ANDRÉIA DOS SANTOS RESTA

Avaliação do efeito do extrato seco de *Spirulina sp* nas células progenitoras da medula óssea de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*

CAMPINAS

2004

ANDRÉIA DOS SANTOS RESTA

Avaliação do efeito do extrato seco de *Spirulina sp* nas células progenitoras da medula óssea de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

ORIENTADORA: *PROFA. DRA. MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ*

CAMPINAS

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

R313a

Resta, Andréia dos Santos
Avaliação do efeito do extrato seco de *Spirulina sp* nas células progenitoras da medula óssea de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* / Andréia dos Santos Resta . Campinas, SP : [s.n.], 2004.

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

1. Listeria monocytogenes. 2. Listeriose. I. Mary Luci de Souza Queiroz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Membros:

Profa Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Prof. Dr. Claudio Lucio Rossi

Profa. Dra. Marize Campos Valadares

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

Data: 30/01/2004

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

aos meus pais, Carlos e Eunice,

pelo constante empenho em

incentivar seus filhos ao estudo,

sem medir esforços para isso

À Professora Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, minha orientadora, pela oportunidade de crescimento pessoal e realização que me concedeu.

À Dra. Giselle Zenker Justo, pela cooperação solidária.

Aos amigos do Laboratório, pela convivência, aprendizado e cooperação no decorrer de minhas atividades.

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

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

Ao Departamento de Farmacologia, pela possibilidade da elaboração desta dissertação de Mestrado.

Aos animais que, em benefício da Ciência sofreram as imposições da pesquisa e mostraram à minha sensibilidade os valores fundamentais da vida, onde quer que ela se manifeste.

SUMÁRIO

PÁG.

RESUMO..... *xii*

ABSTRACT..... *xv*

1- INTRODUÇÃO..... 17

1.1- *Spirulina sp*..... 18

1.2- Modelo experimental de infecção com *Listeria monocytogenes*..... 21

2- OBJETIVOS..... 24

3- MATERIAL E MÉTODOS..... 26

3.1- Animais..... 27

3.2- Extrato seco de *Spirulina sp*..... 28

3.3- *Listeria monocytogenes*..... 28

3.4- Cultura clonal de precursores hematopoéticos da medula óssea e do baço de camundongos BALB/c (CFU-GM)..... 30

3.4.1- Medula óssea..... 30

3.4.2- Baço..... 31

3.4.3- Preparação das placas de cultura da medula óssea e do baço em meio semi-sólido..... 31

3.5- Preparação do meio condicionado de células esplênicas (SCM)..... 32

3.6- Peso do baço dos animais submetidos aos referidos tratamentos..... 33

3.7- Curva de sobrevida..... 33

3.8- Análise estatística..... 34

4- RESULTADOS..... 35

4.1- Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos Balb/c tratados com extrato seco de S*pirulina sp*..... 36

4.2- Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) do baço de camundongos Balb/c tratados com extrato seco de S*pirulina sp*..... 38

4.3- Peso do baço de camundongos Balb/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp*..... 40

4.4- Sobrevida de camundongos BALB/c infectados com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* e submetidos ao pré-tratamento com extrato seco de *Spirulina sp* por 7 dias..... 42

4.5- Sobrevida de camundongos BALB/c infectados com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* e submetidos ao tratamento com extrato seco de *Spirulina sp* por 14 dias..... 44

4.6- Sobrevida de camundongos BALB/c infectados com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* e submetidos ao pós-tratamento com extrato seco de *Spirulina sp* por 7 dias..... 46

5- DISCUSSÃO..... 48

6- CONCLUSÃO..... 55

7- REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS..... 57

8- APÊNDICES..... 69

PÁG.

Tabela 1- Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM)..... 33

Tabela 2- Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos e sacrificados 24 horas após o término do tratamento..... 70

Tabela 3- Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à infecção com *Listeria monocytogenes***,** sacrificados 24 horas após a inoculação da bactéria..... 71

Tabela 4- Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à infecção com *Listeria monocytogenes***,** sacrificados 48 horas após a inoculação da bactéria..... 72

Tabela 5- Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à infecção com *Listeria monocytogenes***,** sacrificados 72 horas após a inoculação da bactéria..... 73

Tabela 6- Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos e sacrificados 24 horas após o término do tratamento..... 74

Tabela 7- Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à infecção com *Listeria monocytogenes*, sacrificados 24 horas após a inoculação da bactéria..... 75

Tabela 8- Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à infecção com *Listeria monocytogenes*, sacrificados 48 horas após a inoculação da bactéria..... 76

Tabela 9- Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à infecção com *Listeria monocytogenes*, sacrificados 72 horas após a inoculação da bactéria..... 77

Tabela 10- Peso do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos e sacrificados 24 horas após o término do tratamento..... 78

Tabela 11- Peso do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à infecção com *Listeria monocytogenes*, sacrificados 24 horas após a inoculação da bactéria..... 79

Tabela 12- Peso do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à infecção com *Listeria monocytogenes*, sacrificados 48 horas após a inoculação da bactéria..... 80

Tabela 13- Peso do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à infecção com *Listeria monocytogenes*, sacrificados 72 horas após a inoculação da bactéria..... 81

PÁG.

