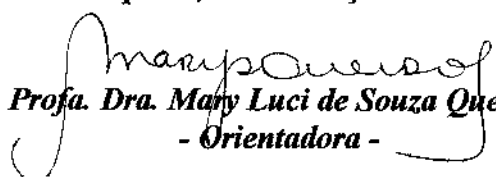


Efeitos do Extrato de *Chlorella vulgaris* sobre a resposta hematopoiética em camundongos expostos ao chumbo e infectados com *Listeria monocytogenes*

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Ana Paula Ottati Rodrigues.

Campinas, 20 de março de 2001.


Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz
- Orientadora -

Efeitos do Extrato de *Chlorella vulgaris* sobre a resposta hematopoiética em camundongos expostos ao chumbo e infectados com *Listeria monocytogenes*

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

Orientadora: Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Co-orientadora: Profa. Dra. Cláudia Bincoletto Trindade



UNICAMP

2001

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

R618e Rodrigues, Ana Paula Ottati.
Efeitos do Extrato de *Chlorella vulgaris* sobre a resposta
hematopoiética em camundongos expostos ao chumbo e infectados com
Listeria monocytogenes / Ana Paula Ottati Rodrigues. Campinas, SP
: [s.n.], 2001.

Orientadores : Mary Luci de Souza Queiroz, Cláudia Bincoletto
Trindade

Tese (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Chumbo. 2. Células hematopoiéticas primitivas. 3. Alga. 4.
Terapia quelante. I. Mary Luci de Souza Queiroz. II. Cláudia
Bincoletto Trindade. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	R618e
V	EX
TOMBO BC	59057
PROC.	124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	22/05/03
Nº CPD	

CM00182833-7

BIB ID 290564



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

PROFª DRª MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ

Membros:

1. PROFª DRª MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ

2. PROF. DR. EDSON ANTUNES

3. PROFª DRª GISELLE ZENKER JUSTO

Mary Luci de Souza Queiroz
Edson Antunes
Giselle Zenker Justo

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

Data: 20/03/2001

FIGURAS

Figura 1.	Aspecto microscópico de uma colônia de células precursoras hematopoiéticas da medula óssea	35
Figura 2.	Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea	43
Figura 3.	Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos do baço	44
Figura 4.	Estudo da produção de fatores estimuladores de colônias de células precursoras hematopoiéticas	46
Figura 5.	Avaliação da resistência do animal à uma dose letal de <i>Listeria monocytogenes</i>	48
Figura 6.	Estudo do peso do baço	51
Figura 7.	Estudo do peso do timo	52

TABELAS

Tabela 1.	Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea (24 horas após infecção).....	78
Tabela 2.	Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea (48 horas após infecção)	79
Tabela 3.	Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea (72 horas após infecção)	80
Tabela 4.	Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos do baço (24 horas após infecção)	81
Tabela 5.	Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos do baço (48 horas após infecção)	82

Tabela 6.	Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos do baço (72 horas após infecção)	83
Tabela 7.	Estudo da produção de fatores estimuladores de colônias de células precursoras hematopoiéticas (24 horas após infecção)	84
Tabela 8.	Estudo da produção de fatores estimuladores de colônias de células precursoras hematopoiéticas (48 horas após infecção)	85
Tabela 9.	Estudo da produção de fatores estimuladores de colônias de células precursoras hematopoiéticas (72 horas após infecção)	86
Tabela 10.	Estudo do peso do baço (24 horas após infecção)	87
Tabela 11.	Estudo do peso do baço (48 horas após infecção)	88
Tabela 12.	Estudo do peso do baço (72 horas após infecção)	89
Tabela 13.	Estudo do peso do timo (24 horas após infecção)	90
Tabela 14.	Estudo do peso do timo (48 horas após infecção)	91
Tabela 15.	Estudo do peso do timo (72 horas após infecção)	92
Tabela 16.	Contagem diferencial de células da medula óssea (24 horas após infecção).....	54
Tabela 17.	Contagem diferencial de células da medula óssea (48 horas após infecção).....	55
Tabela 18.	Contagem diferencial de células da medula óssea (72 horas após infecção).....	56

RESUMO	xi
SUMMARY	xiv
INTRODUÇÃO	17
Metais pesados	18
Agentes quelantes	20
<i>Chlorella vulgaris</i>	21
Modelo experimental de infecção por <i>Listeria monocytogenes</i>	22
OBJETIVOS	26
MATERIAL E MÉTODOS	28
Animais	29
<i>Listeria monocytogenes</i>	29
Tratamento	31
<i>Chlorella vulgaris</i>	31
Exposição ao acetato de chumbo	31
Cultura clonal de precursores hematopoiéticos	32
Medula óssea	32
Baço	33
Preparação das placas de cultura da medula óssea e baço em meio semi-sólido	33
Preparação do meio condicionado de células esplênicas (SCM)	36
Obtenção do soro dos animais para detecção da atividade dos fatores estimuladores de colônias	37
Realização da curva de sobrevida	38
Peso dos órgãos dos animais	38
Peso do baço	38
Peso do timo	38
Contagem diferencial de células da medula óssea	39
Análise estatística	39

RESULTADOS	40
Efeitos do ECV sobre o número de precursores hematopoiéticos	41
Medula óssea	41
Baço	42
Efeitos do ECV sobre a produção de fatores estimuladores de colônias	45
Efeitos do ECV na sobrevivência de animais infectados com uma dose letal de <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	47
Efeitos do ECV sobre o peso dos órgãos dos animais	49
Peso do baço	49
Peso do Timo	49
Efeitos do ECV sobre a contagem diferencial de células da medula óssea	53
DISCUSSÃO	57
CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
APÊNDICE	77

*Dedico este trabalho
Aos meus pais, Juracy e Madeleine;
Aos meus irmãos Marcelo e Ana Luiza,
e à Celeste, minha avó (in memoriam),
pelo estímulo e motivação
de sempre seguir adiante.*

Aos meus pais, Juracy e Madeleine, por me conferirem a existência e pelo constante apoio em todas as etapas de minha vida.

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

À Professora Dra. Cláudia Bincoletto Trindade, co-orientadora deste trabalho, pelo apoio e amizade.

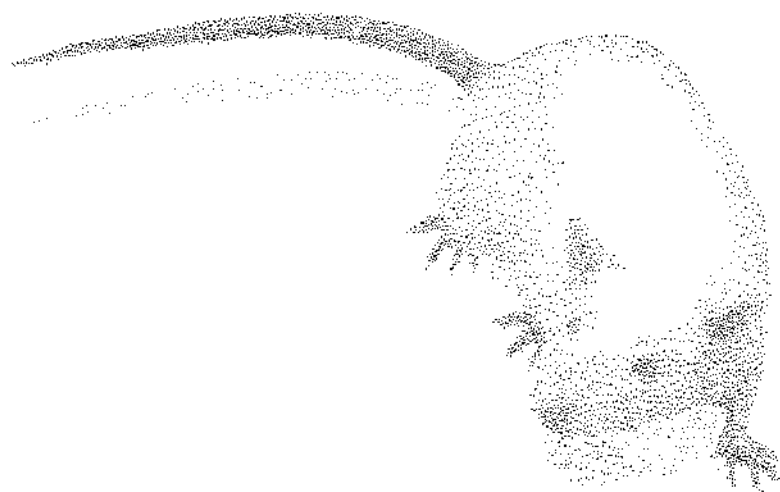
Aos amigos do Laboratório CFU: Adriana, Ana Cláudia, Daniela, Giselle, Luciana, Marcos, Marize, Rafael, Silvia, Solange, Sueli e Valdirene.

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

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), pelo apoio financeiro.

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



RESUMO

Neste trabalho, investigamos os efeitos do extrato de *Chlorella vulgaris* (ECV) sobre o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea e do baço em animais expostos ao chumbo e infectados com *Listeria monocytogenes*. A atividade estimuladora de colônias do soro, as alterações no peso do baço e do timo e a resistência dos animais frente a infecção também foram avaliados.

Por um período de 10 dias camundongos BALB/c receberam 1300 ppm de acetato de chumbo em água de beber e foram tratados diariamente com 50 mg/kg de ECV por gavagem. Ao final deste período, os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal). Para avaliar a resistência dos animais à infecção, realizamos uma curva de sobrevivência utilizando uma dose letal desta bactéria (4×10^6 bactérias/animal).

Nossos resultados demonstraram um decréscimo significativo no número de precursores hematopoiéticos na medula óssea tanto nos animais expostos ao chumbo como naqueles infectados com *Listeria monocytogenes*, sendo que no grupo infectado também observamos hematopoiese extramedular. É interessante ressaltarmos que o comprometimento da resposta hematopoiética foi ainda maior quando os animais foram expostos ao chumbo e infectados. Porém, quando camundongos foram tratados com ECV, a mielossupressão induzida pelo chumbo, pela infecção e pela infecção/chumbo foi revertida, resultando em níveis normais de CFU-GM.

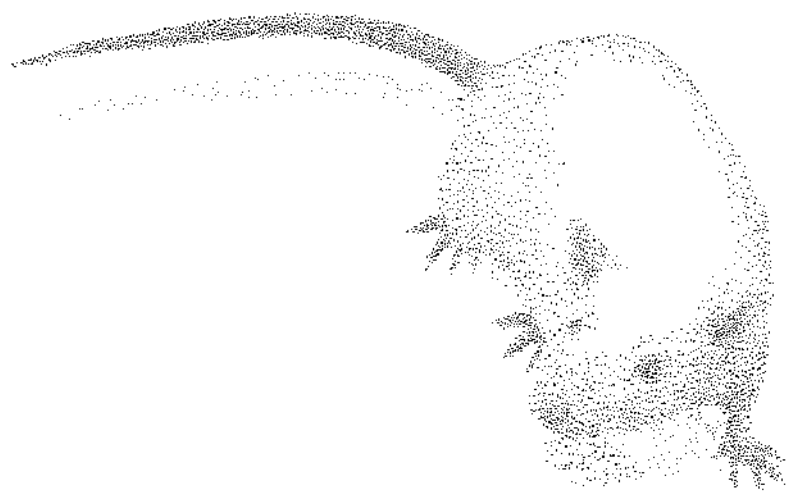
Com relação à produção de fatores estimuladores de colônias de células hematopoiéticas, observamos que o soro de animais infectados apresentou uma maior atividade estimuladora da produção de CFU-GM. No grupo de animais apenas

expostos ao chumbo estes valores permaneceram inalterados em relação ao controle. O tratamento com ECV nos grupos de animais infectados (infectados e infectados/expostos ao chumbo) aumentou de forma significativa a atividade estimuladora do soro, que resultou em um aumento no número de CFU-GM em relação aos grupos apenas infectados e infectados/expostos ao chumbo.

Observamos um aumento no peso do baço em animais infectados e uma redução no peso do timo em animais infectados e infectados/expostos ao chumbo, enquanto que valores normais foram obtidos com o tratamento com ECV.

O tratamento com ECV aumentou a resistência dos animais infectados e infectados/expostos ao chumbo, sendo que obtivemos 30% de sobrevida no grupo de animais infectados e 20% no grupo daqueles infectados/expostos ao chumbo.

Nossos resultados sugerem uma capacidade de ligar-se ao chumbo para a *Chlorella vulgaris* e confirmam dados anteriores do nosso laboratório e da literatura sobre o aumento da resistência dos camundongos à infecção.



SUMMARY

In this work, we investigated the effects of *Chlorella vulgaris* extract (CVE) on the growth and differentiation of bone marrow and spleen hematopoietic progenitors in Pb-exposed and *Listeria monocytogenes* infected mice. Serum colony stimulating activity, weight changes of spleen and thymus and resistance of the animals as they faced infection were also evaluated.

For a period of 10 days BALB/c mice received 1300 ppm of lead acetate in drinking water and were treated daily with 50 mg/kg ECV by gavage. At the end of this period, the animals were infected intraperitoneally with a sublethal dose (4×10^4 bacteria/animal) of *Listeria monocytogenes*. In order to evaluate the resistance of mice to the infection, we performed a survival curve using a lethal dose of the bacteria (4×10^6 bacteria/animal).

Our results demonstrated a significant decrease on the number of bone marrow hematopoietic progenitors in both Pb-exposed and *Listeria monocytogenes* infected mice. Moreover, extramedullar hematopoiesis was also observed in the infected group. It is interesting to emphasize that the hematopoietic response of Pb-exposed mice was further impaired by the infection. However, when these animals were treated with CVE, the myelosuppressive effects produced by lead, infection and infection/lead were reverted, resulting in normal levels of CFU-GM.

Regarding the production of colony-stimulating factors, we observed that serum from infected animals presented a higher stimulatory activity on the CFU-GM generation. In the group of animals only exposed to lead, these values remained unaltered in relation to controls. Treatment of infected and infected/Pb-exposed groups with CVE significantly increased the serum colony-stimulating activity, since

an increase in the CFU-GM number was induced in relation to the only infected and infected/Pb-exposed groups.

In contrast to the increased spleen weight found in infected animals and the decreased thymus weight of those infected and infected/Pb-exposed, CVE-treated mice presented normal thymus and spleen weights.

Treatment with CVE also increased resistance of infected and infected/Pb-exposed animals, as 30% and 20% of survivors were obtained in these groups, respectively.

Our results suggest that *Chlorella vulgaris* has a lead-binding capacity and corroborate previous data from our laboratory and the literature on the increase in resistance of mice to the infection.



INTRODUÇÃO

Metais pesados:

Há 2000 anos a.C., quando grandes quantidades de chumbo eram obtidas de minérios como subproduto da fusão da prata, provavelmente, foi o início da utilização deste metal pelo homem. Em 370 a.C., Hipócrates descreveu pela primeira vez as cólicas abdominais (cólicas satúrnicas), provocadas pelo chumbo em mineradores expostos. O arsênico e o mercúrio foram citados por Teofrastos de Erebos (387-372 a.C.) e por Plínio (23-79 d.C.). Durante a fusão do cobre e do chumbo, obtinha-se o arsênico, usado naquela época na decoração de tumbas egípcias. Mais tarde, o cádmio foi descoberto em minérios contendo carbonato e zinco (SALGADO, 1996).

