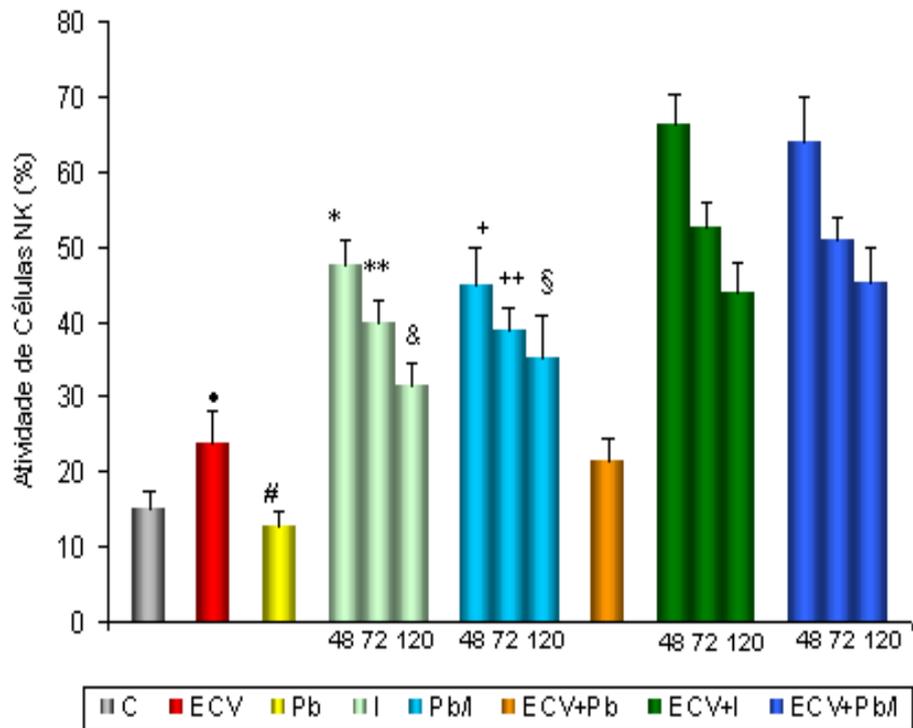


Figura 10: Avaliação dos efeitos do ECV em camundongos C57BL/6 com deficiência funcional do gene para IFN- γ . Os animais foram tratados durante 10 dias consecutivos com 50mg/Kg do ECV e após este período foram infectados com uma dose letal de *L. monocytogenes*. Os animais foram observados por um período de 30 dias.

7. Efeitos do tratamento com o extrato da alga *Chlorella vulgaris* (ECV) sobre a atividade das células natural killer (NK)

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na figura 11, tabela 12 (apêndice). Nesta figura, podemos observar que o tratamento de animais normais com o ECV produziu um aumento significativo na atividade das células NK em relação ao controle ($P < 0,05$) sendo consistente com os trabalhos anteriores (DANTAS e QUEIROZ, 1999). Por outro lado, a exposição ao chumbo não produziu nenhuma alteração significativa na atividade dessas células, quando comparado ao controle. Porém o tratamento com o ECV aumentou significativamente a citotoxicidade dessas células em relação ao grupo apenas exposto ao chumbo ($P < 0,05$). Um aumento na atividade das células NK foi obtido para os grupos de animais apenas infectados e infectados/expostos ao chumbo, nos três períodos estudados (48, 72 e 120 h), sendo que o pico máximo da atividade citotóxica dessas células foi obtido após 48 horas da infecção ($P < 0,05$). Nos grupos de animais infectados e infectados/expostos ao chumbo o tratamento com o ECV potencializou a atividade das células NK, pois observamos um aumento na atividade das mesmas em relação aos grupos apenas infectados e infectados/expostos ao chumbo respectivamente ($P < 0,05$).



I

Figura 11: Estudo dos efeitos do ECV sobre a atividade das células natural killer (NK) de camundongos BALB/c expostos ao chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e tratados simultaneamente com 50mg/kg do extrato de *Chlorella vulgaris* (ECV). Ao término deste período, os animais foram infectados com uma dose subletal de 5×10^3 bactérias/mL de *L. monocytogenes* e sacrificados 48, 72 e 120 horas após a infecção. Resultados expressos como médias \pm DP de 6 animais por grupo. •P<0,05 em relação ao CTRL; # P<0,05 em relação ao ECV+Pb; * P<0,05 em relação ao CTRL e ECV+I 48; ** P<0,05 em relação ao CTRL e ECV+I 72; & P<0,05 em relação ao CTRL, I 48, I 72 e ECV+I 120; + P<0,05 em relação ao CTRL, ECV+Pb/I 48; ++ P<0,05 em relação ao CTRL e ECV+Pb/I 72; § P<0,05 em relação ao CTRL, Pb/I 48, Pb/I 72 e ECV+Pb/I 120. ANOVA; teste de Tukey.

DISCUSSÃO



Estudos recentes realizados em nosso laboratório demonstraram que o extrato da alga *Chlorella vulgaris* (ECV) exerce uma ação quelante em animais expostos ao chumbo, assim como uma atividade estimuladora do sistema hematopoético, deixando evidente a capacidade desta alga de reduzir a toxicidade medular induzida pelo chumbo e de aumentar a resistência dos animais à infecção com *Listeria monocytogenes* (QUEIROZ et al., 2003). A capacidade do ECV de reverter a mielossupressão induzida pelo chumbo foi observada quando o extrato foi administrado simultaneamente ou imediatamente após a exposição ao metal. Esta proteção foi demonstrada através do aumento no número de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea, dos animais tratados com ECV. Esses resultados sugerem um efeito profilático e também terapêutico da alga *C. vulgaris* na intoxicação pelo chumbo (QUEIROZ et al., 2003). A importância do tratamento com ECV ocorrer simultaneamente à exposição ao metal também foi demonstrada pela redução de 34% nos níveis plasmáticos de metal quando o ECV foi administrado simultaneamente ao chumbo, enquanto que uma redução de 17,5% foi observada quando a alga foi administrada após a exposição ao metal. Estes achados indicam que a propriedade quelante desta alga contribui para a capacidade do ECV de reverter à imunossupressão induzida pelo chumbo, reduzindo os níveis do metal no sangue.

O mecanismo pelo qual a *C. vulgaris* promove a captação do metal pode ser atribuído, pelo menos em parte, à presença de grupamentos sulfidríla em sua composição. A esse respeito, WONG et al. (1997) demonstraram que após exposição ao chumbo, a parede celular desta alga sofre uma rápida deterioração

devido ao acúmulo desse metal nos cloroplastos, demonstrado pela distensão do retículo endoplasmático e aumento da espessura da mitocôndria, conforme mostrado na figura 12.