Figura 1- Número de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia)..... 37

Figura 2- Número de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia)..... 39

Figura 3- Peso do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia)..... 41

Figura 4- Probabilidade de sobrevida de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* ($6x10^4$ bactérias/animal) e submetidos ao pré-tratamento com *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por 7 dias consecutivos..... 43

Figura 5- Probabilidade de sobrevida de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* e submetidos ao tratamento com *Spirulina sp* (150 e 200 mg/kg/dia) por 14 dias consecutivos..... 45

Figura 6- Probabilidade de sobrevida de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmete com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* ($6x10^4$ bactérias/animal) e submetidos ao pós-tratamento com *Spirulina sp* (150 e 200 mg/kg/dia) por 7 dias consecutivos..... 47

RESUMO

Neste trabalho foi investigado o efeito imunomodulador do extrato seco de *Spirulina sp* sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos de granulócitos-macrófagos (CFU-GM) na medula óssea e no baço de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes*. Alterações no peso do baço e na resistência dos animais à infecção também foram estudadas.

Foram testadas quatro doses do extrato de *Spirulina sp*: 50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia, administradas por via oral aos animais. Três protocolos de tratamento foram utilizados para avaliar os efeitos da alga sobre a resistência de camundongos infectados intraperitonealmente com uma dose letal *Listeria monocytogenes* ($6x10^4$ bactérias/animal). No primeiro protocolo, animais infectados foram pré-tratados por 7 dias com as diferentes doses do extrato. No segundo, doses de 150 e 200 mg/kg/dia foram administradas aos animais por 14 dias consecutivos, sendo que a suspensão de bactérias foi inoculada no 7° dia de tratamento. No terceiro protocolo, os animais foram submetidos a um pós-tratamento de 7 dias com essas mesmas doses de extrato. Para avaliação dos parâmetros hematopoéticos foi utilizado apenas o protocolo de pré-tratamento e os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 h após inoculação intraperitoneal de uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* ($1x10^5$ bactérias/animal).

Animais infectados com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* apresentaram um decréscimo significativo no número de CFU-GM da medula óssea 48 e 72 h após a infecção. Esse efeito foi acompanhado por um aumento no número dessas células no baço assim como no peso deste órgão.

Todas as doses de *Spirulina* utilizadas protegeram contra a mielossupressão provocada pela bactéria, porém um aumento estatisticamente significativo neste parâmetro foi obtido para as doses de 150 e 200 mg/kg/dia em relação ao controle e às outras doses. Estimulação da mielopoese também foi observada nos grupos de animais normais (não infectados) tratados por 7 dias com 150 e 200 mg/kg/dia de *Spirulina* em relação aos outros grupos. Além disso, o pré-tratamento dos animais infectados com todas as doses avaliadas inibiu o desenvolvimento da esplenomegalia e da hematopoese esplênica. Nenhuma alteração foi observada no baço dos animais apenas tratados.

Empregando-se esse mesmo protocolo de pré-tratamento, as doses de 150 e 200 mg/kg/dia também aumentaram a resistência de camundongos letalmente infectados com *Listeria monocytogenes*, concordando com os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros hematopoéticos. Quando o tratamento foi prolongado para 14 dias com essas mesmas doses de extrato e os animais infectados no 7º dia de tratamento, observou-se um aumento estatisticamente significativo de 35% e 30% na probabilidade de sobrevida dos animais infectados que receberam 150 e 200 mg/kg/dia da alga, respectivamente. No entanto, nenhuma alteração no tempo de sobrevida de animais infectados foi observada com o protocolo de pós-tratamento por 7 dias com 150 e 200 mg/kg/dia de extrato de *Spirulina sp*.

Estes resultados apontam para um efeito imunoestimulante da alga quando utilizada profilaticamente e sugerem que o aumento na resistência do hospedeiro à infecção depende, em parte, do protocolo utilizado. Neste sentido, a administração do extrato seco de *Spirulina sp* previamente à infecção parece ser fundamental para aumentar a resistência imunológica do hospedeiro, provavelmente devido à estimulação da geração de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos, críticos para a defesa inicial do organismo contra a infecção bacteriana.