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 frequentemente polui o meio ambiente e também é responsável por um grande número de intoxicações (SALGADO, 1996; KOSNETT & BECKER, 1998). Desta forma, a exposição crônica de indivíduos a esse metal é bastante frequente, sendo decorrente principalmente da exposição ocupacional, ingestão de água e alimentos contaminados. Após absorvido, esse metal exerce seus efeitos tóxicos sobre o sistema hematopoiético, gastrointestinal, nervoso e reprodutor. Com relação a intoxicação aguda, esta ocorre de forma acidental, como inalação industrial de elevadas quantidades de óxido de chumbo e em casos criminais ou suicidas, sendo acompanhada por episódios de náuseas, vômitos, gosto metálico na boca, cólicas abdominais, fezes escuras e colapso circulatório (SCHVARTSMAN, 1991; SALGADO, 1996; KOSNETT & BECKER, 1998).

O chumbo liga-se aos eritrócitos induzindo distúrbios críticos na biossíntese do heme, inibindo enzimas dependentes de grupos sulfidríla, tais como o ácido delta-aminolevulínico desidratase, a coproporfinogênio descarboxilase e a ferroquelase, ocasionando, desta forma, o acúmulo de seus substratos, ácido delta-aminolevulínico (ALA), coproporfinogênio III (COPRO) e protoporfirina IX (PP-IX) respectivamente. O ácido delta-aminolevulínico e o coproporfinogênio III, por possuírem baixo peso molecular, atravessam a membrana dos eritrócitos, elevam-se no soro e são excretados na urina (ALA-U e COPRO-U). Por outro lado, a PP-IX, não atravessa as membranas celulares e, portanto, se acumula nas células eritrocitárias, sendo encontrada na forma de "protoporfirina eritrocitária livre" (FEP) (KLAASSEN, 1996; SALGADO, 1996). Após se ligar aos eritrócitos, o chumbo é distribuído aos tecidos moles como medula óssea, cérebro, rim e testículos, onde sua meia-vida é de aproximadamente 30 dias. A maior parte do chumbo que penetra no organismo é ligada aos ossos, onde permanece cerca de 20 anos; ele é depositado também no cabelo e nas unhas.

Visto que a maior parte deste metal deposita-se nos ossos e na medula óssea, ocorre um comprometimento da proliferação e diferenciação destas células, assim como da resposta das mesmas aos fatores estimuladores de colônias (KOWOLENKO, TRACY, LAWRENCE, 1989). O chumbo também parece alterar a resposta imunológica inespecífica de forma significativa e deprime a produção de anticorpos em resposta a antígenos (BLAKLEY & ARCHER, 1981). Além disso, a resposta imunológica mediada por linfócitos T também é comprometida, pois animais expostos ao chumbo apresentam uma diminuição na resistência à infecção com

Listeria monocytogenes, que é uma bactéria dependente da resposta imune celular para sua total erradicação (BINCOLETTO & QUEIROZ, 1996).

Alterações nos níveis de citocinas produzidas em animais expostos na presença da *Listeria monocytogenes*, também foram relatadas. Camundongos expostos ao chumbo produzem níveis elevados de IL-6 quando infectados com este microrganismo. Esse aumento da IL-6 na presença da *Listeria monocytogenes* e chumbo parece estar relacionado com um aumento da concentração de hormônios glicocorticóides, pela ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA), secretados em resposta aos mecanismos de defesa ativados pelo estresse pelos organismos infectados resultando em involução de órgãos linfóides, como baço e timo (FUKATA, IMURA, NAKAO, 1993; KISHIKAWA, RENJIE, LAWRENCE, 1997). Além disso, alguns autores sugerem que as concentrações elevadas de IL-6 no soro correlacionam com a severidade das infecções (HAVELL & SEHGAL, 1991).

Agentes quelantes:

Mesmo com o avanço da toxicologia e consequente conhecimento da toxicidade dos metais pesados, a incidência de exposição ocupacional permanece significativa, havendo grande necessidade de medidas preventivas, assim como, de tratamento eficaz (KOSNETT & BECKER, 1998). Neste sentido, os antagonistas dos metais pesados, denominados agentes quelantes, são os antídotos mais eficazes, principalmente para o tratamento da intoxicação crônica. Estes compostos possuem a propriedade de formar complexos com os metais pesados, de modo a prevenir ou reverter a ligação dos cátions metálicos aos principais ligantes do organismo como

grupos contendo oxigênio, enxofre e nitrogênio, os quais são essenciais para as funções fisiológicas normais do organismo (KLAASSEN, 1996).

Os agentes quelantes ligam-se aos metais evitando ou revertendo seus efeitos tóxicos, aumentando sua excreção e também prevenindo sua interação com os grupos reativos do organismo. Os quelantes mais úteis na clínica compreendem os bidentados como o 2,3-Dimercaptopropanolol (British anti-Lewisite, BAL) e seu análogo ácido 2,3-Dimercaptosuccínico (DMSA), a D-penicilina e o polidentado edetato dissódico de cálcio (CaNa_2EDTA), administrados por via intramuscular, oral ou intramuscular/endovenosa, respectivamente (KOSNETT & BECKER, 1998).

Apesar do uso de quelantes no tratamento das intoxicações por metais ser eficaz, efeitos adversos como hipertensão, taquicardia, cefaléia, náuseas, vômitos, lacrimejamento, salivação, parestesias, reações alérgicas, nefrotoxicidade, glicosúria, anemia aplásica, doenças autoimunes e mialgia, foram observados (KOSNETT & BECKER, 1998). Desta forma, a descoberta de compostos menos tóxicos para o tratamento destas intoxicações se faz necessário.

***Chlorella vulgaris*:**

Chlorella é um gênero botânico de algas unicelulares microscópicas de água doce, com 15 espécies conhecidas, das quais a *Chlorella vulgaris* é a mais extensamente estudada, sendo uma alga verde, de conformação esférica, com 2 a 10 micrômetros de diâmetro, pertencente à classe *Chlorophyceae*, ordem *Chlorococcales* e família *Oocystaceae*.

No decorrer dos últimos anos, alguns autores vêm estudando os efeitos da *Chlorella vulgaris* no combate à infecções virais como Citomegalovírus (IBUSUKI &

MINAMISHIMA, 1990) e bacterianas, tais como *Escherichia coli* (TANAKA et al., 1986; KONISHI et al., 1990) e *Listeria monocytogenes* (HASEGAWA et al., 1994, 1997; DANTAS & QUEIROZ, 1999); tumores (NODA et al., 1996, 1998; TANAKA et al., 1990, 1998; MORIMOTO et al., 1995); úlcera gástrica (TANAKA et al., 1997) e na eliminação de inseticidas organo-clorados (PORE, 1984).

Estudos em ambientes aquáticos, demonstram a capacidade da *Chlorella vulgaris* quelar metais como o chumbo, cádmio, manganês, cromo, níquel, zinco e cobre (WILDE & BENEMANN, 1993; LUSTIGMAN, LEE, KHALIL, 1995; WONG, NAKAMOTO, WAINWRIGHT, 1997; CARR et al., 1998; LÓPEZ et al., 1998; MATSUNAGA et al., 1999). A capacidade desta alga se ligar a esses metais formando complexos parece estar relacionada a duas propriedades fundamentais, sua parede celular que é a linha inicial de defesa protegendo o ambiente intracelular da célula facilitando o sequestro do metal (CARR et al., 1998) pelo cloroplasto presente em sua constituição. Esta é uma organela rica em fósforo, potássio, cálcio e enxofre, que por possuírem alta afinidade por metais formam complexos com os mesmos, removendo-os do ambiente aquático (WONG et al., 1997).

Modelo experimental de infecção por *Listeria monocytogenes*:

O modelo experimental de infecção com a *Listeria monocytogenes* possibilita o estudo da resistência do hospedeiro a bactérias e facilita a avaliação dos efeitos produzidos pelo agente em estudo. A infecção por *Listeria monocytogenes* em camundongos tem sido extensivamente utilizada como modelo de interação entre parasita e hospedeiro para o estudo da resposta imunológica (MACKANESS, 1962; HAHN & KAUFMANN, 1981).

Listeria monocytogenes é um bacilo gram-positivo, pertencente a um grupo de microrganismos de ação intracitoplasmática. O processo envolvido na resistência a esta bactéria é caracterizado inicialmente pela imunidade inata do hospedeiro, seguida por uma resposta imune específica, garantindo a total erradicação do patógeno.

Ao entrar em contato com o organismo, a bactéria deixa rapidamente a corrente sanguínea, alojando-se em células fagocitárias, preferencialmente células hepáticas e macrófagos, iniciando o processo infeccioso, que envolve além de fagócitos, células T e citocinas (KAUFMANN, 1993). Após ser fagocitada, *Listeria monocytogenes* produz uma toxina denominada Listeriolisina O (LLO) que lisa o fagolisossomo permitindo sua saída para o citoplasma, onde ocorre sua proliferação e consequente migração para a célula adjacente, dando início a sua disseminação (NISHIBORI et al., 1996; SOUTHWICK & PURICH, 1996; DRAMSI et al., 1998). Assim sendo, a migração de células fagocitárias como macrófagos, granulócitos e células natural killer (NK) para o local de replicação da bactéria, é um componente essencial para a sobrevivência do animal durante esta fase inicial da infecção (NORTH, 1970; BENNET & BAKER, 1977; LEPAY et al., 1985; ROSEN, GORDON, NORTH, 1989).

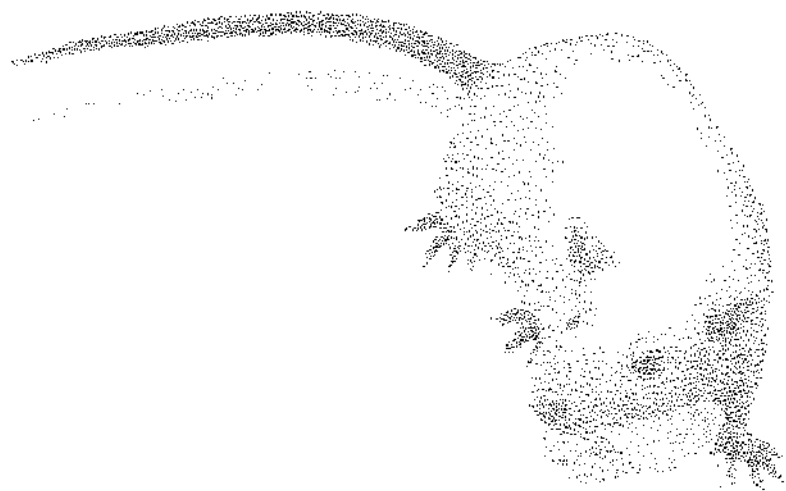
Estas células fagocitárias, são originárias das células primitivas pluripotenciais da medula óssea, denominadas células formadoras de colônias (CFCs), as quais podem dar origem a qualquer célula sanguínea dependendo do estímulo recebido (METCALF, 1984; QUEIROZ, 1988). O crescimento e a diferenciação dessas células são modulados pelos fatores estimuladores de colônias (CSFs) (STEVENSON, KONGSHAVN, SKAMENE, 1981; METCALF, 1984, 1989; HUME et al., 1988).

Elevados níveis destes fatores aparecem no soro e tecidos dos animais infectados no período inicial da infecção com *Listeria monocytogenes* (WING, 1984, 1985, 1987; YOUNG E CHEERS, 1986).

Os macrófagos são as principais células atuantes nessa fase e ao serem infectados, liberam algumas citocinas pró-inflamatórias: IL-1, IL-6, TNF- α e IL-12 que estimulam as células NK a secretarem IFN- γ (ROGERS et al., 1992, 1994; LIU & CHEERS, 1993; MIELKE, EHLERS, HAHN, 1993; TRIPP, WOLF, UNANUE, 1993; KOPF et al., 1994; DALRYMPLE et al., 1995; HUNTER, CHIZZONITE, REMINGTON 1995; LIU & KURLANDER, 1995; SKEEN & ZIEGLER, 1995; UNANUE, 1997). Altas concentrações de IFN- γ promovem a ativação do macrófago, conduzindo a uma maior expressão das moléculas da classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC classe II). Este complexo apresenta a bactéria a um segundo sistema de defesa do organismo, que atuará de maneira específica na erradicação da infecção, através da ação de células T CD4⁺CD8⁺ α/β e CD4⁺CD8⁻ γ/δ (MOMBAERTS et al., 1993). Diante da importância das células fagocíticas na fase inicial da infecção pela *Listeria monocytogenes*, a avaliação do crescimento e diferenciação destas células, através da técnica de cultura clonal de precursores hematopoiéticos da medula óssea para granulócitos e macrófagos (CFU-GM), é um indicador fiel do grau de comprometimento do organismo dos animais infectados pelo microrganismo em questão.

Diante do exposto e da ausência de estudos "in vivo" sobre a atividade protetora e/ou quelante da *Chlorella vulgaris*, neste trabalho, utilizando o modelo de

infecção experimental pela *Listeria monocytogenes*, avaliamos as propriedades protetoras da *Chlorella vulgaris* em camundongos expostos ao chumbo. Os parâmetros avaliados foram o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea e baço, a produção de fatores estimuladores de colônias de células hematopoiéticas e as alterações no peso do baço e do timo. A resistência dos animais à infecção, quando expostos ao chumbo e tratados com *Chlorella vulgaris*, também foi avaliada.



OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos protetores da administração do extrato de *Chlorella vulgaris* (ECV) em camundongos expostos ao acetato de chumbo e infectados com *Listeria monocytogenes*. Os parâmetros avaliados foram:

- número de precursores hematopoiéticos da medula óssea e baço;
- produção de fatores estimuladores de colônias de células precursoras hematopoiéticas;
- resistência do animal à uma dose letal de *Listeria monocytogenes*;
- peso do baço e timo.



MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais:

Para realização dos experimentos foram utilizados camundongos BALB/c machos, com idade entre 8 e 10 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP. Após obtenção, os animais foram divididos (6 animais por grupo) e submetidos ao tratamento de acordo com o protocolo experimental, a saber:

- a) animais controle, sem tratamento;
- b) animais tratados com extrato de *Chlorella vulgaris* (ECV) (50 mg/kg) durante 10 dias;
- c) animais expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias;
- d) animais infectados com *Listeria monocytogenes*;
- e) animais expostos ao chumbo e infectados;
- f) animais tratados com ECV e expostos ao chumbo;
- g) animais tratados com ECV e infectados;
- h) animais tratados com ECV, expostos ao chumbo e infectados.

As doses de ECV, acetato de chumbo e *Listeria monocytogenes* utilizadas neste trabalho, foram estabelecidas baseadas em estudos preliminares realizados em nosso laboratório (BINCOLLETO & QUEIROZ, 1996; DANTAS & QUEIROZ, 1999).

2. *Listeria monocytogenes*:

A bactéria *Listeria monocytogenes* utilizada para infectar os animais, é um cocobacilo gram-positivo, anaeróbio facultativo, móvel por flagelos peritríquios a temperatura ambiente, facilmente cultivável em ágar-sangue.

Esta cepa foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica (Hospital das Clínicas - UNICAMP). Após a aquisição, a bactéria foi submetida a vários testes bioquímicos que confirmaram sua identidade. Os testes realizados demonstraram o seguinte:

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

Rhodococcus equi - negativo

Para 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 0,9%. 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.

No momento da infecção dos animais, foi necessário determinar o número ideal de microrganismos a ser injetado. A dose ideal não deveria provocar a morte do animal muito rapidamente, para que fosse possível a avaliação dos parâmetros propostos após a infecção. Dessa forma, a bactéria foi incubada em meio de cultura BHI por 24-48 horas a 37°C. As colônias obtidas das culturas frescas de ágar-sangue foram diluídas em solução salina a 0,9% e as concentrações determinadas por espectrofotometria através da Escala de McFarland (Vitek Colorimeter).

Para o estudo dos parâmetros imunológicos e hematológicos foi utilizada a dose subletal de 4×10^4 bactérias/animal. Para a avaliação da sobrevida dos animais foi necessário utilizar uma concentração letal de 4×10^6 bactérias/animal, a qual foi inoculada intraperitonealmente.

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

3. Tratamento:

3.1. *Chlorella vulgaris*:

O extrato liofilizado da alga *Chlorella vulgaris* foi obtido da Chlorella Industry Co. Ltd. (Tokyo).

Para o tratamento dos animais, o ECV foi ressuspenso em água destilada à 40°C e administrado na dose de 50 mg/kg por via oral, durante 10 dias consecutivos.

3.2. Exposição ao acetato de chumbo:

Camundongos receberam 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 (BINCOLETTTO & QUEIROZ, 1996).

4. Cultura clonal de precursores hematopoiéticos da medula óssea e baço de camundongos (CFU-C):

Para enumerar estas células clonogênicas é importante que todas as células multipotenciais presentes na cultura sejam induzidas a proliferar e que as condições de cultura sejam ajustadas para se evitar a superposição de colônias na placa de petri e permitir a identificação de cada colônia. Também é importante que o fator estimulador de colônias (SCM) seja utilizado em condições supermáximas. Além disso, a escolha do soro bovino fetal deve ser feita cuidadosamente devido a variação na atividade dos vários lotes e marcas.

4.1. Medula óssea:

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

A medula óssea foi transferida com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo 5 mL de meio RPMI-1640 (Cultilab).

O número de células na suspensão foi contado em câmara hematocitométrica após diluição (1:10) das células em eosina 1% e a concentração da suspensão celular ajustada para 1×10^5 células/mL.

4.2. Baço:

Após a retirada da medula óssea, realizou-se uma pequena incisão na região lateral esquerda da cavidade peritoneal e o baço foi removido com auxílio de uma pinça, sendo em seguida lavado em solução salina estéril e transferido para um tubo contendo 9 mL de meio RPMI-1640 (Cultilab). A seguir o baço dos animais foi macerado para a obtenção de uma suspensão celular.

O número de células na suspensão foi contado em câmara hematocitométrica após diluição (1:20) das células em azul de tripan 1% e a concentração ajustada para 2×10^5 células/mL.

4.3. Preparação das placas de cultura da medula óssea e baço em meio semi-sólido:

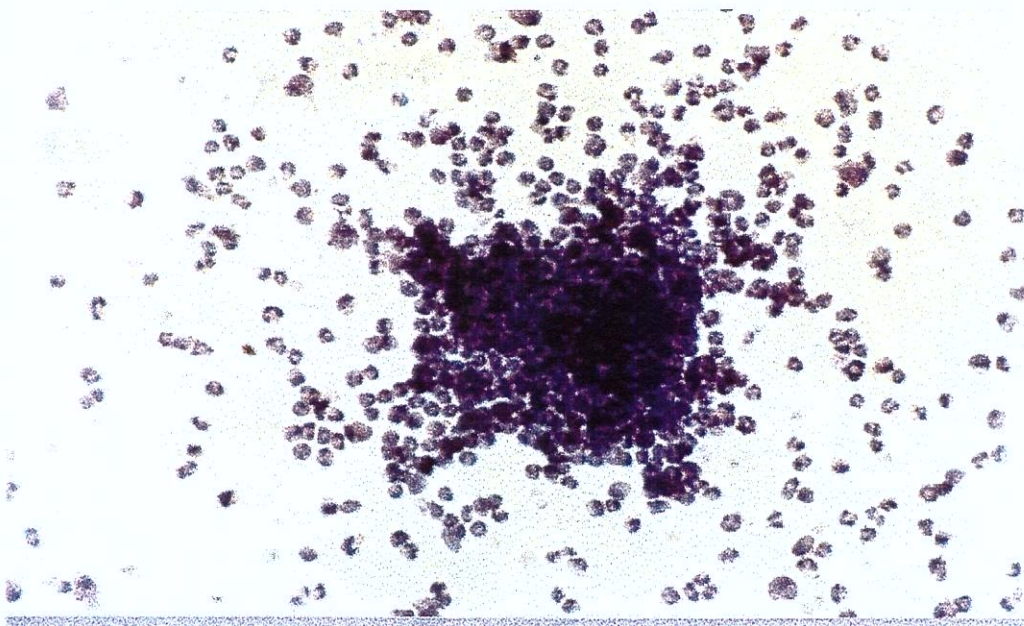
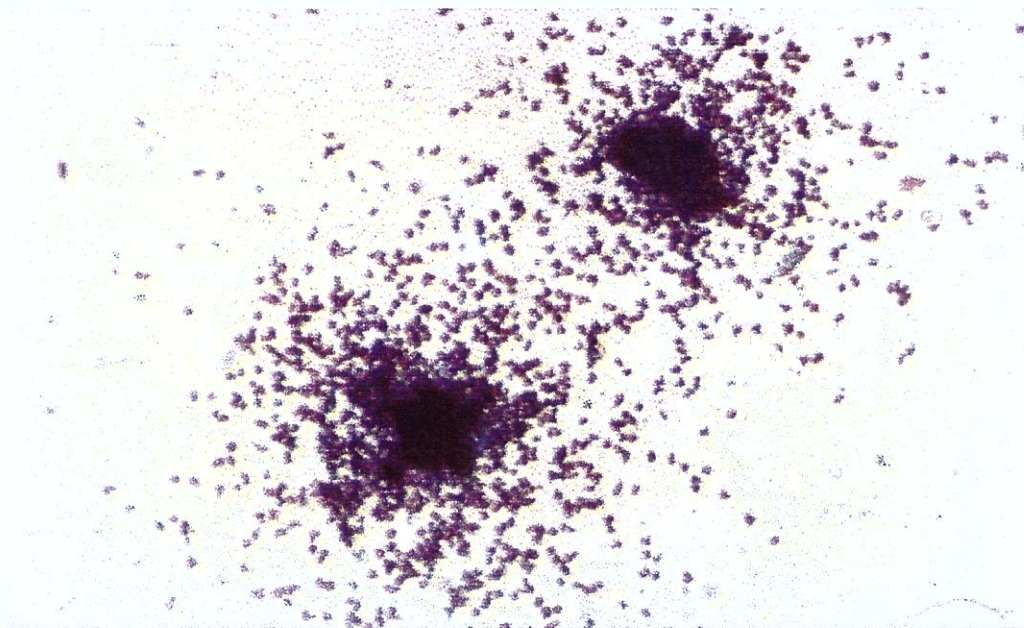
Preparou-se o meio mais ágar (Bacto-ágar-Difco) o qual consistia de:

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

A seguir, adicionou-se ao meio descrito acima, o volume apropriado de células (1×10^5 células/mL para a medula óssea e 2×10^5 células/mL para o baço) e distribuiu-se volumes de 2 mL em cada placa de petri (35 mm), já contendo 100 μ L do estímulo apropriado (SCM). Deixou-se geleificar e incubou-se por 7 dias a 37°C em presença de 5% de CO₂. Após este período, contou-se o número de colônias formadas em microscópio de dissecação em aumento de 40x.

Para estudo morfológico, as colônias foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (v/v) e coradas com Luxol Fast Blue/Leishman. A figura 1 mostra o aspecto microscópico de uma colônia de células de precursores hematopoiéticos da medula óssea de camundongo normal, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM).

Figura 1. Aspecto microscópico de uma colônia de células precursoras hematopoiéticas da medula óssea de camundongo normal, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Aumento de 100x e 250x, respectivamente.



5. Preparação do meio condicionado de células esplênicas (SCM):

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

Preparou-se uma suspensão com 2×10^6 células/mL em meio RPMI-1640 (Sigma) contendo 10% de soro bovino fetal.

Adicionou-se ao meio 5×10^{-5} moles/L de 2-mercaptoetanol e 1,65 µg/mL de “pokeweed mitogen”.

Incubou-se por 7 dias a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO₂ no ar.

Centrifugou-se o sobrenadante e filtrou-se em membranas de 0,45 µm (Millipore).

A atividade funcional do CSF foi determinada através dos estímulos produzidos sobre o crescimento clonal de células progenitoras hematopoiéticas em meio semi-sólido.

A titulação deste lote de SCM demonstrou que uma diluição de até 1:4 forneceu resultados que estão dentro dos níveis de resposta supermáxima. Os resultados em duplicata da titulação realizada em cultura de 7 dias estão apresentados na tabela abaixo.

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

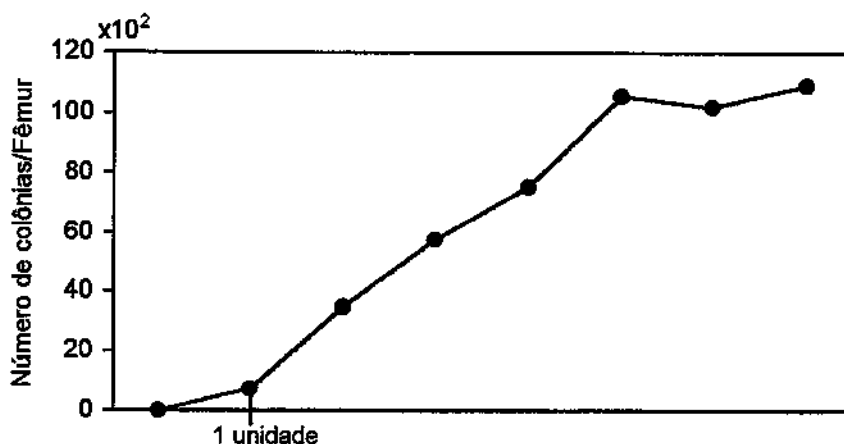
DILUIÇÃO SCM	CFU-C x 10 ² *
1:1	109,2 ± 4,2
1:2	102 ± 3,5
1:4	105,6 ± 5,1
1:8	75,6 ± 4,2
1:16	57,6 ± 4,0
1:32	34,8 ± 3,0
1:64	7,2 ± 1,2
1:168	0

* Número total de células por fêmur
Resultados obtidos em duplicata por diluição

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

O sangue dos animais dos 8 grupos experimentais, foi obtido através de punção do plexo ocular, sendo separado em "pools", centrifugado para obtenção do soro e armazenado a -20°C. A presença de fatores estimuladores de colônias no soro dos animais em questão, foi determinada pela sua capacidade promotora do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea de animais normais.

A atividade estimuladora de colônias foi expressa em unidades por mL e determinada a partir da curva de titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) ilustrada abaixo. De acordo com VAN DEN ENGH & BOL (1975), a menor concentração capaz de estimular o crescimento de clones é considerada como 1 unidade de CSF/mL.



7. Realização da curva de sobrevivência:

Para o estudo dos efeitos do tratamento com o ECV na sobrevivência dos animais expostos ao chumbo e infectados com *Listeria monocytogenes*, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: infectados; expostos ao chumbo/infectados; tratados com ECV/infectados; tratados com ECV/expostos ao chumbo/infectados (n=20/grupo). Todos os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* (4×10^6 bactérias/animal) 3 horas após a última dose de ECV ou chumbo. A seguir, os animais foram observados por um período de 30 dias.

8. Peso do baço e timo dos animais submetidos aos referidos tratamentos:

8.1. Peso do Baço:

Após remoção do baço (como descrito no item 4.2), seu peso foi mensurado em gramas para posterior análise.

8.2. Peso do Timo:

Após sacrificar o animal por deslocamento cervical, realizou-se uma incisão na região do tórax, estendendo-se até o pescoço e o timo foi removido com auxílio de

uma pinça, transferido para um tubo contendo salina e mensurado em gramas para posterior análise.