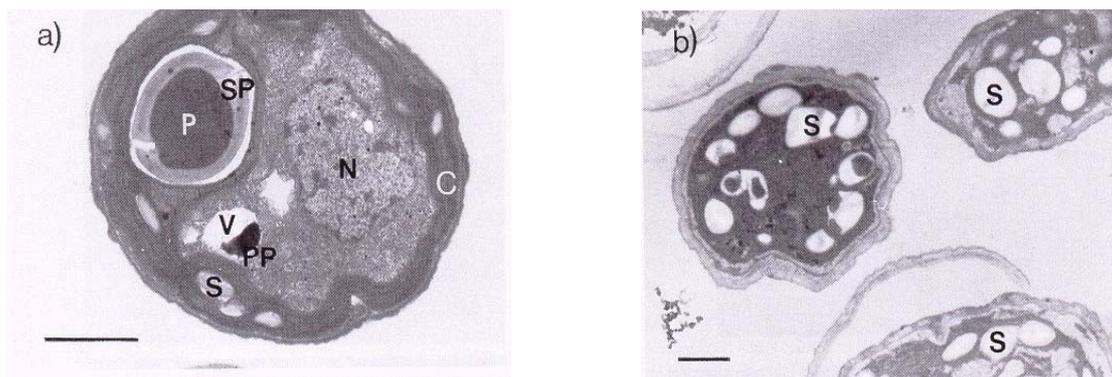


Figura 12: Aspecto microscópico da alga *Chlorella* ilustrando a deterioração da parede celular após exposição ao chumbo. a) controle b) após exposição ao metal. C, cloroplasto; N, núcleo; P, pirenóide; PP, polifosfato; S, grãos-de-amido; SP, estrutura delgada de amido; V, vacúolo (WONG et al., 1997).

A ação mielotóxica do chumbo sobre os radicais sulfidríla interfere nos processos fisiológicos celulares. A integridade dos grupamentos sulfidríla é fundamental para a manutenção de inúmeras funções da membrana celular tais como secreção, fagocitose, transporte, comunicação intercelular e transdução de sinal. Essas atividades dependem de interações entre ligantes e receptores ricos em grupamentos sulfidríla, localizados na membrana celular, os quais são extremamente sensíveis a substâncias tóxicas com afinidade por radicais sulfidríla (PFEIFER e IRONS, 1985; SALGADO, 1996). A habilidade do chumbo de interagir diretamente com grupamentos sulfidríla através de ligações covalentes também compromete as células hematopoéticas, que dependem de interações

celulares com o microambiente indutivo formado pelo estroma medular para manterem seu crescimento e diferenciação em equilíbrio (SALGADO, 1996). Os resultados empregando-se a cultura líquida de longa duração de células precursoras hematopoéticas (LTBMC) demonstraram uma intensa redução do potencial clonogênico em culturas contendo estroma derivado de células da medula óssea de animais expostos ao chumbo, a qual foi observada a partir da 5^a semana de cultura. Além disso, poucas áreas de hematopoese ativa (“cobblestone”) foram observadas nessas culturas. O extrato da alga foi capaz de reverter este efeito em todos os grupos estudados. Observamos também um aumento significativo nos sítios ativos de hematopoese no estroma das culturas de células provenientes dos animais tratados com ECV. Estes achados confirmam a capacidade do ECV de modular a mielopoese, estimulando o crescimento e diferenciação de células precursoras hematopoéticas e também atuando sobre o microambiente hematopoético envolvido na regulação da maturação das células-tronco (VACEK et al., 1990).

Além das interações célula-célula existentes entre os precursores hematopoéticos e o estroma medular, inúmeras glicoproteínas solúveis controlam a mitose e a diferenciação de células hematopoéticas (ANJOS et al., 2000). Dentre os vários fatores envolvidos no controle da hematopoese, a IL-6 possui uma função crítica na geração e manutenção da mielopoese em culturas líquidas de longa duração de células da medula óssea (HAUSER et al., 1997). Além disso, evidências da literatura sugerem que a IL-6 em associação com os fatores estimuladores de colônias e as citocinas IL-1 e IL-3 são fundamentais na regulação da atividade funcional das células hematopoéticas primitivas (MUENCH

et al., 1992), sendo que a IL-6 é considerada um fator de sobrevivência para as células progenitoras mais jovens (células-tronco) (BERNAD et al., 1994). Nossos resultados sobre a produção de IL-6 demonstraram que tanto a exposição ao chumbo como a infecção com *L. monocytogenes*, quando avaliados separadamente, causaram um aumento nos níveis dessa citocina em relação aos controles. A infecção dos animais previamente expostos ao chumbo produziu um aumento ainda mais pronunciado nos níveis dessa citocina. Este efeito estaria associado ao estresse induzido pela ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra a infecção (KISHIKAWA e LAWRENCE, 1998; KIM e LAWRENCE, 2000). A IL-6 é considerada uma das principais citocinas envolvidas no aumento dos níveis de glicocorticóides (STRATAKIS e CHROUSOS, 1995; TURNBULL e RIVIER, 1999; DUNN, 2000) e, recentemente, demonstrou-se a capacidade da *C. vulgaris* de suprimir a elevação nos níveis de corticosteróide após o estresse psicológico (HASEGAWA et al., 2000). É interessante observar que nossos experimentos demonstraram que os aumentos produzidos nos níveis de IL-6 decorrentes da infecção e da exposição ao chumbo foram normalizados com o tratamento com ECV. Vários autores têm demonstrado que a regulação da homeostase do sistema hematopoético e ativação da cascata de eventos envolvidos na amplificação e maturação das várias linhagens celulares comprometidas com a resposta imunológica em situações de estresse e também no processo inflamatório são coordenados por uma intrincada rede de citocinas em conjunto com mediadores neuroendócrinos (TURNBULL e RIVIER, 1999). Neste sentido, as citocinas IL-1 e TNF- α em conjunto com a IL-6, produzidas por

macrófagos ativados, possuem um papel fundamental na regulação da ativação de inúmeros tipos celulares, incluindo as células do estroma, para produção de fatores de crescimento e indução de proliferação e diferenciação das células hematopoéticas. Segundo HASEGAWA et al. (2000), o efeito modulador da *Chlorella* em condições de estresse está relacionado à produção de IL-1 e TNF- α induzida pela alga, as quais inibem a síntese de glicocorticóides (HASEGAWA et al., 2000). Ademais, a IL-1 também reduz a translocação e função dos receptores de glicocorticóides (HASEGAWA et al., 2000).

Outros trabalhos relatam a importância dos efeitos biológicos dessas citocinas no modelo da listeriose (KAUFMANN, 1993; NOMURA et al., 2002), sendo o efeito sinérgico mediado por TNF- α considerado um dos mais importantes, pois além de promover a ativação de células mielomonocíticas (MIELKE et al., 1993), conduz à ativação de células endoteliais, aumentando a expressão de moléculas de adesão vascular e auxiliando no recrutamento rápido de leucócitos ao local da infecção (PORTNOY et al., 1989, 2002). Uma outra citocina importante neste modelo de infecção é a IL-1. Quando liberada no ambiente local, esta citocina afeta inúmeras células. Além de mediar a secreção de quimiocinas e a expressão de integrinas e moléculas de adesão nas células mononucleares e vasculares, a IL-1 possui um papel importante na ativação de linfócitos T. A liberação de IL-1 por macrófagos ativados conduz a uma rápida expansão do clone de células T estimuladas por antígenos, amplificando a fase de apresentação e reconhecimento do antígeno na resposta imune. Além disso, ela parece ser fundamental para a produção de IFN- γ atuando de forma sinérgica

com TNF- α , reforçando desta forma, a resposta pró-inflamatória como um todo (ARAI et al., 1990; BILLIAU, 1996; HUNTER et al., 1997). Ademais, LABOW et al. (1997) demonstraram que a inibição da secreção de IL-1 provoca uma falha na resposta inflamatória, contribuindo para a exacerbação da infecção com *L. monocytogenes*. Nossos resultados corroboram estas informações uma vez que observamos um decréscimo na secreção de IL-1 α e TNF- α no sobrenadante das culturas referentes aos grupos de animais expostos ao chumbo e infectados/expostos ao chumbo, em relação ao grupo controle, enquanto que, um aumento pronunciado foi observado no grupo apenas infectado. DYATLOV e LAWRENCE (2002) também demonstraram que o chumbo potencializa a infecção com essa bactéria em camundongos, pela redução dos níveis de IL-1. Os resultados obtidos referentes aos efeitos produzidos pelo ECV na produção de IL-1 e TNF- α , demonstraram que o extrato da alga produziu um aumento dessas citocinas em animais expostos ao chumbo, infectados ou não. Estes achados concordam com os resultados obtidos por HASEGAWA et al. (1997) utilizando camundongos normais e portadores da Síndrome Murina de Imunodeficiência (MAIDS), ambos infectados com *L. monocytogenes*, os quais demonstraram a capacidade do ECV de aumentar os níveis de IFN- γ , IL-2, IL-1 α e TNF- α .