ABSTRACT

In this work, we investigated the effects of *Spirulina sp* extract on the growth and differentiation of bone marrow and spleen hematopoietic progenitors (CFU-GM) in normal and in *Listeria monocytogenes*-infected mice. Changes in spleen weight and resistance to a lethal dose of bacteria were also studied. To evaluate the hematopoietic activity, BALB/c mice were treated orally with 50, 150, 200 and 300 mg/kg doses of the extract for 7 consecutive days and, at the end of this period, they were infected intraperitoneally with a sublethal dose of the bacteria ($1x10^3$ bacteria/animal). As expected, a significant decrease in bone marrow CFU-GM numbers was observed in mice infected with *L. monocytogenes* at 48 and 72 h after infection. This effect was accompanied by the development of splenic hematopoiesis with splenomegaly. Pre-treatment of these animals with *Spirulina sp* significantly stimulated myelopoiesis, reaching normal values of bone marrow CFU-GM when 50 and 300 mg/kg of the algae were used. On the other hand, increased numbers of bone marrow CFU-GM over control values were observed when the extract was given to mice at 150 and 200 mg/kg previously to infection. Moreover, these doses also stimulated myelopoiesis in normal mice given the extract for 7 days. All of these doses of *Spirulina sp* completely inhibited the extramedullar hematopoiesis and the increase in spleen weight induced by the infection. This extract did not affect splenic hematopoiesis and spleen weight when administered to normal mice. Resistance to infection was studied in mice infected with a lethal dose of *L. monocytogenes* ($6x10^4$ bacteria/animal) and submitted to 3 protocols of treatment with *Spirulina sp*. These experiments show that only the doses of 150 and 200 mg/kg given for 7 days to mice previously to infection were effective to prolong survival of these animals until 12 days, compared with non-treated infected mice which died until 6 days. When 150 and 200 mg/kg of the extract were administered to mice for 14 consecutive days and the animals were infected at the 7th day of treatment, 30 and 35% of survival were observed, respectively. In contrast, post-treatment of infected mice with these doses did not affect survival, suggesting an important role for the pre-treatment with *Spirulina sp* in the prophylaxis of bacterial infections. Taken together, these results suggest that the stimulatory effect of *Spirulina sp* on myelopoiesis is critically important to improve resistance of *L. monocytogenes*-infected mice. Moreover, the present results support previous work in the literature suggesting the innate immune system as a major target of *Spirulina*-mediated immune activation.

1- INTRODUÇÃO

1.1- *Spirulina sp*

O interesse pela produção comercial de microalgas para consumo humano tem crescido nas últimas décadas. As microalgas *Chlorella sp*, *Dunaliella sp* e *Scenedesmus sp* e as cianobactérias ou algas azuis *Spirulina sp* e *Aphanizomenon flos-aquae* são utilizadas como suplemento alimentar por apresentarem quantidades consideráveis de proteínas, lipídios, vitaminas, sais minerais, carotenóides, clorofila e inúmeros outros pigmentos (BAIANOVA e TRUBACHEV, 1981; KAY, 1991).

Além do alto valor nutritivo, as microalgas têm demonstrado possuir importantes atividades terapêuticas. O uso da *Chlorella, Aphanizomenon flos-aquae* e *Spirulina sp* é amplamente difundido, principalmente pelos seus efeitos sobre o sistema imunológico, os quais têm sido demonstrados tanto em animais como em humanos. A esse respeito, estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que a estimulação dos mecanismos de defesa da resposta imunológica primária, como a ativação de fagócitos e de células "natural killer" (NK) e a síntese e secreção de inúmeras citocinas pró-inflamatórias, tem um papel fundamental na expressão das propriedades biológicas dessas algas, estando associada à proteção contra tumores e infecções virais e bacterianas (TANAKA et al., 1990; QURESHI et al., 1996; HASEGAWA et al., 1990, 1997; DANTAS et al., 1999; JUSTO et al., 2001; PUGH e PASCO, 2001; QUEIROZ et al., 2000a/b/c/d/e, 2001, 2002; HIRAHASHI et al., 2002).