9. Contagem diferencial de células da medula óssea:

Após remoção da medula óssea (como descrito no item 4.1), as células de cada grupo experimental (6 animais por grupo), foram transferidas para um tubo contendo 5 mL de meio RPMI-1640 (Sigma) e centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e o "pool" de células de cada grupo foi ressuspenso em 2 mL de meio RPMI-1640 (Sigma), 500 μ L desta suspensão foram transferidos para uma lâmina de citocentrifugação e centrifugadas a 800 rpm durante 5 minutos. As lâminas foram coradas com Leishman e a leitura foi realizada em objetiva de 100x.

10. Análise estatística:

A Análise de Variância foi utilizada para avaliar as variáveis CFU-C/fêmur; CFU-C/baço; fatores estimuladores de colônias e pesos do baço e timo. O teste de Tukey foi utilizado quando a análise de variância detectava diferenças significativas entre os grupos.

A curva de sobrevida dos animais foi representada pelo método descrito por Kaplan-Maier, 1958 (COLLET, 1994). A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Log-rank (procedimentos não paramétricos).

Em todos os grupos estudados, considerou-se estatisticamente significativos aqueles cujos valores de P foram $<0,05$.



RESULTADOS

1. Efeitos do ECV sobre o número de precursores hematopoiéticos da medula óssea e do baço de camundongos (CFU-C):

1.1. Medula óssea:

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na figura 2; tabelas 1, 2 e 3 (apêndice).

O tratamento de animais normais com ECV não produziu alterações na resposta mielopoiética, quando comparado com o controle. Por outro lado, tanto a exposição ao chumbo como a infecção com *Listeria monocytogenes* nas 48 e 72 hs, quando avaliados separadamente, causaram uma redução significativa no número de CFU-C em relação ao controle ($n=6$, $P<0,05$ – ANOVA, Tukey). O comprometimento da resposta mielopoiética foi ainda maior quando os animais foram expostos ao chumbo e infectados, pois o número de CFU-C observado nestes grupos foi significativamente menor em relação ao grupo de animais apenas infectados nos 3 períodos estudados (24, 48 e 72 hs), ($n=6$, $P<0,05$ – ANOVA, Tukey).

É interessante observarmos nesta figura, que o tratamento com ECV normalizou os níveis de CFU-C em todos os grupos (expostos ao chumbo, infectados e infectados/expostos ao chumbo), indicando que esta alga conseguiu reverter a mielossupressão induzida tanto pelo chumbo como pela infecção, assim como pela presença de ambos (infecção/exposição ao chumbo).

1.2. Baço:

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na figura 3; tabelas 4, 5 e 6 (apêndice).

Na cultura clonal de células esplênicas nenhuma alteração no número de CFU-C foi observada após o tratamento de animais normais com ECV, quando comparado ao controle. Porém, quando os animais foram infectados com *Listeria monocytogenes*, hematopoiese extramedular foi evidente 48 e 72 horas após infecção, pois o número de CFU-C aumentou em relação ao dos animais normais ($n=6$, $P<0,05$ – ANOVA, Tukey). Entretanto, quando os animais infectados foram tratados com ECV, não observamos atividade hematopoiética extramedular, uma vez que o número de CFU-C observado foi similar ao dos controles.

A exposição ao chumbo não produziu nenhuma alteração significativa neste parâmetro em todos os grupos expostos.

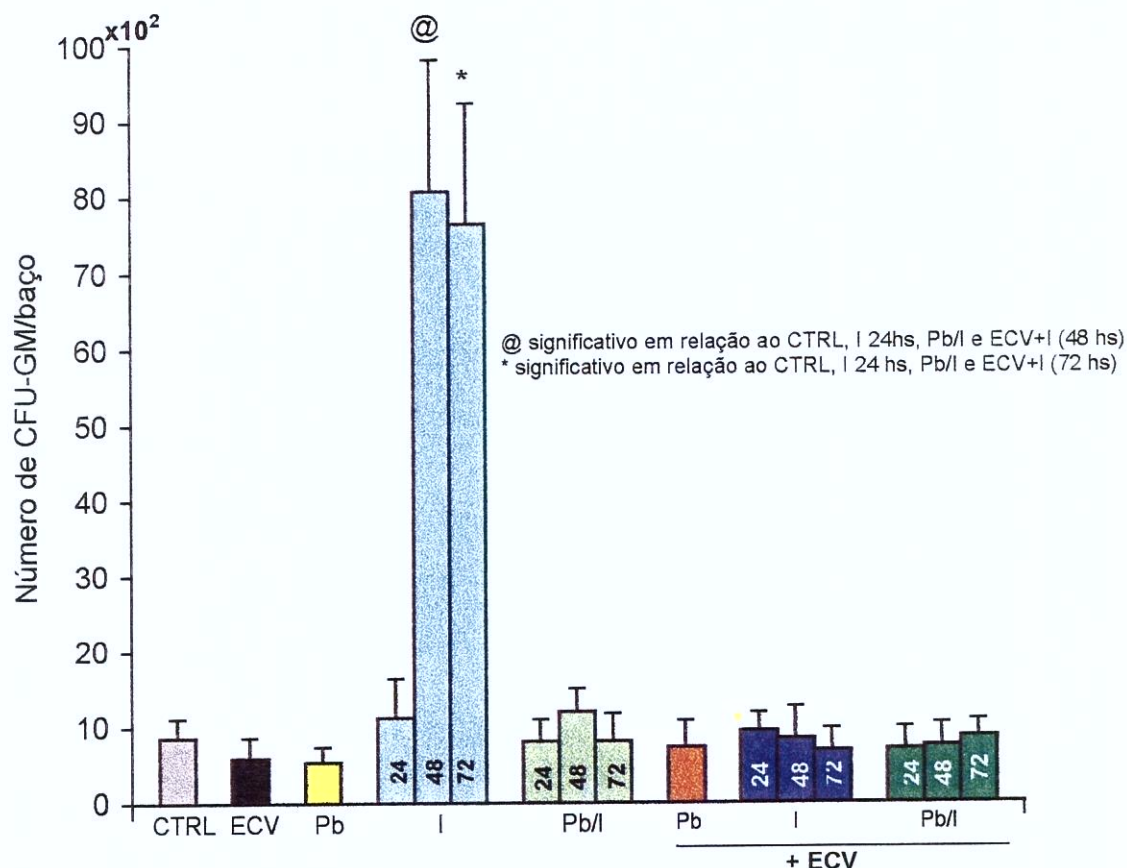


Figura 3. Estudo dos efeitos do ECV sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos do baço de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. n=6, $P < 0,05$ ANOVA-Tukey.

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV (50 mg/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 Pb/infectados

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

2. Efeitos do ECV sobre a produção de fatores estimuladores de colônias:

A produção de fatores estimuladores de colônias foi expressa em unidade por mL, conforme descrito no item 6 do material e métodos.

O soro de animais controle (sem nenhum tratamento) e de animais expostos ao chumbo, apresentaram uma pequena atividade estimuladora de colônias (figura 4; tabelas 7, 8 e 9 - apêndice). Porém, o tratamento com ECV produziu um aumento nestes fatores, uma vez que a concentração dos mesmos aumentou significativamente em relação aos animais normais ($n=6$, $P<0,05$ – ANOVA, Tukey). Este aumento na concentração de fatores estimuladores de colônias em relação ao grupo controle, foi ainda mais evidente nos grupos de animais apenas infectados e infectados/expostos ao chumbo, para os três períodos estudados (24, 48 e 72 h), sendo que o pico máximo de atividade estimuladora de colônias foi obtido em 48 horas após infecção, em ambos os grupos ($n=6$, $P<0,05$ – ANOVA, Tukey). Nesses grupos, infectados e infectados/expostos ao chumbo, o tratamento com ECV potencializou a produção de fatores estimuladores de colônias, pois a concentração dos mesmos aumentou em relação aos grupos apenas infectados e infectados/expostos ao chumbo respectivamente ($n=6$, $P<0,05$ – ANOVA, Tukey). Esta capacidade do ECV induzir um aumento na atividade estimuladora de colônias também foi evidente nos animais apenas expostos ao chumbo, pois a concentração de fatores estimuladores de colônias aumentou significativamente em relação ao grupo apenas exposto ao chumbo ($n=6$, $P<0,05$ – ANOVA, Tukey).

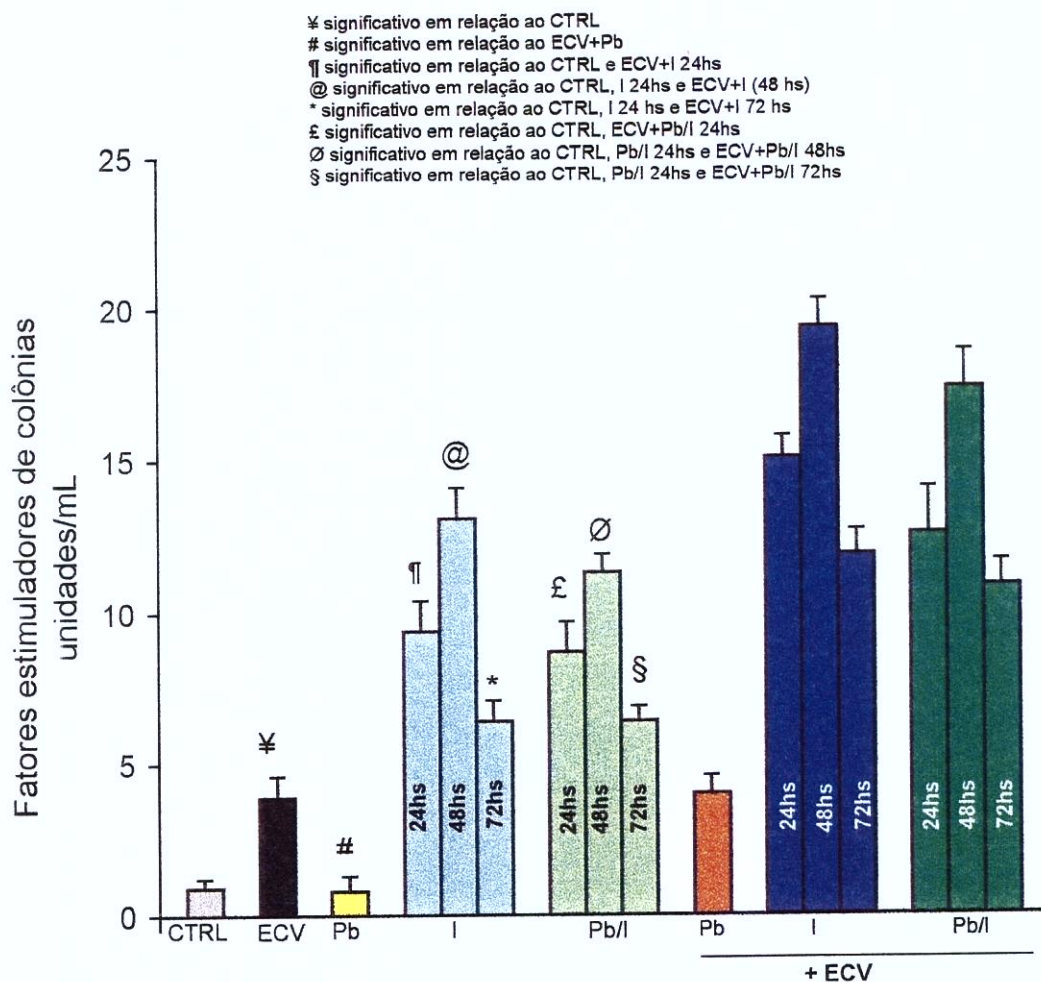


Figura 4. Estudo dos efeitos do ECV sobre a produção de fatores estimuladores de colônias em animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). O soro dos animais foi coletado 24, 48 e 72 horas após a infecção. n=6, P< 0,05 ANOVA-Tukey.

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV (50 mg/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 Pb/infectados

3. Efeitos do ECV na sobrevida de animais infectados com uma dose letal de *Listeria monocytogenes*:

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na figura 5. Nesta figura, podemos observar que os animais apenas infectados apresentaram uma mortalidade de 100% até o sexto dia após a infecção. O tratamento prévio dos camundongos com ECV modificou a resistência dos mesmos à *Listeria monocytogenes*, resultando em 30% de sobrevida neste grupo de animais. Estes resultados foram significativos entre si ($P < 0,001$ – Curva de Kaplan-Maier, Log-Rank).

Assim como no grupo apenas infectado, a mortalidade do grupo de animais infectados/expostos ao chumbo foi de 100%, diferindo apenas no dia em que todas as mortes ocorreram, que correspondeu ao quinto dia após a infecção, não sendo, portanto, estes dados significativos entre si. Quando os animais infectados/expostos ao chumbo foram tratados com ECV, obteve-se 20% de sobrevida neste grupo, quando comparada ao grupo infectado/exposto ao chumbo ($P < 0,001$ – Curva de Kaplan-Maier, Log-Rank), deixando evidente que o tratamento com ECV é capaz de proteger os animais infectados, assim como infectados e expostos ao chumbo.