Um outro aspecto importante é que o chumbo induz um desequilíbrio entre as respostas definidas como tipo Th1 e tipo Th2, havendo um favorecimento da resposta celular do tipo Th2 (HEO et al., 1996). Classicamente, citocinas Th1 incluem IFN- γ , IL-2 e TNF- β , sendo o IFN- γ a citocina que melhor define o subtipo Th1 em termos de propriedades funcionais. Já a produção de IL-4, IL-5, IL-10 e

IL-13 está associada ao perfil Th2. Além disso, a expressão desses dois tipos de citocinas é mutuamente inibida pela diferenciação e funções efetoras do fenótipo recíproco e pode ser modulada por outras citocinas, por exemplo, IL-12. Assim, a IL-12 estimula a produção de IFN- γ , enquanto que a IL-10 inibe seletivamente a síntese de citocinas Th1 (MOSSMAN e SAD, 1996; ALLEN e MAIZELS, 1997). Dentre as alterações induzidas pelo chumbo que favorecem a resposta imunológica do tipo Th2 destaca-se o aumento na produção de IL-10 e IL-4 com consequente diminuição na resistência à *L. monocytogenes* (HEO et al., 1996, 1998; KIM e LAWRENCE, 2000; STOIBER et al., 2001; NOMURA et al., 2002). Nossos resultados confirmam esses achados, visto que observamos um aumento na secreção de IL-10 nos grupos de animais expostos ao chumbo e infectados/expostos ao chumbo, em relação ao grupo controle. Além disso, resultados anteriores demonstraram uma diminuição na resistência dos camundongos expostos ao chumbo à infecção pela *L. monocytogenes* (QUEIROZ et al., 2003). Outros autores também demonstraram maior susceptibilidade a infecções virais e bacterianas associadas ao aumento na produção de IL-4 e IL-10 e diminuição na produção de IFN- γ in vitro e in vivo induzidos pelo chumbo em humanos e roedores (GARNIER, 1974; LAWRENCE, 1981; EWERS et al., 1982; KOWOLENKO et al., 1991; HORIGUCHI et al., 1992). O aumento na secreção de IL-10 apresenta como principais efeitos biológicos supressão da atividade de macrófagos, inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias e indução de proliferação de linfócitos B e de secreção de imunoglobulinas (LILES e VAN VOORHIS, 1995; ABBAS, 2000). Na listeriose, o efeito supressor da IL-10 foi

demonstrado pela inibição da síntese de IL-1, IL-12, IL-6, TNF- α , GM-CSF e IFN- γ (FREI et al., 1993; MIELKE et al., 1993; TRIPP et al., 1993), sendo a produção de IFN- γ indispensável aos eventos que determinam a imunidade adaptativa (MOMBAERTS et al., 1993; DAUGELAT e KAUFMANN, 1996; EDELSON e UNANUE, 2000; WING e GREGORY, 2002). A produção de IL-12 e TNF- α por macrófagos infectados com *L. monocytogenes* estimula as células NK a produzirem IFN- γ , que é fundamental para a ativação das células Th1 (HSIEH et al., 1993; GULERIA e POLLARD, 2001; KIM et al., 2001; STOIBER et al., 2001; NOMURA et al., 2002). Nossos resultados vêm enriquecer estes dados, visto que no grupo de animais expostos ao chumbo, infectados ou não, o tratamento com ECV modulou a produção de IL-10, pois valores similares ao do grupo controle foram determinados na análise dos sobrenadantes das culturas.

Muitos trabalhos demonstram que a expansão da atividade antimicrobiana e citotóxica dos macrófagos em decorrência da produção de IFN- γ é uma etapa fundamental. A produção de IFN- γ por estas células também é responsável por induzir a expressão das moléculas da classe II do complexo de histocompatibilidade principal presentes em macrófagos, favorecendo, desta forma, a apresentação de antígenos às células T específicas (KIM et al., 2001). Nossos resultados corroboram trabalhos da literatura (DAUGELAT et al., 1996; HASEGAWA et al., 1997) e do nosso laboratório (DANTAS et al., 1999), uma vez que observamos uma maior atividade das células NK 48, 72 e 120 horas após a infecção.

A determinação quantitativa de IFN- γ no sobrenadante das culturas de células esplênicas demonstrou uma redução nos níveis de IFN- γ nos grupos de animais expostos ao chumbo e infectados/expostos ao chumbo, em relação ao controle. No grupo de animais infectados, um aumento pronunciado na secreção desta citocina foi observado quando comparado aos controles, concordando com resultados da literatura (QUEIROZ et al, 2002). Os interferons consistem numa grande família de proteínas que não apenas partilham atividade antimicrobiana, mas também tem a capacidade de modular a resposta imunológica, principalmente pela estimulação de macrófagos, mobilização de células NK, ativação da proliferação de linfócitos, além de participar no processo de diferenciação celular (ABBAS, 2000). Estudos sugerem que as alterações induzidas pelo chumbo na síntese de IFN- γ e na ativação de Th1 *versus* Th2 sejam mediadas por um controle genético individual exercido sobre as células T, com uma forte influência sobre as interações célula-célula existentes no processo de ativação das células imunocompetentes (HEO et al., 1996, 1998. KROCOVA et al., 2000). Neste sentido, é interessante destacar que o efeito do chumbo sobre a capacidade da IL-10 de inibir a produção de IFN- γ por células T resulta primariamente da supressão da produção de IL-12 por células acessórias, em particular macrófagos e da inibição da expressão de moléculas co-estimulatórias na sua superfície, bem como modulação da produção dos cofatores TNF- α e IL-1 (TRINCHIERE, 1995; HEO et al., 1998).

A supressão da função de macrófagos pelo chumbo é uma etapa crítica da toxicidade deste metal sobre o sistema imunológico, pois afeta, como

conseqüência, a proliferação de linfócitos (BLAKLEY e ARCHER, 1982; CAO et al., 2003). A atividade linfoproliferativa é um parâmetro clássico de avaliação do potencial de resposta imune celular. Nossos resultados corroboram a hipótese de que o chumbo apresenta efeito supressor sobre os linfócitos Th1, favorecendo a proliferação de linfócitos Th2 (KROCOVA et al., 2000; FLOHE et al., 2002). Com base no exposto, podemos sugerir que um dos efeitos do chumbo sobre a listeriose murina é a supressão do desenvolvimento de uma imunidade celular apropriada, sendo mediado principalmente por um aumento na secreção de IL-10 e uma diminuição na produção de IFN- γ , contribuindo, desta forma, para a diminuição da resistência à *L. monocytogenes* (KOWOLENKO et al., 1991; TIAN e LAWRENCE, 1995; KISHIKAWA et al., 1997; HEO et al., 1998; KIM e LAWRENCE, 2000).