A *Spirulina sp* é uma cianobactéria ou alga azul, pluricelular, procarionte, com parede celular gram-negativa. Esta alga pertence ao gênero *Arthrospira,* sendo Spirulina uma denominação popular e comercialmente utilizada. Difere de outras cianobactérias por se proliferar em águas quentes e alcalinas dos lagos vulcânicos (BUJARD et al*.,* 1970). Utilizada como alimento por diferentes povos na Antiguidade, a *Spirulina sp* foi redescoberta recentemente pelo seu alto valor nutricional. Proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas do complexo B, dentre as quais destaca-se a vitamina B_{12} de difícil obtenção a partir da dieta, beta-caroteno e outros pigmentos, sais minerais, ácidos graxos essenciais e polissacarídeos foram identificados na composição desta alga (BLINKOVA et al., 2001; CHAMORRO et al., 2002). Trata-se de um suplemento alimentar de alta qualidade podendo ser útil no tratamento da desnutrição, já que é uma alga de cultivo fácil

em condições de crescimento desfavoráveis ao desenvolvimento de vários microrganismos, incluindo os patogênicos (BLINKOVA et al., 2001).

Vários estudos relatam a ação da *Spirulina sp* como um aditivo bioativo. Estudos demonstram que esta alga é eficiente no tratamento de doenças cardiovasculares, hepatotoxicidade, hiperglicemia, hiperlipidemia, doenças virais, neoplasias, processos inflamatórios, alergias, anemias e imunodeficiências (CHAMORRO et al., 2002), além de contribuir para a preservação da microbiota intestinal, especialmente de lactobacilos e bifidobactérias, dificultando, desta forma, a colonização por microrganismos patogênicos como *Candida albicans* (BLINKOVA et al., 2001).

De particular interesse para o escopo desta tese são os estudos que demonstram os efeitos desta alga sobre a resposta imunológica. Efeito imunoestimulante tem sido atribuído à *Spirulina sp* não só pela sua capacidade de ativar a primeira linha de defesa do organismo, mas por contribuir também para o desenvolvimento da imunidade específica, tanto a mediada por células como a humoral (BAOJIANG et al., 1994). Dentre os efeitos induzidos pela alga salientam-se a ativação de macrófagos, células NK, linfócitos T e B, bem como estímulo da produção de anticorpos e citocinas (BAOJIANG et al., 1994; QURESHI et al., 1996, 1996; AL-BATSHAN et al., 2001; HARAHASHI et al., 2002).

AL-BATSHAN et al. (2001) constataram um aumento no número e na capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de galinhas tratadas com ração enriquecida com *Spirulina platensis*. Estudos recentes conduzidos em indivíduos sadios tratados com extrato de *Spirulina platensis* também demonstraram ativação de monócitos e de células NK isoladas de sangue periférico (HIRAHASHI et al., 2002). Além disso, este estudo demonstrou que tanto a função citolítica como a produção de interferon-γ (IFN-γ) pelas células NK foram estimuladas pelo extrato da alga. Em células mielóides, a *Spirulina sp* parece atuar modulando a produção de citocinas críticas para a ativação de células NK como a interleucina-12 (IL-12), via receptores específicos de sinalização denominados *Toll-like receptors* (TLR) (HIRAHASHI et al., 2002). Ativação celular via TLR está associada ao reconhecimento de estruturas específicas inicialmente determinadas em bactérias, mas não restritas a elas (MEDZHITOV e JANEWAY, 1997). Esses receptores

possuem um papel fundamental na ativação de linhagens mielóides. Portanto, um possível mecanismo para a ativação das células NK seria a ação direta da *Spirulina* sobre monócitos via TLR, promovendo a produção de IL-12, a qual estimularia, então, a produção de IFN-γ pelas células NK (HIRAHASHI et al., 2002). Efeitos similares foram descritos para *Chlorella vulgaris* (HASEGAWA et al., 2002) e *Agaricus blazei* (EBINA e FUJIMIYA, 1998), além de outras espécies de cogumelos (BORCHERS et al., 1999).

Estudos *in vitro* conduzidos por PUGH et al. (2001) também demonstraram ativação de monócitos isolados de sangue periférico humano pela *Immulina*, um polissacarídeo isolado da *Spirulina platensis*. Além da *Immulina*, outros dois polissacarídeos de alto peso molecular, denominados *Immurella* e *Immunon*, isolados das espécies *Chlorella pyrenoidosa* e *Aphanizomenon flos-aquae*, respectivamente, também apresentaram atividades imunoestimulantes *in vitro*. Esses três constituintes apresentaram-se 100 a 1.000 vezes mais potentes na ativação de monócitos e macrófagos do que outros polissacarídeos normalmente utilizados para a imunoterapia do câncer como *Schizophyllan*, *Lentinan*, *Krestin* e *Acemannan*, os quais são isolados de *Schizophyllun commune, Lentinus edodes* e *Coriolus versicolor* e *Aloe sp*, respectivamente (PUGH et al., 2001). Estes autores também determinaram um aumento significativo na expressão de RNAm das citocinas interleucina-1β (IL-1β) e fator de necrose tumoral-α (TNF-α) nessas células, sugerindo potencial uso clínico na terapia adjuvante do câncer. Resultados semelhantes sobre atividade de macrófagos e sobre a produção de IL-1β, TNF-α e IFN-γ foram observados em indivíduos que consomem *Aphanizomenon flos-aquae*. Estes efeitos foram associados à estimulação da resposta imunológica por esta espécie (JENSEN et al. 2000; PUGH e PASCO, 2001).