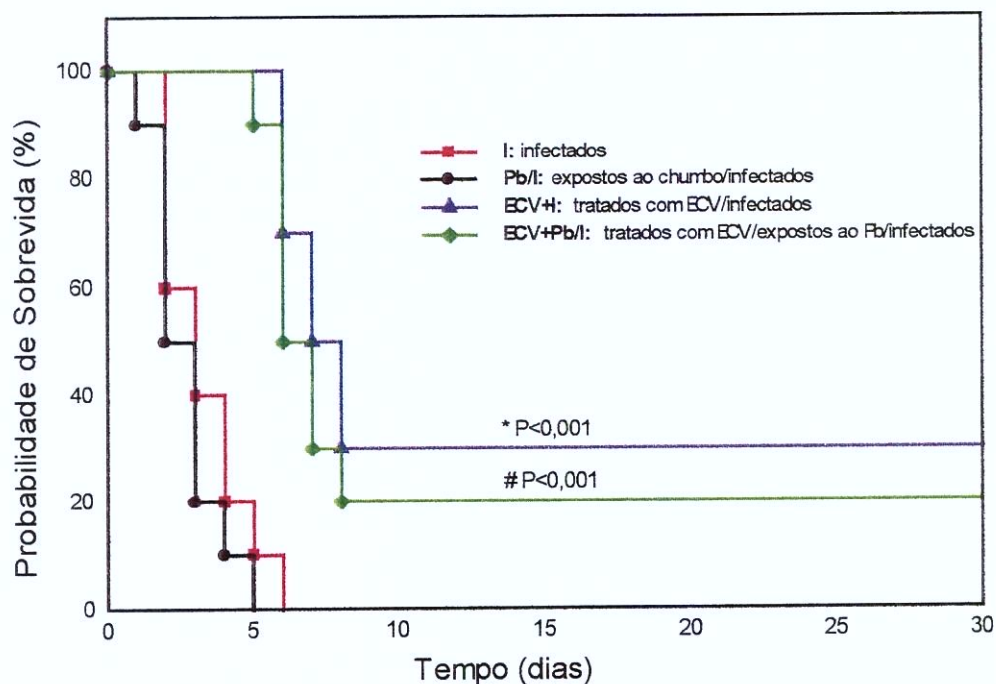


Figura 5. Avaliação dos efeitos do ECV (50 mg/kg) na sobrevida de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com dose letal de *Listeria monocytogenes* (4×10^6 bactérias/animal), (n=20, Curva de Kaplan-Maier, Log-Rank; *P<0,001 em relação ao grupo infectado; #P<0,001 em relação ao grupo exposto ao chumbo/infectado).

4. Efeitos do ECV sobre o peso do baço e timo dos animais:

4.1. Peso do Baço:

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na figura 6; tabelas 10, 11 e 12 (apêndice).

O peso do baço dos animais apenas tratados com ECV não apresentou diferença significativa em relação ao controle.

Nos grupos infectados, nas primeiras 24 horas já se observou um aumento significativo deste órgão, em relação ao controle ($n=6$, $P<0,05$ – ANOVA, Tukey). Este aumento foi ainda mais evidente nas próximas 48 e 72 horas, uma vez que o peso do baço dos animais deste grupo aumentou significativamente em relação ao grupo infectado 24 horas ($n=6$, $P<0,05$ – ANOVA, Tukey). Entretanto, quando estes animais foram previamente tratados com ECV, o aumento do baço nestes grupos foi revertido, atingindo pesos similares ao dos controles.

A exposição ao chumbo não modificou o peso deste órgão em todos os grupos avaliados.

4.2. Peso do Timo:

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na figura 7; tabelas 13, 14 e 15 (apêndice).

Assim como no baço, nenhuma alteração foi observada no peso deste órgão nos animais apenas tratados com ECV ou expostos ao chumbo, quando comparados com o controle.

A presença da infecção causou redução no peso do timo nas 48 e 72 horas, em relação ao controle e infectados 24 hs ($n=6$, $P<0,05$ – ANOVA, Tukey). No grupo de animais expostos ao chumbo e infectados, podemos observar que esta redução do timo nas 48 e 72 horas foi mais severa, sendo estatisticamente significativa em relação ao grupo apenas infectado nas 48 e 72 horas respectivamente ($n=6$, $P<0,05$ – ANOVA, Tukey). É interessante observarmos nesta figura, que o tratamento prévio com ECV foi capaz de reverter este quadro severo de atrofia induzido tanto pela presença da infecção, como da infecção/exposição ao chumbo concomitantemente.

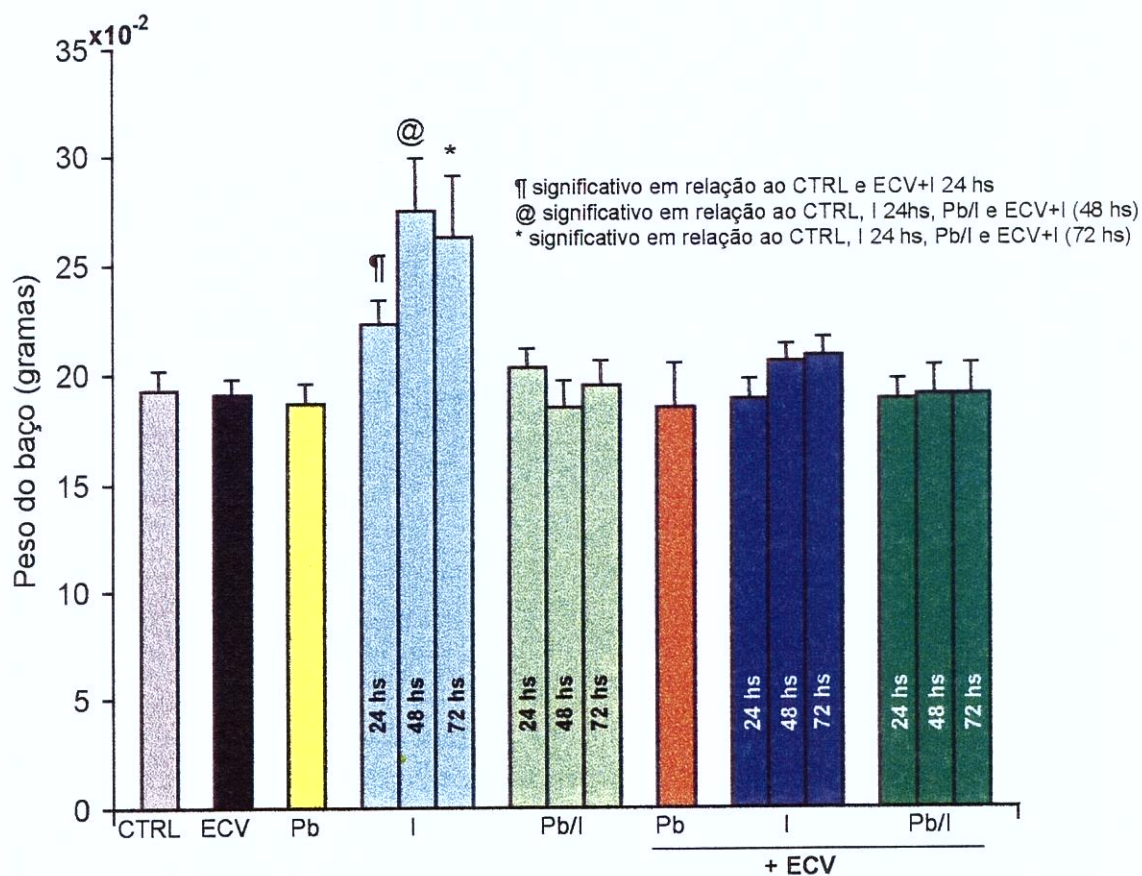


Figura 6. Estudo dos efeitos do ECV sobre o peso do baço de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. $n=6$, $P < 0,05$ ANOVA-Tukey.

CTRL: controle
ECV: tratados com ECV (50 mg/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 Pb/infectados

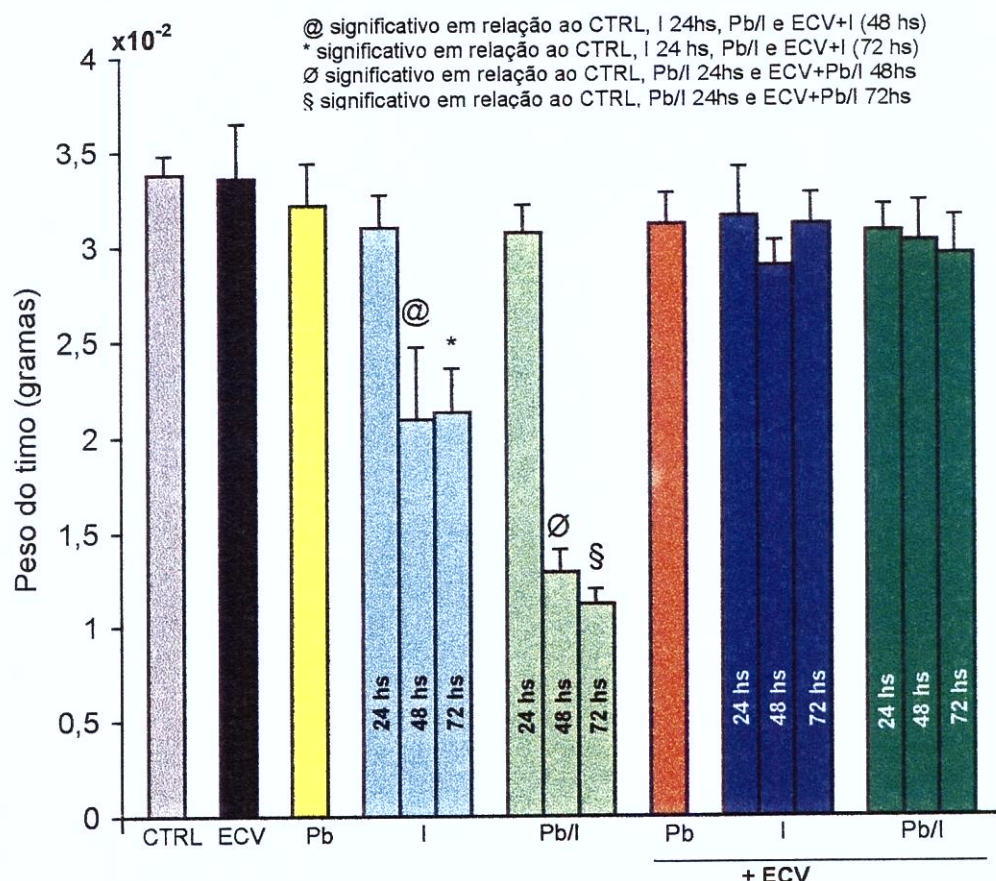


Figura 7. Estudo dos efeitos do ECV sobre o peso do timo de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. n=6, P < 0,05 ANOVA-Tukey.

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV (50 mg/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 Pb/infectados

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

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

5. Efeitos do ECV sobre a contagem diferencial de células da medula óssea:

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados nas tabelas 16, 17 e 18.

Como podemos observar nessas tabelas, a população de células da medula óssea de camundongos normais compõe-se de neutrófilos polimorfonucleares (69%), linfócitos (16%), promielócitos/mielócitos (12%) e mieloblastos (3%).

Quando tratamos esses camundongos com ECV, nenhuma alteração nestes valores foi observada. No entanto, o tratamento com chumbo aumentou a quantidade de células mais jovens como promielócitos/mielócitos de 12% para 23%, assim como o número de células em mitose. Por outro lado, essas alterações produzidas pelo chumbo não estavam presentes nos camundongos previamente tratados com ECV.

No grupo infectado, nas primeiras 24 horas observamos um decréscimo de neutrófilos PMN de 69% para 51%. Paralelamente, observou-se um aumento de mieloblastos de 3% para 9% e de promielócitos/mielócitos de 12% para 26%. Nas 48 horas após a infecção, a quantidade de neutrófilos PMN reduziu para 61%; entretanto, houve um acréscimo de mieloblastos (6%) e de promielócitos/mielócitos (21%). Nas 72 horas observamos alteração na quantidade de linfócitos, a qual foi reduzida de 16% para 7%. A celularidade nos camundongos infectados/expostos ao chumbo não apresentou diferenças em relação ao grupo apenas infectado. O tratamento com ECV dos animais infectados e infectados/expostos ao chumbo produziu uma contagem diferencial semelhante àquela observada para animais normais.

Tabela 16. Estudo dos efeitos do ECV sobre a contagem diferencial de células da medula óssea de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.

Contagem diferencial de células da medula óssea								
	Mieloblasto		Promielócito e Mielócito		Neutrófilo PMN e Metamielócito		Linfócito	
	%	Células $\times 10^5$	%	Células $\times 10^5$	%	Células $\times 10^5$	%	Células $\times 10^5$
CONTROLE	3	4,05	12	16,20	69	93,15	16	21,60
ECV	2	3,10	11	17,05	72	111,60	15	23,25
I	9	11,70	26	33,80	51	66,30	14	18,20
Pb	5	6,25	23	28,75	64	80,00	8	10,00
Pb/I	8	10,00	25	31,25	57	71,25	10	12,50
ECV+I	5	7,00	14	19,60	66	92,40	15	21,00
ECV +Pb	4	5,40	13	17,55	67	90,45	16	21,60
ECV+Pb/I	5	7,25	16	23,20	63	91,35	16	23,20

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV (50 mg/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 Pb/infectados

Tabela 17. Estudo dos efeitos do ECV sobre a contagem diferencial de células da medula óssea de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.

Contagem diferencial de células da medula óssea								
	Mieloblasto		Promielócito e Mielócito		Neutrófilo PMN e Metamielócito		Linfócito	
	%	Células $\times 10^5$	%	Células $\times 10^5$	%	Células $\times 10^5$	%	Células $\times 10^5$
CONTROLE	3	4,05	12	16,20	69	93,15	16	21,60
ECV	2	3,10	11	17,05	72	111,60	15	23,25
I	6	7,50	21	26,25	61	76,25	12	15,00
Pb	5	6,25	23	28,75	64	80,00	8	10,00
Pb/I	4	5,20	19	24,70	66	85,80	11	14,30
ECV+I	5	7,00	15	21,00	64	89,60	16	22,40
ECV+Pb	3	4,05	17	22,95	66	89,10	14	18,90
ECV+Pb/I	4	5,80	13	18,85	70	101,50	13	18,85

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV (50 mg/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

Pb/infectado

Tabela 18. Estudo dos efeitos do ECV sobre a contagem diferencial de células da medula óssea de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.