CONCLUSÕES



Desta forma, concluímos que a capacidade da *Chlorella* de induzir uma resposta farmacológica apropriada pelo estímulo da produção endógena de citocinas do perfil Th1: IL1 α , TNF- α e IFN- γ , pode ser considerada útil quando o objetivo é aumentar ou restabelecer os mecanismos de defesa próprios do organismo em situações de exposição ao chumbo. Além de rica fonte alimentar, esta alga possui importante efeito profilático como agente quelante do chumbo e na proteção do organismo contra infecção com *L. monocytogenes*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Cellular and molecular immunology. 4th ed. **W.B. Saunders Company: Philadelphia**, 2000.

ALLEN, J.E.; MAIZELS, R.M. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? **Immunol Today**, 18(8): 387-392, 1997.

ALLEN, T.D.; DEXTER, T.M. The essential cells of the hematopoietic microenvironment. **Exp Hematol**, 12: 517-521, 1984.

ANJOS, A.R.; ALVARES-SILVA, M.; BORELLI, P. Matriz extracelular e leucemia. **Rev Bras Hematol Hemoter**, 22(3): 404-412, 2000.

ARAI, K.I.; LEC, F.; MIYAJIMA, A.; MIYATAKE, S.; ARAI, N.; YOKOTA, T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. **Annu Rev Biochem**, 59: 783-836, 1990.

BANCROFT, G.J.; SCHREIBER, R.D.; BOSMA, G.C.; BOSMA, M.J.; UNANUE, E.R. A T-cell-independent mechanism of macrophage action by interferon- γ . **J Immunol**, 139: 1104-1107, 1987.

BANCROFT, G.J.; SHEEHAN, K.C.F.; SCHREIBER, R.D.; UNANUE, E.R. Tumor necrosis factor is involved in the cell independent pathway of macrophage action in Scid mice. **J Immunol**, 143: 127-130, 1989.

BERNAD, A., KOPF, M., KULBACKI, R., WEICH, N., KOEHLER, G., GUTIERREZ-RAMOS, J.C. Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. **Immunity**, 1: 725-731, 1994.

BILLIAU, A. Interferon- γ : biology and role in pathogenesis. **Adv Immunol**, 62: 61-67, 1996.

BINCOLETTO, C., QUEIROZ, M.L.S. The effect of lead on the bone marrow stem cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Vet Human Toxicol**, 38: 186-190, 1996.

BLAKLEY, B.R.; ARCHER, D.L. Mitogen stimulation of lymphocytes exposed to lead. **Toxicol Appl Pharmacol**, 62: 183-189, 1982.

BROXMEYER, H.E., WILLIAMS, D.E., COOPER, S., SHADDUCK, R.K., GILLIS, S., WAHEED, A., URDAL, D.L., BICKNELL, D.C. Comparative effects in vivo of recombinant murine interleukin-3, natural murine colony-stimulating factor-1, and recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on myelopoiesis in mice. **J Clin Invest**, 79: 721-730, 1987.

BUSCH, D.H.; PAMER, E.G. T lymphocyte dynamics during *Listeria monocytogenes* infection. **Immunol Let**, 65: 93-98, 1999.

CAO, L.; HUDSON, C.A.; LAWRENCE, D.A. Immune changes during acute cold/restraint stress-induced inhibition of host resistance to *Listeria*. **Toxicol Sci**, 74(2): 325-334, 2003.

CARR, H.P., CARIÑO, F.A., YANG, M.S., WONG, M.H. Characterization of the cadmium-binding capacity of *Chlorella vulgaris*. **Bull Environ Toxicol**, 60: 433-440, 1998.

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

DANTAS, D.C.M.; KANENO, R.; QUEIROZ, M.L.S. The effects of *Chlorella vulgaris* in the protection of mice infected with *Listeria monocytogenes*: role of Natural Killer cells. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 21: 609-619, 1999.

DAUGELAT, S.; LADEL, C.H.; FLESCHE, I.E.A.; KAUFMANN, S.H.E. Activation of natural killer cells by heat-killed *Listeria monocytogenes* requires additional signals from lymphoid cells. **Immunol Let**, 50: 81-85, 1996.

DEXTER, T.M. Stromal cell associated hemopoiesis. **J Cell Physiol**, 1: 87-94, 1982.

DEXTER, T.M., ALLEN, T.D., LAJTHA, L.G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. **J Cell Physiol**, 91: 335-344, 1977.

DUNN, A.J. Cytokine activation of the HPA axis. **Ann N Y Acad Sci USA**, 917: 608-617, 2000.

DYATLOV V.A.; LAWRENCE D.A. Neonatal lead exposure potentiates sickness behavior induced by *Listeria monocytogenes* infection of mice. **Brain Behav Immun**, 16(4): 477-492, 2002.

EDELSON, B.T.; UNANUE, E.R. Immunity to *Listeria* infection. **Curr Opin Immunol**, 12(4): 425-431, 2000.

EWERS, U.; STILLER-WINKLER, R.; IDEL, H. Serum immunoglobulin, complement C3, and salivary IgA levels in lead workers. **Environ Res**, 29: 351-357, 1982.

FLOHE, S.B.; BRUGGEMAN, J.; HERDER, C.; GOEBEL, C.; KOLB, H. Enhanced proinflammatory response to endotoxin after of macrophages with lead ions. **J Leukoc Bio**, 71: 417-424, 2002.

FREI, K.D.; NADAL, D.; PFISTER, H.W.; FONTANA, A. *Listeria meningitidis*: identification of a cerebrospinal fluid inhibitor of macrophage listericidal function as interleukin-10. **J Exp Med**, 178: 1255-1261, 1993.

GAINER, J.H. Lead aggravates viral disease and repress the antiviral activity of interferon inducers. **Environ Health Perspect**, 7:113-119, 1974.

GOLDFINE, H.; WADSWORTH, S. J. Macrophage intracellular signaling induced by *Listeria monocytogenes*. **Microbes Infect**, 4: 1335-43, 2002.

GUEST, I.; UETRECHT, J. Bone marrow stem cell protection from chemotherapy by low-molecular-weight compounds. **Exp Hematol**, 29: 123-137, 2001.

GULERIA, I.; POLLARD, J. Aberrant macrophage and neutrophil population dynamics and impaired Th1 response to *Listeria monocytogenes* in colony-stimulating factor 1-deficient mice. **Infect Immun** 69: 1795-1807, 2001.

HAHN, H.; KAUFMANN, S.H.E. The role cell-mediated immunity in bacterial infections. **Rev Infect Dis**, 3: 1221-1250, 1981.

HASEGAWA, T., KIMURA, Y., HIROMATSU, K., KOBAYASHI, N., YAMADA, A., MAKINO, M., OKUDA, M., SANO, T., NOMOTO, K., YOSHIKAI, Y. Effect of hot water extract of *Chlorella vulgaris* on cytokine expression patterns in mice with murine acquired immunodeficiency syndrome after infection with *Listeria monocytogenes*. **Immunopharmacol**, 35: 273-282, 1997.