Além da atividade sobre monócitos/macrófagos, frações ricas em polissacarídeos isolados da alga também promoveram um aumento na percentagem de linfócitos T do sangue periférico de camundongos (BAOJIANG et al., 1994).

Outros componentes isolados da alga como a ficocianina-C, além dos polissacarídeos, foram descritos pela sua capacidade de estimular a proliferação e diferenciação de células progenitoras hematopoéticas comprometidas com a série

granulocítica-macrofágica em camundongos imunossuprimidos (ZHANG CHENG-WU et al., 1994).

Em conjunto, essas informações sugerem a estimulação do sistema imunológico inato como principal mecanismo de ativação do sistema de defesa do hospedeiro mediado pela *Spirulina sp*.

1.2- MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO COM *Listeria monocytogenes*

A infecção provocada pela *Listeria monocytogenes* em camundongos é utilizada extensivamente como modelo de interação entre parasita e hospedeiro para o estudo de diferentes parâmetros da resposta imunológica associados à resistência do animal à infecção. Além disso, o modelo experimental de infecção com *Listeria monocytogenes* constitui uma ferramenta útil para a investigação dos efeitos de diferentes agentes sobre o sistema imunológico (MACKANESS, 1962; HAHN et al., 1981).

A *Listeria monocytogenes* é um bacilo gram-positivo pertencente a um grupo de microrganismos de ação intracitoplasmática que provoca reações semelhantes no homem e em roedores. O processo envolvido na resistência à listeriose é caracterizado pela participação de vários tipos celulares e diversas citocinas que interagem com o microambiente tecidual, garantindo a resistência à bactéria (UNANUE, 1997). Inicialmente ocorre a ativação da imunidade inata do hospedeiro, com a importante participação de macrófagos, neutrófilos e células NK de maneira inespecífica. Em uma segunda etapa, há o envolvimento da resposta imunológica específica pela ativação de células T, contribuindo para o total extermínio do patógeno (HAHN e KAUFMANN, 1981; CONLAN e NORTH, 1991; GREGORY e WING, 1993; WING e GREGORY, 2002).

Após a injeção intravenosa de uma dose subletal de *L. monocytogenes* em camundongos, as bactérias são rapidamente removidas da corrente sanguínea, alojando-se nos tecidos, principalmente no baço e no fígado, onde macrófagos residentes e imigrantes além dos hepatócitos são infectados (MACKANESS, 1962; NORTH, 1970; HAHN e KAUFMANN, 1981; LEPAY et al., 1985; CONLAN e NORTH, 1991; GOLDFINE e WADSWORTH, 2002).

Nessa fase inicial, neutrófilos atuam como mediadores da imunidade celular não específica à listeriose por meio da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias (RAYBOURNE et al., 2001). Além dos neutrófilos, os macrófagos também participam da resposta à infecção bacteriana, possibilitando ao organismo reduzir o número bacteriano. Ao serem infectados, os macrófagos liberam citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-1, IL-6, TNF-α e IFN-γ, que são essenciais para a ativação de outras células também comprometidas com o desenvolvimento da imunidade na listeriose. O TNF-α e a IL-12 ativam as células NK, que começam a produzir INF-γ. A IL-1 está envolvida na mobilização e ativação dos neutrófilos, enquanto que a importância da IL-6 na resistência do animal à infecção deve-se à sua ação sobre o estroma medular e, conseqüentemente, sobre a produção de células precursoras (CHEERS et al., 1990; LIU e CHEERS, 1993; ROGERS et al., 1992, 1994; DALRYMPLE et al., 1995; HUNTER et al., 1995; LIU e KURLANDER, 1995; UNANUE, 1997).

A ativação de células NK desempenha papel fundamental na resistência do hospedeiro contra patógenos intracelulares. A síntese e secreção elevada de IFN-γ pelas células NK promove a ativação de macrófagos, conduzindo ao desenvolvimento da imunidade de extermínio mediada por células específicas do subtipo Th1 (FARGEAS et al. 1992; MOMBAERTS et al., 1993; CZUPRYNSKI et al. 1984, 1994).