Contagem diferencial de células da medula óssea								
	Mieloblasto		Promielócito e Mielócito		Neutrófilo PMN e Metamielócito		Linfócito	
	%	Células $\times 10^5$	%	Células $\times 10^5$	%	Células $\times 10^5$	%	Células $\times 10^5$
CONTROLE	3	4,05	12	16,20	69	93,15	16	21,60
ECV	2	3,10	11	17,05	72	111,60	15	23,25
I	4	5,40	18	24,30	71	95,85	7	9,45
Pb	5	6,25	23	28,75	64	80,00	8	10,00
Pb/I	3	3,90	19	24,70	67	87,10	11	14,30
ECV+I	2	2,70	16	21,60	69	93,15	13	17,55
ECV+Pb	4	5,20	14	18,20	67	87,10	15	19,50
ECV+Pb/I	2	2,80	16	22,40	69	96,60	13	18,20

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV (50 mg/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

Pb/infectado



DISCUSSÃO

Os metais diferem de outros agentes tóxicos, pois não são sintetizados nem destruídos pelo homem. A maioria dos metais são distribuídos por todo o organismo, fixando-se a vários componentes celulares, de acordo com a sua natureza química. A interação entre o íon metálico livre e o sítio alvo resulta no efeito tóxico (SALGADO, 1996).

Estudos demonstram que o sistema hematopoiético é extremamente sensível a agentes tóxicos, como por exemplo o chumbo, uma vez que as células deste compartimento estão constantemente em multiplicação e diferenciação. Desta forma, exposição a agentes tóxicos pode resultar em uma alteração no número e função dessas células, como alterações mielotóxicas que se manifestam através da destruição de elementos sanguíneos, inibição da função de células maduras, destruição de precursores celulares ou ainda, redução do crescimento celular (METCALF, 1984). A ação mielotóxica do chumbo pode ser explicada, pelo menos em parte, por uma ação do chumbo sobre os radicais sulfidríla, pois estes são importantes nos processos fisiológicos celulares. Um grande número de processos dependentes de grupamentos sulfidríla são necessários para manter as funções da membrana celular, tais como secreção, fagocitose, transporte, comunicação intercelular e sinais de transdução a superfície. Essas interações celulares ocorrem através de ligações com receptores ricos em grupamentos sulfidríla localizados na membrana celular, que auxiliam a interação ligante/receptor. Tais receptores são, portanto, extremamente sensíveis a substâncias tóxicas com afinidade por radicais sulfidríla (PFEIFER & IRONS, 1985; SALGADO, 1996). Devido ao fato do chumbo interagir diretamente com grupamentos sulfidríla através de ligações covalentes com enxofre, ocorre um comprometimento das células hematopoiéticas, pois estas células

são dependentes de interações celulares para manterem seu crescimento e diferenciação em equilíbrio. Estes achados parecem estar relacionados aos efeitos mielossupressores do chumbo observados neste trabalho.

Um outro modelo de interação celular envolvido no comprometimento do sistema hematopoiético é a infecção com *Listeria monocytogenes*. Estudos demonstram que em animais infectados com este microrganismo há um decréscimo no número de células progenitoras, como macrófagos e neutrófilos, da medula óssea e um aumento na atividade estimuladora do soro (WING et al., 1984; CHEERS & STANLEY, 1988; DANTAS & QUEIROZ, 1999). Os polimorfonucleares, os monócitos teciduais e as células NK atuam no local da infecção através de fatores liberados pelos próprios fagócitos infectados como IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α , formando o foco infeccioso (ROGERS et al., 1992, 1994; LIU & CHEERS, 1993; MIELKE et al., 1993; TRIPP et al., 1993; KOPF et al., 1994; DALRYMPLE et al., 1995; HUNTER et al., 1995; LIU & KURLANDER, 1995; SKEEN & ZIEGLER, 1995; UNANUE, 1997). Desta forma, a migração das células fagocíticas originárias da medula óssea ao local de replicação da bactéria é um componente essencial à resposta primária da infecção com *Listeria monocytogenes* (NORTH, 1970; BENNET & BAKER, 1977; LEPAY et al., 1985; ROSEN et al., 1989). Nossos resultados corroboram estas informações uma vez que observamos um decréscimo no número de precursores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos da medula óssea e um aumento na atividade estimuladora do soro dos animais após infecção.

Um outro efeito observado foi a redução do peso do timo dos animais infectados e infectados/expostos ao chumbo. Estas alterações parecem estar

relacionadas a variações nos níveis de IL-6, induzidas pelo chumbo na presença da *Listeria monocytogenes*, uma vez que elevados níveis desta citocina podem induzir a produção de hormônios glicocorticóides, pela ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) (MASTORAKOS, CHROUSOS, WEBER, 1993; TERAQ, OIKAWA, SAITO, 1994). A secreção destes fatores pelos organismos infectados ocorre em resposta aos mecanismos de defesa ativados pelo estresse (LAZAR et al., 1995), resultando na involução de órgãos linfóides, como o baço e timo (KISHIKAWA et al., 1997).

BINCOLETTO & QUEIROZ (1996), relataram que animais infectados com esta bactéria quando expostos ao chumbo apresentam uma diminuição da resistência. Isto parece estar relacionado ao comprometimento da resposta imunológica devido a ação mielotóxica do chumbo sobre macrófagos e neutrófilos em estágio de crescimento e diferenciação, os quais são essenciais para a resistência inicial dos animais infectados com este microrganismo. Estudos demonstram que o chumbo parece interferir também na imunidade específica do hospedeiro, reduzindo os níveis de IFN- γ , que é a citocina efetora da ativação do macrófago, inibindo, desta forma, a apresentação de antígenos às células T CD4⁺ e CD8⁺, as quais atuarão de maneira específica na erradicação da infecção (TIAN & LAWRENCE 1995; KISHIKAWA et al., 1997). Nossos resultados confirmam estes achados, visto que o comprometimento da resposta imunológica em animais infectados quando expostos ao chumbo foi significativamente maior quando comparado ao grupo de animais apenas infectados.

No decorrer dos últimos anos, a *Chlorella vulgaris* tem despertado o interesse da comunidade científica por exercer seus efeitos sobre as defesas do hospedeiro.

Muitos autores têm relatado o sucesso obtido com a administração do extrato de *Chlorella vulgaris* (ECV) em animais portadores de infecções virais e bacterianas. Neste sentido, DANTAS & QUEIROZ (1999) demonstraram que a *Chlorella vulgaris* é capaz de ativar as células NK e aumentar citocinas do tipo Th1 (IL-1 e IFN- γ), aumentando a resistência dos animais à infecção com *Listeria monocytogenes*. HASEGAWA et al. (1997), também demonstraram que a administração oral do ECV a camundongos C57BL/6, uma linhagem resistente à *Listeria monocytogenes*, aumentou os níveis de IFN- γ , IL-2, IL-1 α e TNF- α em camundongos normais e nos portadores da Síndrome Murina de Imunodeficiência Adquirida (MAIDS), ambos infectados com essa bactéria. Também foi observado uma ausência de efeitos do ECV sobre a liberação de IL-10 (QUEIROZ et al. – submetido para publicação), que pode ser considerada positiva, uma vez que esta citocina parece suprimir a imunidade celular na listeriose, através da 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; WAGNER et al., 1994; KELLY & BANCROFT, 1996). Estes achados parecem estar relacionados aos efeitos protetores do ECV em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* como observado em trabalhos anteriores do grupo (DANTAS & QUEIROZ, 1999; QUEIROZ et al. – submetido para publicação).

Um outro efeito imunomodulador do ECV sobre os precursores hematopoiéticos da medula óssea foi observado neste trabalho. Em animais expostos ao chumbo, esta alga demonstrou capacidade para a quelatação de metais. Apesar da ausência de dados na literatura sobre a atividade quelante da *Chlorella vulgaris* em estudos “in vivo”, os estudos com a *Chlorella vulgaris* em ambientes aquáticos demonstrando a

capacidade desta alga em quelar metais como chumbo, cádmio, cromo e níquel apoiam nossa hipótese (WILDE & BENEMANN, 1993; LUSTIGMAN et al., 1995; WONG et al., 1997; CARR et al., 1998; LÓPEZ et al., 1998; MATSUNAGA et al., 1999).

A capacidade da *Chlorella vulgaris* na quelação do chumbo parece estar relacionada a um componente celular, denominado cloroplasto. WONG et al. (1997), demonstraram que após exposição ao chumbo, a parede celular desta alga sofre uma rápida deterioração devido ao acúmulo do metal nesta organela, desta forma a afinidade do chumbo pelo cloroplasto parece estar relacionada a presença do íon enxofre em sua constituição. Nossos resultados demonstraram que a administração da *Chlorella vulgaris* reverte a mielossupressão induzida pelo chumbo, sugerindo que o cloroplasto presente na membrana celular desta alga é capaz de se ligar ao chumbo, antes que o mesmo se complexe aos radicais sulfidríla presentes na membrana das células.

Um grande número de compostos sintéticos são empregados na terapêutica para a quelação de metais, tais como o 2,3-Dimercaptopropanolol (British anti-Lewisite, BAL), o ácido 2,3-Dimercaptosuccínico (DMSA), a D-penicilina e o edetato dissódico de cálcio (CaNa_2EDTA). Dentre eles o DMSA é utilizado com sucesso na terapêutica da quelação do chumbo, mercúrio e arsênico, especialmente no que se refere a intoxicação de crianças, devido a sua toxicidade relativamente baixa, fácil administração e principalmente por sua menor quelação de nutrientes essenciais (BESUNDER, SUPER, ANDERSON, 1997; KOSNETT & BECKER, 1998). Apesar do uso de quelantes no tratamento das intoxicações por metais ser eficaz, estes agentes não são destituídos de toxicidade sistêmica, pois agem de forma

inespecífica e podem quelar também nutrientes essenciais ao organismo tais como o molibdênio, cobre, zinco, manganês, ferro, cálcio e magnésio, os quais são vitais para a integridade das funções fisiológicas normais do organismo (GOMES, 1977; KOSNETT & BECKER, 1998). Desta forma, a descoberta de compostos menos tóxicos, como o uso de substâncias de origem natural, a fim de se obter um método alternativo na terapêutica medicamentosa objetivando um efeito quelante específico com o mínimo de efeitos colaterais se faz necessário.

Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho sobre a resposta hematopoiética sugerem que o ECV exerce uma ação quelante em animais expostos ao chumbo, assim como uma ação estimuladora sobre o sistema imune em animais infectados ou infectados/expostos ao chumbo, deixando evidente que esta alga é capaz de ativar o sistema imunológico destes animais e também de diminuir a toxicidade medular induzida pelo chumbo. Estes dados foram confirmados quando avaliamos a resistência dos animais, visto que o tratamento com ECV produziu uma maior resistência nos animais infectados e infectados expostos ao chumbo, sendo que observamos uma sobrevida de 30% nos animais infectados e de 20% nos infectados/expostos ao chumbo em relação ao grupo de animais controle, cuja taxa de sobrevida foi nula.

Diante destes resultados, podemos sugerir que a administração do extrato de *Chlorella vulgaris*, pode ser útil como uma terapia alternativa para pacientes expostos ao chumbo, minimizando os efeitos tóxicos causados por este metal. Novos estudos “in vivo”, avaliando as propriedades quelantes da *Chlorella vulgaris* na presença de metais são necessários, uma vez que esta alga poderia auxiliar com sucesso a terapia quelante.



CONCLUSÕES

O presente estudo sobre os efeitos protetores da administração do extrato de *Chlorella vulgaris* (ECV) em animais expostos ao chumbo e infectados com *Listeria monocytogenes*, demonstrou:

- aumento no número de precursores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea, reduzindo a mielossupressão induzida pelo chumbo, infecção ou infecção/chumbo;
 - prevenção da hematopoiese extramedular nos animais infectados;
 - aumento na atividade estimuladora do soro de animais tratados com ECV.
- Um aumento nos níveis de CSFs também foi observado nos animais expostos ao chumbo, infectados e infectados/expostos ao chumbo, quando previamente tratados com o ECV;
- aumento de 30% na sobrevivência de animais infectados e de 20% nos infectados/expostos ao chumbo, quando os mesmos foram tratados com ECV;
 - normalização no peso do timo em animais infectados e infectados/expostos ao chumbo/ e no peso do baço em animais infectados, quando tratados com ECV.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. – Conversão de Energia: Mitocôndrias e Cloroplastos. In:_____ - **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre, Artes Médicas, 1997. p.653-720.
- BENNETT, M. & BAKER, E.E. – Marrow-dependent cell function in early stages of infection with *Listeria monocytogenes*. **Cell Immun.**, **33**: 203-210, 1977.
- 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. – The effect of lead acetate on the immune response in mice. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, **61**: 18-26, 1981.
- 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.
- CHEERS, C. & STANLEY, E.R. – Macrophage production during murine listeriosis: colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and CSF-1-binding cells in genetically resistant and susceptible mice. **Infect. Immun.**, **56**: 274-251, 1988.
- COLLET, D. – Modeling survival data in medical research. In:_____ - **Texts in Statistical Science**. London, Chapman & Hall, 1994. p.1-13.
- DALRYMPLE, S.A.; LUCIAN, L.A.; SLATTERY, R.; McNEIL, T.; AUD, D.M.; FUCHINO, S.; LEE, F.; MURRAY, R. – Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: correlation with inefficient neutrophilia. **Infect. Immun.**, **63**: 2262-2268, 1995.