HASEGAWA, T., NODA, K., KUMAMOTO, S., ANDO, Y., YAMADA, A., YOSHIKAI, Y. *Chlorella vulgaris* culture supernatant (CVS) reduces psychological stress-induced apoptosis in thymocytes of mice. **Int J Immunopharmacol**, 22: 877-885, 2000.

HASEGAWA, T., OKUDA, M., NOMOTO, K., YOSHIKAI, Y. Augmentation of the resistance against *Listeria monocytogenes* by oral administration of a hot water extract of *Chlorella vulgaris* in mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 16: 191-202, 1994.

HASEGAWA, T., TANAKA, K., UENO, K., OKUDA, M., YOSHIKAI, Y., NOMOTO, K. Augmentation of the resistance against *Escherichia coli* by oral administration of a hot water extract of *Chlorella vulgaris* in rats. **Int J Immunopharmacol**, 11: 971-976, 1989.

HASEGAWA, T.; MATSUGUCHI, T.; NODA, K.; TANAKA, K.; KUMAMOTO, S.; SHOYAMA, Y.; YOSHIKAI, Y. Toll-like receptor 2 is at least partly involved in the antitumor activity of glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. **Int Immunopharmacol**, 2: 579-589, 2002.

HASEGAWA, T.; OKUDA, M.; MAKINO, M.; HIROMATSU, K.; NOMOTO, K.; YOSHIKAI, Y. Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduce opportunistic infection with *Listeria monocytogenes* in C57BL/6 mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses. **Int J Immunopharmacol**, 17, 505-512, 1995.

HAUSER, S.P., KAJKENOVA, O., LIPSCHITZ, D.A. The pivotal role of interleukin 6 in formation and function of hematopoietically active murine long-term bone marrow cultures. **Stem Cells**, 15: 125-132, 1997.

HEO, Y., LEE, W.T., LAWRENCE, D.A. Differential effects of lead and camp on development and activities of Th1- and Th2-lymphocytes. **Toxicol Sci**, 43: 172-185, 1998.

HEO, Y., PARSONS, P.J., LAWRENCE, D.A. Lead differentially modifies cytokine production *in vitro* and *in vivo*. **Toxicol Appl Pharmacol**, 138: 149-157, 1996.

HEO, Y.; LEE, W.T.; LAWRENCE, D.A. *In vivo* the environmental pollutants lead and mercury induce oligoclonal T cell responses skewed toward Type-2 reactivities. **Cell Immunol**, 179: 185-195, 1997.

HORIGUCHI, S.; KIYOTA, I.; ENDO, G.; TERAMOTO, K.; SHINAGAWA, K.; WAKITANI, F.; KONISHI, Y.; KIYOTA, A.; OTA, A.. TANAKA, H. Serum immunoglobulin and complement C3 levels in workers exposed to lead. **Osaka City Med J**, 38: 149-153, 1992.

HSIEH, C.S.; MACATONIA, S.E.; TRIPP, C.S.; WOLF, S.F.; O'GARRA, A.; MURPHY, K.M. Development of Th1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. **Science**, 260: 547-549, 1993.

HUNTER, C.A.; GABRIEL, K.E.; RADZANOWSKI, T.; NEYER, L.E.; REMINGTON, J.S. Type I interferons enhance production of IFN- γ by NK cells. **Immunol Letters**, 59: 1-5, 1997.

KAUFMANN, S. H. E. Immunity to intracellular bacteria. **Annu Rev Immunol**, 11: 129-163, 1993.

KIM, D., LAWRENCE, D.A. Immunotoxic effects of inorganic lead on host resistance of mice with different circling behavior preferences. **Brain Behav Immun**, 14: 305-317, 2000.

KIM, D.; REILLY, A.; LAWRENCE, D.A. Relationships between IFN- γ , IL-6, corticosterone, and *Listeria monocytogenes* pathogenesis in BALB/c mice. **Cell Immunol**, 207: 13-18, 2001.

KIM, Y.; PYO, M.; KIM, J. Influence of melatonin on immunotoxicity of lead. **Int J Immunopharmacol**, 22: 821-832, 2000.

KISHIKAWA, H., SONG, R., LAWRENCE, A. Interleukin-12 promoters enhanced resistance to *Listeria monocytogenes* infection of Pb-exposed mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, 147: 180-189, 1997.

KISHIKAWA, H.; LAWRENCE, D.A. Differential production of interleukin-6 in the brain and spleen of mice treated with lipopolysaccharide in the presence and absence of lead. **J Toxicol Environ Health A**, 53: 357-373, 1998.

KONISHI, F., MITSUYAMA, M., OKUDA, M., TANAKA, K., HASEGAWA, T., NOMOTO, K. Protective effect of an acidic glycoprotein obtained from culture of *Chlorella vulgaris* against myelosuppression by 5-fluorouracil. **Cancer Immunol Immunother**, 42: 268-274, 1996.

KONISHI, F., TANAKA, K., HIMENO, K., TANIGUCHI, K., NOMOTO, K. Antitumor effect induced by a hot water extract of *Chlorella vulgaris* (CE): resistance to meth a tumor growth mediated by CE-induced polymorphonuclear leukocytes. **Cancer Immunol Immunother** 19: 73-78, 1985.

KONISHI, F., TANAKA, K., KUMAMOTO S., HASEGAWA, T., OKUDA, M., YANO, Y., YOSHIKAI, Y., NOMOTO, K., Enhanced resistance against *Escherichia coli* infection by subcutaneous administration of the hot-water extract of *Chlorella vulgaris* in cyclophosphamide-treated mice. **Cancer Immunol Immunother**, 32: 1-7, 1990.

KOWOLENKO, M., TRACY, L., LAWRENCE, D. Early effects of lead on bone marrow cell responsiveness in mice challenged with *Listeria monocytogenes*. **Fundam. Appl Toxicol**, 17: 75-82, 1991.

KOWOLENKO, M.; TRACY, L.; LAWRENCE, D.A. Lead-induced alterations of in vitro bone marrow cell responses to colony stimulating factor-1. **J Leukocyte Biol**, 45: 198-206, 1989.

KROCOVA, Z., MACELA, A.; KROCA, M.; HERNYCHOVA, L. The Immunomodulatory effect(s) of lead and cadmium on the cells of immune system *in vitro*. **Toxicol in Vitro**, 14: 33-40, 2000.

LABOW M.; SHUSTER D.; ZETTERSTROM M.; NUNES P.; TERRY R.; CULLINAN E.B.; BARTFAI T.; SOLORZANO C.; MOLDAWER L.L.; CHIZZONITE R.; MCINTYRE K.W. Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. **J Immunol**, 159(5): 2452-2461, 1997.

LAWRENCE, D.A. Heavy metal modulation of lymphocyte activities. In vitro effects of heavy metals on primary humoral response. **Toxicol Appl Pharmacol**, 57: 439-451, 1981.

LICHTMAN, M.A. The ultrastructure of the hemopoietic environment of the marrow: A review. **Exp Hematol**, 9: 391, 1981.

LILES, W.C.; VAN VOORHIS, W.C. Review: Nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. **J Infect Dis**, 172:1061-1075, 1995.

LÓPEZ, C.E., CASTRO, J.M., GONZÁLES, V., PÉREZ, J., SECO, H.M., FERNÁNDEZ, J.M. Determination of metal ions in algal solution samples by capillary electrophoresis. **J Chromatograph Sci**, 36: 352-356, 1998.

LUSTIGMAN, B., LEE, L.H., KHALIL, A. Effects of nickel and ph on the growth of *Chlorella vulgaris*. **Bull Environ Contam Toxicol**, 55: 73-80, 1995.