Apesar das células fagocitárias expressarem potentes mecanismos de defesa antimicrobiana após sua ativação por citocinas, observa-se heterogeneidade no seu potencial microbicida (KAUFMANN et al., 1987). Em muitas células, a *Listeria monocytogenes,* ao ser fagocitada, produz um fator de virulência denominado Listeriolisina O (LLO) (COSSART e MENGAUD, 1989), que lisa o fagolisossomo permitindo sua saída para o citoplasma, onde ocorre sua proliferação. A disseminação da bactéria ocorre através da migração para a célula adjacente (SOUTHWICK e PURICH, 1996; DRAMSI et al., 1998).

Alterações no sistema hematopoético também são observadas no modelo de listeriose murina. Sendo a medula óssea o sítio primário de geração de células progenitoras de granulócitos e macrófagos (CFU-GM), na fase inicial da infecção com *Listeria*

monocytogenes, a migração de células fagocitárias, derivadas da medula óssea para os locais de replicação bacteriana, tem um papel crítico para o estabelecimento da resistência do hospedeiro (NORTH, 1970; BENNET e BAKER, 1977; STEVENSON et al., 1981; LEPAY et al., 1985; ROSEN et al., 1989; KOLB-MÄURER, 2002). A esse respeito, trabalhos na literatura demonstram que camundongos C57BL/6, resistentes à infecção com *Listeria monocytogenes*, apresentam um número elevado de CFU-GM na medula óssea (STEVENSON et al., 1981; YOUNG e CHEERS, 1986; LIU e CHEERS, 1993; BINCOLETTO e QUEIROZ, 1996; CZUPRYNSKI et al., 2003), enquanto camundongos de linhagens específicas susceptíveis a listeriose, como a linhagem BALB/c, são incapazes de mobilizar as células fagocitárias ao local de replicação bacteriana, ou o fazem de maneira ineficiente. Esses animais apresentam uma elevada taxa de multiplicação da bactéria no fígado (YOUNG e CHEERS, 1986, CHEERS e STANLEY, 1988; ROSEN et al., 1989), que conduz a uma maior taxa de mortalidade (STEVENSON et al., 1981; WING et al., 1984, 1995; YOUNG e CHEERS, 1986; CHEERS e STANLEY, 1988; ROSEN et al., 1989).

As células primitivas pluripotentes da medula óssea são responsáveis pela origem de qualquer célula do sangue de acordo com o estímulo recebido para sua diferenciação. Essas células são denominadas células formadoras de colônias (CFCs) e podem ser avaliadas *in vitro* pela técnica de cultura clonal de precursores hematopoéticos em meio semi-sólido, descrita por METCALF (1984). Vários fatores influenciam o crescimento, diferenciação e atividade desses precursores. Portanto, a análise *in vitro* do crescimento e diferenciação dessas células permite avaliar o grau de comprometimento do organismo em inúmeros processos patológicos, incluindo a infecção com *Listeria monocytogenes*.

Diante do exposto, neste trabalho considera-se oportuna a investigação dos efeitos imunomoduladores da alga *Spirulina sp* sobre a geração das células precursoras da linhagem de granulócitos e macrófagos (CFU-GM), empregando-se o modelo experimental de infecção com *Listeria monocytogenes*.

2- OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos protetores do extrato seco de *Spirulina sp* em camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes*. Os parâmetros avaliados foram:

- número de precursores hematopoéticos da medula óssea;
- número de precursores hematopoéticos do baço;
- peso do baço;
- resistência do animal a uma dose letal de *Listeria monocytogenes*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- ANIMAIS

Para realização dos experimentos foram utilizados camundongos BALB/c machos, com idade entre 8 a 10 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP (CEMIB). Os camundongos foram mantidos agrupados ao acaso em gaiolas plásticas, em biotério tipo convencional, controlado devido à implantação de sistemas de barreiras de proteção e técnicas de manejo capazes de manter o padrão sanitário SPF (*Specifc Pathogen Free*) dos animais por tempo médio de 4 meses. A temperatura foi mantida em 26 ± 2°C, com ciclo claro-escuro de 12 horas e o regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e água estéreis fornecidas *ad libitum*. Os experimentos foram realizados após um período mínimo de acondicionamento às condições do laboratório de 72 horas. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de 6 ou 20 e submetidos ao tratamento de acordo com o protocolo experimental a seguir:

a) animais controle (não infectados);

b) animais infectados com *Listeria monocytogenes*;

c) animais somente tratados com diferentes doses de extrato de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por 7 dias consecutivos;

d) animais pré-tratados com diferentes doses de extrato de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por 7 dias consecutivos e infectados com *Listeria monocytogenes*;

e) animais tratados com 150 ou 200 mg/kg/dia de extrato de *Spirulina sp* por 14 dias consecutivos e infectados com *Listeria monocytogenes* no 7° dia de tratamento;

f) animais tratados com 150 ou 200 mg/kg/dia de extrato de *Spirulina sp* por 7 dias consecutivos após infecção com *Listeria monocytogenes*.