- 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. & 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.
- DRAMSI, S.; LEVI, S.; TROLLER, A.; COSSART, P. – Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an *in vitro* study. **Infect. Immun.**, **66**: 4461-4468, 1998.
- FORMAN, H.J. & THOMAS, M.J. – Oxidant production and bactericidal activity in phagocytes. **Annu. Rev. Physiol.**, **48**: 662-669, 1986.
- 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.
- FUKATA, J.; IMURA, H.; NAKAO, K. – Cytokines as mediators in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical function. **J. Endocrinol. Invest.**, **16**: 141-155, 1993.
- GOMES, J.R. – Tratamento da intoxicação pelo chumbo. **Rev. Bras. Saúde Ocup.**, **18**: 35-38, 1977.
- GREGORY, S.H. & WING, E.J. – Macrophage colony-stimulating factor and the enhanced migration of monocytes are essential in primary but not secondary host defenses to *Listeria* organisms. **J. Infect. Dis.**, **168**: 934-942, 1993.
- 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.; 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.; YOSHIKAI, Y.; OKUDA, M.; NOMOTO, K. – Accelerated restoration of the leukocyte number and augmentation resistance against *Escherichia coli* in cyclophosphamide-treated rats orally administered with a hot water extract of *Chlorella vulgaris*. **Int. J. Immunopharmacol.**, **12**: 883-891, 1990.
- HAVELL, E.A. & SEHGAL, P.B. – Tumor necrosis factor-independent IL-6 production during murine Listeriosis. **J. Immunol.**, **146**: 756-761, 1991.
- HUME, D.A.; PAVLI, P.; DONAHUE, R.E.; FIDLER, I.J. – The effect of human recombinant macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) on the murine mononuclear phagocyte in vivo. **J. Immunol.**, **141**: 3405-3409, 1988.
- HUNTER, C.A.; CHIZZONITE, R.; REMINGTON, J.S. – IL-1 β is required for IL-12 to induce production of IFN- γ by NK cells. **J. Immunol.**, **155**: 4347-4354, 1995.
- IBUSUKI, K. & MINAMISHIMA, Y. – Effects of *Chlorella vulgaris* extract on murine cytomegalovirus infections. **Nat. Immun. Cell. Growth Regul.**, **9**: 121-128, 1990.

- KAUFMANN, S.H.E. – Immunity to intracellular bacteria. **Annu. Rev. Immunol.**, **11**: 129-163, 1993.
- KELLY, J.P. & BANCROFT, G.J. – Administration of interleukin-10 abolishes innate resistance to *Listeria monocytogenes*. **Eur. J. Immunol.**, **26**: 356-364, 1996.
- KISHIKAWA, H.; SONG, R.; LAWRENCE, A. – Interleukin-12 promoters enhanced resistance to *Listeria monocytogenes* infection of lead-exposed mice. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, **147**: 180-189, 1997.
- KLAASSEN, C.D. – Metais pesados e antagonistas de metais pesados. In: GILMAN, A.G. – **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996. p.1223-1239.
- KONISHI, F.; TANAKA, K.; KUMAMOTO, S.; HASEGAWA, T.; OKUDA, M.; YANO, I.; YIOSHIKAI, 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.
- KOPF, M.; BAUMANN, H.; FREER, G.; FREUDENBERG, M.; LAMBERS, M.; KISHIMOTO, T.; ZINKERNAGEL, R.; BLUETHMANN, H.; KOHLER, G. – Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6 deficient mice. **Nature**, **368**: 339-342, 1994.
- KOSNETT, M.J. & BECKER, C.E. – Chelators & heavy metal intoxication. In: KATZUNG, B.G. – **Basic & Clinical Pharmacology**. 7.ed. Cidade, Appleton & Lange Stanford, 1998. p.956-967.

- 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.
- LAZAR, G.; LAZAR, G.Jr.; HUSZTIK, E.; DUDA, E.; AGARWAL, M.K. – The influence of antiglucocorticoids on stress and shock. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, **761**: 276-295, 1995.
- LEPAY, D.A.; STEINMAN, R.M.; NATHAN, C.F.; MURRAY, H.W.; CHON, Z.A. – Liver macrophages in murine listeriosis: cell-mediated immunity is correlated with an influx of macrophages capable of generating reactive oxygen intermediates. **J. Exp. Med.**, **161**: 1503-1512, 1985.
- LIU, W. & KURLANDER, R.J. – Analysis of the interrelationship between IL-12, TNF- α , and IFN- γ production during listeriosis. **Cell. Immunol.**, **163**: 260-267, 1995.
- LIU, Z. & CHEERS, C. – The cellular source of interleukin-6 during *Listeria* infection. **Infect. Immun.**, **61**: 2626-2631, 1993.
- 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.
- MACKANESS, G. B. – Cellular resistance. **J. Exp. Med.**, **116**: 381-390, 1962.
- MASTORAKOS, G.; CHROUSOS, G.P.; WEBER, J.S. – Recombinant interleukin-6 activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **77**: 1690-1694, 1993.

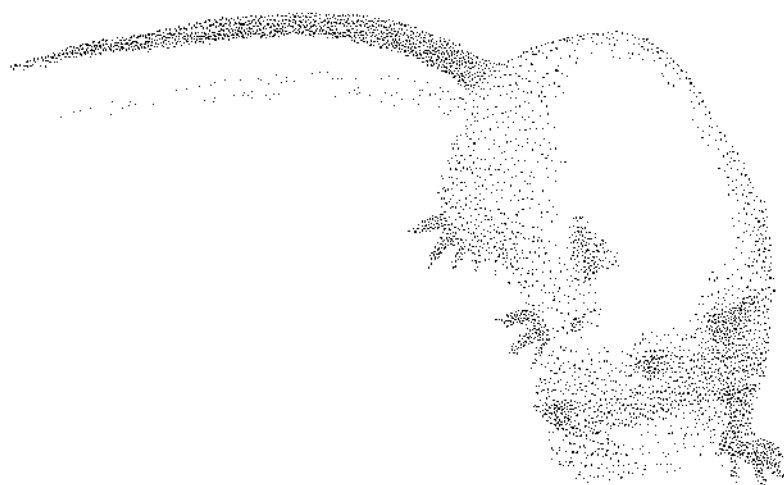
- MATSUNAGA, T.; TAKEYAMA, H.; NAKAO, T.; YAMAZAWA, A. – Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. **J. Biotech.**, **70**: 33-38, 1999.
- McCABE, M.J. & LAWRENCE, D.A. – Lead, a major environmental pollutant, is immunomodulatory by its differential effects on CD4⁺ T cell subsets. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, **111**: 13-23, 1991.
- METCALF, D. – Haemopoietic growth factors 1. **Lancet**, **8642**: 825-827, 1989.
- METCALF, D. – The bioassay of colony stimulating factors. In:_____ - **The hemopoietic colony stimulating factors**. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier, 1984. p.187-213.
- MIELKE, M.E.A.; EHLERS, S.; HAHN, H. – The role of cytokines in experimental listeriosis. **Immunobiol.**, **189**: 285-315, 1993.
- MOMBAERTS, P.; ARNOLDI, J.; RUSS, F.; TONEGAWA, S.; KAUFMANN, S.H.E. – Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. **Nature**, **365**: 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.
- NISHIBORI, T.; XIONG, H.; KAWAMURA, I.; ARAKAWA, M.; MITSUYAMA, M. – Induction of cytokine gene expression by Listeriolysin O and roles of macrophages and NK cells. **Infect Immun.**, **64**: 3188-3195, 1996.
- 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.
- NODA, K.; OHNO, N.; TANAKA, K.; KAMIYA, N.; OKUDA, M.; YADOMAE, T.; NOMOTO, K.; SHOYAMA, Y. – A water soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. **Planta Med.** **2**: 423-426, 1996.
- NORTH, R.J. – The relative importance of blood monocytes and fixed macrophages to the expression on cell-mediated immunity of infection. **J. Exp. Med.**, **132**: 521-534, 1970.
- PFEIFER, R.W. & IRONS, R.D. – Mechanism of sulfhydryl-dependent Immunotoxicity. Immunotoxicol. Immunopharmacol. Raven Press, New York, 1985.
- PORE, R.S. - Detoxification of chlordecone poisoned rats with *Chlorella* and *Chlorella* derived sporopollenin. **Drug Chem. Toxicol.**, **7**: 57-71, 1984.
- QUEIROZ, M.L.S. – Células pluripotenciais em cultura: revisão bibliográfica. **Ciência e Cultura**, **40**: 421-426, 1988.
- QUEIROZ, M.L.S.; BINCOLETTTO, C.; VALADARES, M.C.; DANTAS, D.C.M. – Effects of *Chlorella vulgaris* on the citokines production in mice infected with *Listeria monocytogenes* – submetido para publicação.
- ROGERS, H.W.; SHEEHAN, K.C.F.; BRUNT, L.M.; DOWER, S.K.; UNANUE, E.R.; SCHREIBER, R.D. – Interleukin-1 participates in the development of anti-*Listeria* responses in both normal and scid mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **89**: 1011-1015, 1992.

- ROGERS, H.W.; TRIPP, C.S.; SCHREIBER, R.D.; UNANUE, E.R. – Endogenous IL-1 is required for neutrophil recruitment and macrophage activation during murine listeriosis. **J. Immunol.**, **153**: 2093-2101, 1994.
- ROSEN, H.; GORDON, S.; NORTH, R.J. – Exacerbation of murine listeriosis by a monoclonal antibody specific for type 3 complement receptor of myelomonocytic cells: absence of monocytes at ineffective foci allows *Listeria* to multiply in non phagocytic cells. **J. Exp. Med.**, **170**: 27-37, 1989.
- SALGADO, P.E.T. – Toxicologia dos metais. In: OGA, S. – **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo, Atheneu, 1996. p.153-172.
- SCHVARTSMAN, S. – Metais e correlatos. In: _____ - **Intoxicações agudas**. 4.ed. São Paulo, Sarvier, 1991. p.208-234.
- SKEEN, M. & ZIEGLER, H.K. – Activation of $\gamma\delta$ T cells for production of IFN- γ is mediated by bacteria via macrophage-derived cytokines IL-1 and IL-12. **J. Immunol.**, **154**: 5832-5841, 1995.
- SOUTHWICK, F.S. & PURICH, D.L. – Intracellular pathogenesis of listeriosis. **New Engl. J. Med.**, **334**: 770-776, 1996.
- STEVENSON, M.M.; KONGSHAVN, P.A.L.; SKAMENE, E. – Genectic linkage of resistance to *Listeria monocytogenes* with macrophage inflammatory responses. **J. Immunol.**, **127**: 402-407, 1981.
- 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.; TOMITA, Y.; TSURUTA, M.; KONISHI, F.; OKUDA, M.; HIMENO, K.; NOMOTO, K. – Oral administration of *Chlorella vulgaris* augments concomitant antitumor immunity. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, **12**: 277-291, 1990.
- 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.
- TERAO, A.; OIKAWA, M.; SAITO, M. – Tissue-specific increase in norepinephrine turnover by central interleukin-1, but not by interleukin-6, in rats. **Am. J. Physiol.**, **266**: R400-R404, 1994.
- TIAN, L. & LAWRENCE, D.A. – Lead inhibits nitric oxide production *in vitro* by murine splenic macrophages. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, **132**: 156-163, 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.
- UNANUE, E.R. – Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance. **Curr. Opin. Immunol.**, **9**: 35-43, 1997.
- VAN DEN ENGH, G.J. & BOL, S. – The presence of a CSF enhancing activity in the serum of endotoxin treated mice. **Cell. Tiss. Kinet.**, **8**: 579-587, 1975.
- WAGNER, R. D.; MAROUSER, N.M.; BROWN, J.F.; CZUPRYNSKI, C.J. – Treatment with anti interleukin-10 monoclonal antibody enhances early but

- impairs complete clearance of *Listeria monocytogenes* infection in mice. **Infect. Immun.**, **62**: 2345-2353, 1994.
- WESTERMAN, M.P.; PFITZER, E.; ELLIS, L.D. – Concentrations of lead in blood in plumbism. **New Engl. J. Med.**, **273**: 1246-1250, 1965.
- WILDE, E.W. & BENEMANN, J.R. – Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. **Biotech. Adv.**, **11**: 781-812, 1993.
- WING, E.J.; BARBCZYNSKI, L.K.; WAHEED, A.; SHADDUCK, R.K. – Effect of *Listeria monocytogenes* infection on serum levels of colony-stimulating factor and number of progenitor cells in immune and non-immune animals. **Infect. Immun.**, **49**: 325-328, 1985.
- WING, E.J.; MAGEE, D.M.; BARBCZYNSKI, L.K. – Analysis of colony-stimulating factors and macrophage progenitor cells in mice immunized against *Listeria monocytogenes* by adoptive transfer. **Infect. Immun.**, **55**: 1843-1847, 1987.
- WING, E.J.; WAHEED, A.; SHADDUCK, R.K. – Changes in serum colony-stimulating factor and monocytic progenitor cells during *Listeria monocytogenes* infection in mice. **Infect Immun.**, **45**: 180-184, 1984.
- 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.
- YOUNG, A.M. & CHEERS, C. – Colony-forming cells and colony-stimulating activity during listeriosis in genetically resistant or susceptible mice. **Cell. Immunol.**, **97**: 227-237, 1986.



APÊNDICE

Tabela 1. Estudo dos efeitos do ECV sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.

CFU-GM/FÊMUR								
Parâmetros x 10 ³								
N	Controle	ECV	I	Pb	Pb/I	ECV+I	ECV+Pb	ECV+Pb/I
1	15,96	17,70	15,82	5,33	7,38	14,56	15,66	15,97
2	18,00	14,88	14,73	5,52	6,97	14,16	14,55	16,34
3	18,45	14,61	13,78	6,44	7,29	18,13	14,40	14,04
4	15,12	15,73	16,97	4,73	5,98	15,96	12,54	13,92
5	13,38	16,20	13,64	7,08	8,10	15,99	15,26	15,86
6	14,69	15,81	14,21	4,88	8,00	14,31	15,21	12,65
$\bar{X}$	15,93	15,82	14,86	5,66	7,29	15,52	14,60	14,80
DP	1,97	1,10	1,30	0,92	0,77	1,51	1,12	1,47

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV
(50 mg/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
Pb/infectados

Tabela 2. Estudo dos efeitos do ECV sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.