MATSUNAGA, T., TAKEYAMA, H., NAKAO, T., YAMAZAWA, A. Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. **J Biotech**, 70: 33-38, 1999.

MEDEIROS, I.M.; CASTELO.A.; SALOMÃO, R. Presence of circulating levels of interferon- γ , interleukin-10 and tumor necrosis factor- α in patients with visceral leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop**, 40(1), 1998.

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

METCALF, D. The granulocyte-macrophage colony stimulating factors. **Science**, 229: 16-22, 1985.

MIELKE, M.E.; EHLERS, S.; HAHN, H. The role of cytokine in experimental listeriosis. **Immunobiol**, 189(3-4): 285-315, 1993.

MISZTA, H. Effect of lead on stromal cells of bone marrow in rats in vitro. **Toxicol Ind Health**, 5: 399-404, 1989.

MOMBAERTS, P.; ARNOLDI, J.; RUSS, F.; TONEGAWA, S.; KAUFMANN, S.H. Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. **Nature**, 365(6441): 53-56, 1993.

MORIMOTO, T., NAGATSU, A., MURAKAMI, N., SAKAKIBARA, J., TOKUDA, H., NISHINO, H., IWASHIMA, A. Anti-tumor-promoting glyceroglycolipids from the green alga, *Chlorella vulgaris*. **Phytochem**, 40: 1433-1437, 1995.

MOSMANN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol Today**, 17:138-148, 1996.

MUENCH, M.O., SCHNEIDER, J.G., MOORE, M.A.S. Interactions among colony-stimulating factors, IL1- β , IL-6 and kit-ligand in the regulation of primitive murine hematopoietic cells. **Exp Hematol**, 20: 339-349, 1992.

NODA, K., OHNO, N., TANAKA, K., OKUDA, M., YADOMAE, T., NOMOTO, K., SHOYAMA, Y. A new type of biological response modifier from *Chlorella vulgaris* which needs protein moiety to show an antitumour activity. **Phytother Res**, 12: 309-319, 1998.

NOMURA, T.; KAWAMURA, I.; TSUCHIYA, K.; KOHDA, C.; BABA, H.; ITO, Y. Essential role of interleukin-12 (IL-12) and IL-18 for gamma interferon production induced by listeriolysin O in mouse spleen cells. **Infect Immun**, 70(3): 1049-55, 2002.

PFEIFER, R.W.; IRONS, R.D. Mechanism of sulfhydryl-dependent Immunotoxicity. **Immunotoxicol Immunopharmacol**, Raven Press, New York, 1985.

PORE, R.S. Detoxication of chlordecone poisoned rats with *Chlorella* and *Chlorella* derived sporopollenin. **Drug Chem Toxicol**, 7: 57-71, 1984.

PORTNOY, D.A.; AUERBUCH, V.; GLOMSKI, I. J. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. **Journal of Cell Biology**, 158(3): 409-14, 2002.

PORTNOY, D.A.; SCHREIBER, R.D.; CONNELLY, P.; TILNEY, L.G. Gamma interferon limits access of *Listeria monocytogenes* to the macrophage cytoplasm. **J Exp Med**, 170: 2141-2146, 1989.

QUADROS, M.R.; SOUZA BRITO, A.R.M.; QUEIROZ, M.L.S. *Petiveria Alliacea* L. extract protects mice against *Listeria monocytogenes* infection – Effects on bone marrow progenitor cells. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 21: 109-124, 1999.

QUEIROZ, M.L.S.; BINCOLETTO, C.; VALADARES, M.C.; DANTAS, D.C.M.; SANTOS, L.M.B. Effects of *Chlorella vulgaris* extract on cytokines production in *Listeria monocytogenes* infected mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 24: 483-496, 2002.

QUEIROZ, M.L.S.; RODRIGUES, A.P.O.; BINCOLETTO, C.; FIGUEIRÊDO, C.A.V.; MALACRIDA, S. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Int Immunopharmacol**, 492: 1-12, 2003.

QUEIROZ, M.L.S.; ZENKER, G.Z.; PEREIRA-DA-SILVA, F.R.R.; MULLER, A.H.; GUILHON, G.M.S.P. Stimulatory action of *Pluchea quitoc* extract on the hematopoietic response during murine listeriosis. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 22: 721-740, 2000.

SALGADO, P.E.T. Toxicologia dos metais. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 153-172.

SANTARELLI L., VALENTINO M.; BRACCI M.; RAPISARDA V.; MOCCHIEGANI E.; CASSANO F.; DI LORENZO L.; SOLEO L. Increase of TNF-alpha in subjects occupationally exposed to lead. **G Ital Med Lav Ergon**, 25(3): 90-91, 2003.

SLAVEYKOVA, V., WILKINSON, K.J. Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. **Environ Sci Technol**, 36: 969-975, 2002.

SPOONCER, E., ELIASON, J., DEXTER, T.M. Long-term mouse bone marrow cultures. Haemopoiesis: A practical approach. **New York: University Press**, 1993. p. 56-73.

STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARLSOW, T.G. **Imunologia Médica**. 9nd ed. Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, 2000.

STOIBER, D.; STOCKINGER, S.; STEINLEIN, P.; KOVARIK, J.; DECKER, T. *Listeria monocytogenes* modulates macrophage cytokine responses through STAT serine phosphorylation and the induction of suppressor of cytokine signaling 3¹. **J Immunol**, 166: 466-472, 2001.

STRATAKIS, C.A., CHROUSOS, G.P. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. **Ann N Y Acad Sci**, 771: 1-18, 1995.

TANAKA, K., KOGA, T., KONISHI, F., NAKAMURA, M., MITSUYAMA, K., NOMOTO, K. Augmentation of host defense by a unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*, to *Escherichia coli* infection. **Infect Immun**, 53: 267-271, 1986.

TANAKA, K.; KONISHI, F.; HIMENO, K.; TANIGUCHI, K.; NOMOTO, K. Augmentation of antitumor resistance by a strain of unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*. **Cancer Immunol Immunother**, 17: 90-94, 1984.

TANAKA, K.; YAMADA, A.; NODA, K.; SHOYAMA, Y.; KUBO, C.; NOMOTO, K. Oral administration of a unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*, prevents stress-induced ulcer. **Planta Med**, 63: 465-466, 1997.

TIAN, L., LAWRENCE, D.A. Pb inhibits nitric oxide production *in vitro* by murine splenic macrophages. **Toxicol Appl Pharmacol**, 132: 156-163, 1995.

TRAVIESO, L., CANIZARES, R.O., BORJA, R., BENITEZ, F., DOMINGUEZ, A.R., DUPEYRON, R., VALIENT, V. Heavy metal removal by microalgae. **Bull Environ Contam Toxicol**, 62: 144-151, 1999.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Annu Rev Immunol**, 13: 251-276, 1995.

TRIPP, C.S.; WOLF, S.F.; UNANUE, E.R. Interleukin-12 and tumor necrosis factor α are costimulators of interferon- γ production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin-10 is a physiologic antagonist. **PROC Natl Acad Sci USA**, 90: 3725-3729, 1993.

TURNBULL, A.V., RIVIER, C.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. **Physiol Rev**, 79: 1-71, 1999.

VACEK, A., ROTKOVSKA, D., BARTONICKOVA, A. Radioprotection of hemopoiesis conferred by aqueous extract from Chlorococcal algae (Ivastimul) administered to mice before irradiation. **Exp Hematol**, 18: 234-237, 1990.