Os animais controle receberam apenas o veículo (água estéril) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados com o extrato da alga.

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP), sob protocolo n° 508-1.

3.2- EXTRATO SECO DE *Spirulina sp*

O extrato seco da *Spirulina sp* foi gentilmente cedido pela Galena Química e Farmacêutica Ltda (São Paulo, Brasil).

A faixa de doses de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) testada neste trabalho foi selecionada após revisão da literatura sobre as atividades biológicas do extrato da alga (BAOJIANG et al., 1994; PREMKUMAR et al., 2001; REMIREZ et al., 2002).

Para o tratamento dos animais, o extrato foi ressuspenso em água estéril nas concentrações desejadas à temperatura ambiente e 0,2 mL foram administrados aos camundongos, por via oral (gavagem), por 7 ou 14 dias consecutivos.

Para o estudo dos efeitos da *Spirulina sp* na sobrevida de camundongos letalmente infectados com *Listeria monocyotgenes*, 3 protocolos de tratamento foram estabelecidos. Esses protocolos consistiram da administração do extrato da alga aos animais por 7 dias consecutivos, previamente ou após a infecção bacteriana e do tratamento por 14 dias consecutivos com infecção no 7° dia de tratamento.

Para avaliação dos parâmetros hematopoéticos apenas o protocolo de pré-tratamento foi utilizado.

3.3- *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 de Clínicas - UNICAMP) após identificação do microrganismo por testes morfológicos e bioquímicos cujos resultados principais foram resumidos a seguir:

- 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 foram realizados 25 repasses sucessivos em camundongos BALB/c periodicamente. A bactéria foi administrada intraperitonealmente aos animais em solução salina 0,9% e 48 horas após a inoculação do microrganismo, os baços foram isolados em ambiente estéril, macerados e mantidos em BHI por 24 horas. Para obtenção de colônias puras, uma suspensão de *Listeria monocytogenes* foi cultivada em placas de ágar-sangue e após 24 horas de incubação em estufa a 37°C, colônias de bactérias foram isoladas e diluídas em solução salina 0,9% na concentração desejada.

Para a realização dos experimentos o número ideal do microrganismo a ser inoculado foi determinado por espectrofotometria, por meio da escala de McFarland (Vitek Colorimeter).

As doses de *Listeria monocytogenes* utilizadas neste trabalho foram padronizadas a partir de uma curva de sobrevida realizada previamente aos experimentos conforme descrito por BINCOLETTO e QUEIROZ (1996). Para o estudo dos parâmetros hematológicos foi utilizada a dose subletal de $1x10^3$ bactérias/animal e, para a avaliação da sobrevida dos animais, uma dose letal de $6x10^4$ bactérias/animal. A suspensão de bactérias foi inoculada intraperitonealmente 3 horas após a administração da 7° dose de extrato de *Spirulina sp* ou 3 horas antes da primeira dose no protocolo de pré-tratamento, em um volume de 0,2 mL por animal.

A resposta hematopoética foi avaliada 24, 48 e 72 horas após a infecção com a dose subletal de *Listeria monocytogenes*.

3.4- CULTURA CLONAL DE PRECURSORES HEMATOPOÉTICOS DA MEDULA ÓSSEA E DO BAÇO DE CAMUNDONGOS BALB/c (CFU-GM)

Para enumerar estas células clonogênicas é importante que todas as células multipotenciais presentes na cultura sejam otimizadas a proliferar e que as condições de cultura sejam ajustadas para se evitar a superposição de colônias na placa de Petri permitindo a identificação de cada colônia. Para isto, o mesmo lote de fator estimulador de colônias (meio condicionado de células esplênicas – SCM) foi utilizado em concentração máxima, assim como o lote de soro fetal bovino foi selecionado cuidadosamente devido à variação na sua atividade.

3.4.1- 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 azul de tripan 1% e a concentração da suspensão celular ajustada para $1x10^5$ células/mL.

3.4.2- Baço

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

O número de células na suspensão foi contado em câmara hematocitométrica após diluição 1:100 das células em azul de tripan 1% e a concentração ajustada para $2x10^5$ células/mL.