CFU-GM/FÊMUR								
Parâmetros x 10 ³								
N	Controle	ECV	I	Pb	Pb/I	ECV+I	ECV+Pb	ECV+Pb/I
1	15,96	17,70	8,06	5,33	3,63	16,20	15,66	15,34
2	18,00	14,88	7,54	5,52	4,49	15,12	14,55	13,86
3	18,45	14,61	7,25	6,44	3,64	14,69	14,40	13,50
4	15,12	15,73	6,35	4,73	3,15	12,46	12,54	14,04
5	13,38	16,20	5,88	7,08	4,73	15,52	15,26	14,85
6	14,69	15,81	7,54	4,88	4,51	13,08	15,21	13,80
$\overline{X}$	15,93	15,82	7,10	5,66	4,03	14,51	14,60	14,23
DP	1,97	1,10	0,82	0,92	0,64	1,45	1,12	0,71

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV
(50 mg/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
Pb/infectados

Tabela 3. Estudo dos efeitos do ECV sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal – i.p.). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.

CFU-GM/FÊMUR								
Parâmetros x 10 ³								
N	Controle	ECV	I	Pb	Pb/I	ECV+I	ECV+Pb	ECV+Pb/I
1	15,96	17,70	10,66	5,33	5,28	15,52	15,66	15,86
2	18,00	14,88	8,54	5,52	5,46	15,34	14,55	17,26
3	18,45	14,61	8,52	6,44	3,77	15,99	14,40	15,39
4	15,12	15,73	10,80	4,73	3,51	14,04	12,54	15,66
5	13,38	16,20	9,75	7,08	5,41	13,56	15,26	12,63
6	14,69	15,81	9,36	4,88	4,50	15,08	15,21	13,39
$\bar{X}$	15,93	15,82	9,61	5,66	4,66	14,92	14,60	15,03
DP	1,97	1,10	0,99	0,92	0,86	0,93	1,12	1,71

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV
(50 mg/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
Pb/infectados

Tabela 4. Estudo dos efeitos do ECV sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos do baço de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.

CFU-GM/BAÇO								
Parâmetros x 10 ²								
N	Controle	ECV	I	Pb	Pb/I	ECV+I	ECV+Pb	ECV+Pb/I
1	7,56	3,87	18,72	6,84	12,15	6,48	11,07	3,78
2	12,96	7,02	5,58	7,20	7,83	9,99	11,34	3,87
3	7,02	6,84	5,76	3,69	5,40	12,96	3,87	6,84
4	9,99	3,78	12,60	7,56	10,80	9,45	7,20	7,38
5	7,38	10,26	9,45	3,51	7,02	7,38	3,60	9,72
6	6,39	3,69	14,58	3,60	5,04	10,53	7,02	10,53
$\bar{X}$	8,55	5,91	11,12	5,40	8,04	9,47	7,35	7,02
DP	2,49	2,63	5,18	1,99	2,88	2,32	3,35	2,84

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV
(50 mg/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
Pb/infectados

Tabela 5. Estudo dos efeitos do ECV sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos do baço de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.

CFU-GM/BAÇO								
Parâmetros x 10 ²								
N	Controle	ECV	I	Pb	Pb/I	ECV+I	ECV+Pb	ECV+Pb/I
1	7,56	3,87	62,10	6,84	10,44	3,78	11,07	11,70
2	12,96	7,02	81,00	7,20	8,37	14,04	11,34	9,72
3	7,02	6,84	72,45	3,69	16,38	7,38	3,87	6,30
4	9,99	3,78	102,6	7,56	11,70	3,87	7,20	5,94
5	7,38	10,26	100,80	3,51	10,08	10,80	3,60	3,51
6	3,69	3,69	65,34	3,60	14,58	10,53	7,02	7,74
$\bar{X}$	8,55	5,91	80,72	5,40	11,93	8,40	7,35	7,49
DP	2,49	2,63	17,51	1,99	3,01	4,12	3,35	2,91

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV
(50 mg/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
Pb/infectados

Tabela 6. Estudo dos efeitos do ECV sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos do baço de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal – i.p.). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.

CFU-GM/BAÇO								
Parâmetros x 10 ²								
N	Controle	ECV	I	Pb	Pb/I	ECV+I	ECV+Pb	ECV+Pb/I
1	7,56	3,87	54,00	6,84	14,40	3,96	11,07	5,94
2	12,96	7,02	90,72	7,20	3,51	7,38	11,34	7,56
3	7,02	6,84	75,60	3,69	6,84	11,34	3,87	11,52
4	9,99	3,78	73,71	7,56	9,45	7,74	7,20	10,26
5	7,38	10,26	98,28	3,51	7,20	7,20	3,60	9,36
6	3,69	3,69	66,24	3,60	6,84	3,87	7,02	7,38
$\bar{X}$	8,55	5,91	76,43	5,40	8,04	6,92	7,35	8,67
DP	2,49	2,63	16,10	1,99	3,65	2,78	3,35	2,07

CTRL: controle
ECV: tratados com ECV
 (50 mg/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
 Pb/infectados

Tabela 7. Estudo dos efeitos do ECV sobre a produção de fatores estimuladores de colônias em animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). O soro dos animais foi coletado 24 horas após a infecção.

Fatores estimuladores de colônias								
Unidades/mL								
N	Controle	ECV	I	Pb	Pb/I	ECV+I	ECV+Pb	ECV+Pb/I
1	1,0	4,5	9,7	0,7	9,8	14,7	4,5	14,7
2	0,5	3,3	10,8	0,3	9,3	16,0	3,3	12,5
3	1,2	4,0	8,2	1,2	7,2	15,2	3,8	11,5
4	0,7	3,0	10,0	0,2	7,7	14,2	4,2	14,0
5	0,8	3,8	9,0	0,8	8,7	15,0	3,2	11,9
6	1,3	4,8	8,5	1,5	9,2	15,7	4,7	11,0
$\bar{X}$	0,9	3,9	9,4	0,8	8,7	15,1	4,0	12,6
DP	0,3	0,7	1,0	0,5	1,0	0,7	0,6	1,5

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV
(50 mg/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
Pb/infectados

Tabela 8. Estudo dos efeitos do ECV sobre a produção de fatores estimuladores de colônias em animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). O soro dos animais foi coletado 48 horas após a infecção.

Fatores estimuladores de colônias								
Unidades/mL								
N	Controle	ECV	I	Pb	Pb/I	ECV+I	ECV+Pb	ECV+Pb/I
1	1,0	4,5	13,5	0,7	12,0	19,3	4,5	19,2
2	0,5	3,3	14,3	0,3	11,5	20,5	3,3	16,3
3	1,2	4,0	11,8	1,2	10,8	18,0	3,8	17,2
4	0,7	3,0	14,0	0,2	11,7	19,7	4,2	18,5
5	0,8	3,8	12,7	0,8	11,0	18,7	3,2	16,7
6	1,3	4,8	12,3	1,5	10,5	20,0	4,7	16,5
$\bar{X}$	0,9	3,9	13,1	0,8	11,3	19,4	4,0	17,4
DP	0,3	0,7	1,0	0,5	0,6	0,9	0,6	1,2

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV
(50 mg/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
Pb/infectados

Tabela 9. Estudo dos efeitos do ECV sobre a produção de fatores estimuladores de colônias em animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). O soro dos animais foi coletado 72 horas após a infecção.

Fatores estimuladores de colônias								
Unidades/mL								
N	Controle	ECV	I	Pb	Pb/I	ECV+I	ECV+Pb	ECV+Pb/I
1	1,0	4,5	5,8	0,7	7,0	11,5	4,5	11,3
2	0,5	3,3	7,3	0,3	6,5	12,7	3,3	12,0
3	1,2	4,0	6,5	1,2	5,7	11,0	3,8	9,8
4	0,7	3,0	5,5	0,2	6,3	11,3	4,2	10,3
5	0,8	3,8	6,8	0,8	6,7	12,3	3,2	11,7
6	1,3	4,8	6,2	1,5	6,0	12,8	4,7	10,8
$\bar{X}$	0,9	3,9	6,4	0,8	6,4	11,9	4,0	11,0
DP	0,3	0,7	0,7	0,5	0,5	0,8	0,6	0,8

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV
(50 mg/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
Pb/infectados

Tabela 10. Estudo dos efeitos do ECV sobre o peso do baço de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.

PESO DO BACO (gramas)								
Parâmetros x 10⁻²								
N	Controle	ECV	I	Pb	Pb/I	ECV+I	ECV+Pb	ECV+Pb/I
1	20,0	18,8	23,8	19,1	19,5	18,3	16,4	18,6
2	18,7	20,1	20,9	17,9	21,0	18,4	18,2	19,8
3	20,7	18,5	21,5	19,7	20,7	20,2	19,7	20,0
4	18,0	19,1	22,3	18,3	21,2	19,5	18,3	18,2
5	19,3	19,7	22,0	17,4	18,9	17,8	21,7	18,9
6	19,2	18,5	23,2	19,5	20,4	19,1	16,8	17,9
$\bar{X}$	19,3	19,1	22,3	18,7	20,3	18,9	18,5	18,9
DP	0,9	0,7	1,1	0,9	0,9	0,9	2,0	0,9

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV
(50 mg/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
Pb/infectados

Tabela 11. Estudo dos efeitos do ECV sobre o peso do baço de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.

PESO DO BAÇO (gramas)								
Parâmetros x 10⁻²								
N	Controle	ECV	I	Pb	Pb/I	ECV+I	ECV+Pb	ECV+Pb/I
1	20,0	18,8	27,2	19,1	17,5	21,1	16,4	20,1
2	18,7	20,1	23,3	17,9	20,0	19,2	18,2	20,7
3	20,7	18,5	30,0	19,7	18,2	20,7	19,7	17,4
4	18,0	19,1	29,4	18,3	16,9	21,5	18,3	19,6
5	19,3	19,7	26,9	17,4	19,7	21,0	21,7	19,2
6	19,2	18,5	28,3	19,5	18,6	20,3	16,8	17,8
$\bar{X}$	19,3	19,1	27,5	18,7	18,5	20,6	18,5	19,1
DP	0,9	0,7	2,4	0,9	1,2	0,8	2,0	1,30

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV
(50 mg/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
Pb/infectados

Tabela 12. Estudo dos efeitos do ECV sobre o peso do baço de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.

PESO DO BAÇO (gramas)								
Parâmetros x 10 ⁻²								
N	Controle	ECV	I	Pb	Pb/I	ECV+I	ECV+Pb	ECV+Pb/I
1	20,0	18,8	22,9	19,1	18,0	21,3	16,4	19,4
2	18,7	20,1	26,7	17,9	19,5	20,0	18,2	18,1
3	20,7	18,5	26,3	19,7	20,3	21,1	19,7	19,0
4	18,0	19,1	26,7	18,3	18,9	22,3	18,3	21,2
5	19,3	19,7	31,1	17,4	21,1	20,5	21,7	19,5
6	19,2	18,5	24,3	19,5	19,0	20,3	16,8	17,1
$\bar{X}$	19,3	19,1	26,3	18,7	19,5	20,9	18,5	19,1
DP	0,9	0,7	2,8	0,9	1,1	0,8	2,0	1,4

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV
(50 mg/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
Pb/infectados

Tabela 13. Estudo dos efeitos do ECV sobre o peso do timo de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.

PESO DO TIMO (gramas)								
Parâmetros x 10 ⁻²								
N	Controle	ECV	I	Pb	Pb/I	ECV+I	ECV+Pb	ECV+Pb/I
1	3,54	3,20	3,21	3,22	2,82	3,12	3,41	3,20
2	3,39	2,98	3,15	3,38	3,11	3,45	2,95	2,99
3	3,27	3,80	2,89	2,81	3,25	2,85	3,12	3,15
4	3,30	3,36	2,91	3,20	2,98	3,50	3,16	3,10
5	3,45	3,24	3,17	3,41	3,08	2,97	2,99	2,84
6	3,33	3,57	3,29	3,28	3,16	3,08	3,07	3,19
$\overline{X}$	3,38	3,36	3,10	3,22	3,07	3,16	3,12	3,08
DP	0,10	0,29	0,17	0,22	0,15	0,26	0,16	0,14

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV (50 mg/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 Pb/infectados

Tabela 14. Estudo dos efeitos do ECV sobre o peso do timo de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.

PESO DO TIMO (gramas)								
Parâmetros x 10⁻²								
N	Controle	ECV	I	Pb	Pb/I	ECV+I	ECV+Pb	ECV+Pb/I
1	3,54	3,20	2,69	3,22	1,21	2,87	3,41	2,80
2	3,39	2,98	1,81	3,38	1,19	2,82	2,95	3,30
3	3,27	3,80	1,79	2,81	1,43	3,10	3,12	2,89
4	3,30	3,36	1,94	3,20	1,27	3,00	3,16	2,84
5	3,45	3,24	2,42	3,41	1,33	2,75	2,99	3,22
6	3,33	3,57	1,88	3,28	1,40	2,84	3,07	3,14
$\bar{X}$	3,38	3,36	2,09	3,22	1,31	2,90	3,12	3,03
DP	0,10	0,29	0,38	0,22	0,10	0,13	0,16	0,21

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV
(50 mg/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
Pb/infectados

Tabela 15. Estudo dos efeitos do ECV sobre o peso do timo de animais BALB/c expostos ao acetato de chumbo (1300 ppm) durante 10 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (4×10^4 bactérias/animal - i.p.). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.

PESO DO TIMO (gramas)								
Parâmetros x 10 ⁻²								
N	Controle	ECV	I	Pb	Pb/I	ECV+I	ECV+Pb	ECV+Pb/I
1	3,54	3,20	2,35	3,22	1,09	3,24	3,41	3,18
2	3,39	2,98	1,84	3,38	1,23	3,19	2,95	2,98
3	3,27	3,80	1,96	2,81	1,02	2,95	3,12	2,77
4	3,30	3,36	1,99	3,20	1,12	3,28	3,16	2,75
5	3,45	3,24	2,26	3,41	1,20	2,89	2,99	3,21
6	3,33	3,57	2,37	3,28	1,05	3,15	3,07	2,88
$\bar{X}$	3,38	3,36	2,13	3,22	1,12	3,12	3,12	2,96
DP	0,10	0,29	0,23	0,22	0,08	0,16	0,16	0,20

CTRL: controle

ECV: tratados com ECV
(50 mg/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
Pb/infectados