VAN DEN HEUVEL, R.L.; LEPPENS, H.; SCHOETERS, G.E. Use of in vitro assays to assess hematotoxic effects of environmental compounds. **Cell Biol Toxicol**, 17: 107-116, 2001.

VEGLIO, F., BEOLCHINI, F. Removal of metals by biosorption: a review. **Hydrometallurgy**, 44: 301-316, 1997.

WILDE, E.W., BENEMANN, J.R. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. **Biotech Adv**, 11: 781-812, 1993.

WING, E.J.; GREGORY, S.H. *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. **J Infect Dis**, 185(1): 18-24, 2002.

WONG, S.L., NAKAMOTO, L., WAINWRIGHT, J.F. Detection of toxic organometallic complexes in wastewaters using algal assays. **Arch Environ Contam Toxicol**, 32: 358-366, 1997.

YUCESOY, B.; MIRSHAHIDI, S.; YUCESOY, C.; KARAKAYA, A. *In vitro* effects of various metals on natural killer activity in cultured human lymphocytes. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 21: 599-607, 1999.

APÊNDICE



Tabela 5: Estudo dos efeitos do ECV sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c expostos ao chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *L. monocytogenes* (5×10^3 bactérias/mL). **A.** O tratamento com o ECV iniciou-se simultaneamente a exposição ao chumbo. **B.** O tratamento com o ECV iniciou-se 24 horas após a administração do chumbo. Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção.

A

CFU-GM/Fêmur ($\times 10^3$)

N	CTRL	Pb	ECV+Pb	24 horas				48 horas			
				I	ECV+I	Pb/I	ECV+Pb/I	I	ECV+I	Pb/I	ECV+Pb/I
1	13,6	4,66	13,3	12,73	14,56	7,33	12,52	6,79	16,2	4,2	13,45
2	16,4	5,28	13,71	15,31	14,16	7,78	15,24	5,85	15,12	4,29	14,27
3	18,6	5,12	15,1	16,51	18,13	6,3	14,76	7,52	14,69	3,12	15,04
4	15,8	6,95	16,42	14,36	15,96	8,3	13,84	8,11	12,46	4,76	14,09
5	13,8	6,66	14,36	15,78	15,99	7,53	15,9	7,79	15,52	3,35	13,46
6	17,3	5,26	15,09	14,44	14,31	6,52	16,6	6,85	13,08	4,43	15,04
média	15,9	5,66	14,66	14,86	15,52	7,29	14,81	7,15	14,51	4,03	14,23
DP	1,98	0,92	1,12	1,32	1,51	0,76	1,47	0,82	1,45	0,64	0,71

72 horas			
I	ECV+I	Pb/I	ECV+Pb/I
11,1	15,52	3,22	16,78
9,32	15,34	4,38	16,34
8,49	15,99	5,17	13,07
9,88	14,04	4,36	16,52
10,2	13,56	5,22	13,2
8,67	15,08	5,61	14,25
9,61	14,92	4,66	15,03
0,99	0,93	0,86	1,72

B

	ECV+Pb	ECV+Pb+I 24h	ECV+Pb/I 48h	ECV+Pb/I 72h
média	12,66	12,77	7,33	13,03
DP	1,05	1,32	0,83	1,24

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV (50mg/kg) durante 10 dias

I: infectados

ECV+I: tratados com ECV/infectados

Pb: expostos ao chumbo

Pb/I: expostos ao Pb/infectados

ECV+Pb: tratados com ECV/expostos ao Pb

ECV+Pb/I: tratados com ECV/expostos ao chumbo/infectados

Tabela 6: Estudo dos efeitos do ECV sobre a capacidade proliferativa de linfócitos de camundongos BALB/c expostos ao chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (5×10^3 bactérias/mL). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.

Capacidade Proliferativa de Linfócitos (%)

N	CTRL	ECV	Pb	I	Pb/I	ECV/Pb	ECV/I	ECV/Pb/I
1	94,85	113,17	196,11	99,02	146,16	122,11	86,21	98,28
2	96,22	96,68	180,76	82,38	145,85	106,53	100,48	114,78
3	94,62	110,88	161,28	89,3	159,45	113,17	91,64	102,17
4	88,89	114,78	167,01	85,85	153,95	118,44	82,54	97,14
5	101,95	98,28	186,48	86,54	163,9	120,96	90,1	117,53
6	123,48	95,99	194,5	93,14	170,9	115	93,93	100,34
média	100,00	104,96	181,02	89,37	156,70	116,04	90,82	105,04
DP	12,23	8,86	14,32	5,94	9,97	5,77	6,23	8,82

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV (50mg/kg) durante 10 dias

I: infectados

Pb: expostos ao chumbo

Pb/I: expostos ao Pb/infectados

ECV+I: tratados com ECV/infectados

ECV+Pb: tratados com ECV/expostos ao Pb

ECV+Pb/I: tratados com ECV/expostos ao chumbo/infectados

Tabela 7: Análise quantitativa de IL-1 α no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A. Camundongos BALB/c foram expostos ao chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e tratados simultaneamente com 50 mg/kg do ECV. Ao término deste período, os animais foram infectados com uma dose subletal de 5×10^3 bactérias/mL de *L. monocytogenes* e sacrificados 48 horas após a infecção.

Determinação de IL-1 α (pg/mL)

N	CTRL	ECV	Pb	I	Pb/I	ECV+Pb	ECV+I	ECV+Pb/I
1	201,5	369,2	94,3	297,3	85,3	208,7	432,6	194,9
2	192,9	352,4	72,8	304,8	78,7	189,4	428,7	206,2
3	186,5	381,6	80,1	298,9	80,3	192,6	414,3	213,6
4	194,7	374,8	61,9	324,4	83,3	199,7	434,9	205,4
5	174,8	349,7	77,5	316,5	92,2	184,3	406,4	190,5
6	188,6	377,3	69,6	321,7	64,3	203,5	423,8	193,3
média	189,83	367,50	76,03	310,60	80,68	196,37	423,45	200,65
DP	9,03	13,39	10,99	11,80	9,31	9,19	11,11	9,07

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV (50mg/kg) durante 10 dias

I: infectados

Pb: expostos ao chumbo

Pb/I: expostos ao Pb/infectados

ECV+I: tratados com ECV/infectados

ECV+Pb: tratados com ECV/expostos ao Pb

ECV+Pb/I: tratados com ECV/expostos ao chumbo/infectados

Tabela 8: Análise quantitativa de IL-6 no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A. Camundongos BALB/c foram expostos ao chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e tratados simultaneamente com 50 mg/kg do ECV. Ao término deste período, os animais foram infectados com uma dose subletal de 5×10^3 bactérias/mL de *L. monocytogenes* e sacrificados 48 horas após a infecção.

Determinação de IL-6 (pg/mL)

N	CTRL	ECV	Pb	I	Pb/I	ECV+Pb	ECV+I	ECV+Pb/I
1	552,3	521,2	835,2	818,8	954,6	595,8	549,7	556,5
2	564,1	598,5	796,4	785,4	981,3	539,7	601	588,9
3	591,4	521,6	869,5	752,6	977,2	574,3	588,2	620,8
4	601	530	834,9	782,6	932,8	589,6	567,3	619,5
5	532,2	562,6	881,1	790	995,7	566,2	541,9	597,1
6	553,7	558,1	859,7	745,9	1000,4	593,5	584,5	562,3
média	565,78	548,67	846,13	779,22	973,67	576,52	572,10	590,85
DP	25,90	30,34	30,57	26,65	25,71	21,44	23,17	27,41

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV (50mg/kg) durante 10 dias

I: infectados

Pb: expostos ao chumbo

Pb/I: expostos ao Pb/infectados

ECV+I: tratados com ECV/infectados

ECV+Pb: tratados com ECV/expostos ao Pb

ECV+Pb/I: tratados com ECV/expostos ao chumbo/infectados

Tabela 9: Análise quantitativa de IL-10 no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A. Camundongos BALB/c foram expostos ao chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e tratados simultaneamente com 50 mg/kg do ECV. Ao término deste período, os animais foram infectados com uma dose subletal de 5×10^3 bactérias/mL de *L. monocytogenes* e sacrificados 48 horas após a infecção.

Determinação de IL-10 (pg/mL)

N	CTRL	ECV	Pb	I	Pb/I	ECV+Pb	ECV+I	ECV+Pb/I
1	264,6	312,4	635,3	402,5	592,1	333,2	299,9	261,1
2	315,8	275,6	593,4	340,3	623,5	364,9	316,8	306,7
3	282,5	301,2	618,9	322,7	542,9	295,6	341,2	358,2
4	302,9	289,7	576,3	313,6	639,3	280,8	361,1	332,6
5	355,4	236,6	642,5	321,6	578,4	340,6	316,5	342,5
6	299,3	303,5	581,2	389,8	559,8	272,3	336,4	339,5
média	303,42	286,50	607,93	348,42	589,33	314,57	328,65	323,43
DP	31,04	27,55	28,25	38,20	36,93	37,00	21,84	34,87

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV (50mg/kg) durante 10 dias

I: infectados

Pb: expostos ao chumbo

Pb/I: expostos ao Pb/infectados

ECV+I: tratados com ECV/infectados

ECV+Pb: tratados com ECV/expostos ao Pb

ECV+Pb/I: tratados com ECV/expostos ao chumbo/infectados

Tabela 10: Análise quantitativa de IFN- γ no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A. Camundongos BALB/c foram expostos ao chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e tratados simultaneamente com 50 mg/kg do ECV. Ao término deste período, os animais foram infectados com uma dose subletal de 5×10^3 bactérias/mL de *L. monocytogenes* e sacrificados 48 horas após a infecção.

Determinação de IFN- γ (pg/mL)

N	CTRL	ECV	Pb	I	Pb/I	ECV+Pb	ECV+I	ECV+Pb/I
1	1279	1949	354	4455	331	1388	8889	1348
2	1132	1583	302	5442	436	1499	7230	1253
3	1344	1789	341	4857	357	1253	8413	1293
4	1223	1096	322	6341	472	1252	8728	1328
5	1253	1763	292	5191	377	1188	9776	1131
6	1357	1005	400	4540	433	1283	7580	1240
média	1264,67	1530,83	335,17	5137,67	401,00	1310,50	8436,00	1265,50
DP	83,06	390,82	39,32	699,36	54,23	113,16	924,53	77,93

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV (50mg/kg) durante 10 dias

I: infectados

Pb: expostos ao chumbo

Pb/I: expostos ao Pb/infectados

ECV+I: tratados com ECV/infectados

ECV+Pb: tratados com ECV/expostos ao Pb

ECV+Pb/I: tratados com ECV/expostos ao chumbo/infectados

Tabela 11: Análise quantitativa de TNF- α no sobrenadante de culturas de células de baço estimuladas por 48 h com Con A. Camundongos BALB/c foram expostos ao chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e tratados simultaneamente com 50 mg/kg do ECV. Ao término deste período, os animais foram infectados com uma dose subletal de 5×10^3 bactérias/mL de *L. monocytogenes* e sacrificados 48 horas após a infecção.

Determinação de TNF- α (pg/mL)

N	CTRL	ECV	Pb	I	Pb/I	ECV+Pb	ECV+I	ECV+Pb/I
1	148,5	256,5	94,3	283,6	93,3	122,8	372,5	142,8
2	124,3	262,6	69,5	293,4	84,6	112,4	393,1	127,2
3	120,8	301,4	71,2	314,3	89,7	138,6	350,8	136,6
4	143,2	283,7	78,4	315,8	80,3	117,9	366,7	121,7
5	130,7	278,3	77,1	328,7	69,4	140	379,6	117,9
6	126,9	288,2	76,5	315,3	76,5	121,7	376,4	134,5
média	132,40	278,45	77,83	308,52	82,30	125,57	373,18	130,12
DP	11,04	16,63	8,80	16,67	8,78	11,25	14,08	9,49

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV (50mg/kg) durante 10 dias

I: infectados

Pb: expostos ao chumbo

Pb/I: expostos ao Pb/infectados

ECV+I: tratados com ECV/infectados

ECV+Pb: tratados com ECV/expostos ao Pb

ECV+Pb/I: tratados com ECV/expostos ao chumbo/infectados

Tabela 12: Estudo dos efeitos do ECV sobre a atividade das células natural killer (NK) de camundongos BALB/c expostos ao chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e tratados simultaneamente com 50mg/kg do extrato de *Chlorella vulgaris* (ECV). Ao término deste período, os animais foram infectados com uma dose subletal de 5×10^3 bactérias/mL de *L. monocytogenes* e sacrificados 48, 72 e 120 horas após a infecção.

Atividade das células NK (%)

N	CTRL	ECV	Pb	I48h	I72h	I120h	Pb/I48	Pb/I72	Pb/I120
1	18,38	31	9,45	48,9	41,36	34,78	40,08	36,33	29,81
2	15,03	24,05	11,89	42,6	36,52	33,91	48,94	34,16	43,3
3	12,46	21,96	15,78	51,8	44,32	32,6	41,53	38,6	36,43
4	14,38	19,39	14,01	44,6	37,8	27,11	40,9	40,3	34,9
5	16,55	26,45	12,34	49,31	39,61	30,45	52,3	42,56	38,85
6	13,91	20,09	14,29	46,93	39,74	29,4	45	39,75	28
média	15,12	23,82	12,96	47,36	39,89	31,38	44,79	38,62	35,22
PD	2,08	4,37	2,22	3,36	2,74	2,91	4,93	2,99	5,68

ECV+Pb	ECV+I48	ECV+I72	ECV+I120	ECV+Pb/I48	ECV+Pb/I72	ECV+Pb/I120
24,8	64,7	56,4	48,62	71,3	48,4	37,1
20,84	59,67	47,36	43,21	57,45	53,64	44,37
23,3	68,4	51,33	44,35	64,59	50,8	50,6
16,2	71,3	55,63	40,51	60,9	46,72	46,78
22,34	67,81	53,8	39,38	58,31	55	41,98
19,9	65,4	49,47	47,46	69,9	49,87	49,3
21,23	66,21	52,33	43,92	63,74	50,74	45,02
3,02	3,97	3,56	3,68	5,88	3,13	4,99

CTRL: controle
ECV: tratados com ECV (50mg/kg) durante 10 dias
I: infectados
Pb: expostos ao chumbo

Pb/I: expostos ao Pb/infectados
ECV+I: tratados com ECV/infectados
ECV+Pb: tratados com ECV/expostos ao Pb
ECV+Pb/I: tratados com ECV/expostos ao chumbo/infectados