3.4.3- Preparação das placas de cultura da medula óssea e do baço em meio semi-sóIido

A cultura clonal foi realizada em placas de Petri de 35 mm contendo meio semi-sólido se que constitui de:

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

A seguir, adicionou-se ao meio o volume apropriado de células nas concentrações finais de $1x10^5$ células/mL para a medula óssea e de $2x10^5$ células/mL para o baço e distribuíram-se alíquotas de 2 mL em cada placa já contendo 100 μL do estímulo

apropriado (meio condicionado de células esplênicas – SCM – item III.5) diluído 1:4. Após geleificar, incubou-se por 7 dias a 37°C em estufa úmida e atmosfera contendo 5% de CO_2. Após este período, contou-se o número de colônias formadas em microscópio de dissecção em aumento de 40x.

Para estudo morfológico, as colônias foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (v/v) e coradas com Luxol Fast Blue/Leishman (METCALF, 1984).

3.5- PREPARAÇÃO DO MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS (SCM)

Baços de camundongos BALB/c foram removidos em condições assépticas em meio RPMI-1640 e passados delicadamente através de peneira de aço inoxidável estéril.

A concentração da suspensão celular foi ajustada para $2x10^5$ células/mL em meio RPMI-1640 contendo 10% de SFB. Adicionou-se ao meio $5x10^{-5}$ moles/L de 2-mercaptoetanol e 1,65 μg/mL de "pokeweed mitogen" (Sigma). Incubou-se por 7 dias a 37°C em estufa úmida e atmosfera contendo 5% de CO_2. Centrifugou-se o sobrenadante e filtrou-se em membranas de 0,45 μm (Millipore).

A atividade do SCM foi determinada utilizando-se a cultura clonal de células progenitoras hematopoéticas 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 máxima. Os resultados foram obtidos em duplicata para cada diluição e estão apresentados na tabela abaixo.

Tabela 1- Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM)

DILUIÇÃO SCM	CFU-C x 10^2 *
1:1	109,2 ± 4,2
1:2	102,0 ± 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 representados como média ± DP.

3.6- PESO DO BAÇO DOS ANIMAIS SUBMETIDOS AOS REFERIDOS TRATAMENTOS

Após remoção do baço conforme descrito no item III.4.2, seu peso foi mensurado em miligramas para posterior análise.

3.7- CURVAS DE SOBREVIDA

Para o estudo dos efeitos do extrato seco de *Spirulina sp* na sobrevida dos animais infetados com *Listeria monocytogenes*, 3 protocolos de tratamento foram utilizados.

Protocolo 1: os animais foram submetidos ao tratamento por 7 dias consecutivos com 4 doses diferentes do extrato da alga (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia - N=20 animais/grupo) previamente à infecção com uma dose letal de *Listeria monocytogenes*. A suspensão de bactérias ($6x10^4$ bactérias/animal) foi inoculada intraperitonealmente 3 horas após a administração da última dose de extrato.

Protocolo 2: os animais foram tratados por 14 dias consecutivos com 150 ou 200 mg/kg/dia do extrato da alga (N=20 animais/grupo) e a infecção intraperitoneal com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* ($6x10^4$ bactérias/animal) foi realizada no 7° dia de tratamento, 3 horas após a administração de *Spirulina sp*.

Protocolo 3: os animais foram tratados por 7 dias consecutivos com 150 ou 200 mg/kg/dia do extrato da alga (N=20 animais/grupo) após a infecção intraperitoneal com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* ($6x10^4$ bactérias/animal). O tratamento iniciou 3 horas após a inoculação da suspensão de bactérias.

Animais controle infectados receberam apenas o veículo (água estéril) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados com o extrato da alga. Os animais foram observados por um período de até 30 dias.

3.8- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar a ocorrência de diferenças significativas entre os grupos estudados para as variáveis CFU-GM/fêmur, CFU-GM/baço e peso do baço. Nos casos em que houve diferença significativa, o teste de Tukey foi utilizado para testar as diferenças mínimas existentes entre todos os grupos.

A curva de sobrevida dos animais foi representada pelo método descrito por Kaplan-Meier. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste não-paramétrico de Log-rank. Em todas as medidas o α foi de 5% bicaudal, ou seja, significância estatística foi considerada para valores de $P<0,05$ (WEINBERG e GOLDBERG, 1990).

4- RESULTADOS

4.1- NÚMERO DE PRECURSORES HEMATOPOÉTICOS (CFU-GM) DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS BALB/C TRATADOS COM EXTRATO SECO DE *Spirulina sp*

Na Figura 1 (Tabelas 2 a 5 – Apêndice) estão representados os resultados obtidos na avaliação da produção de células progenitoras hematopoéticas de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) pela medula óssea de camundongos BALB/c submetidos ao tratamento com *Spirulina sp* durante 7 dias. Doses de 50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia foram administradas por via oral (gavagem) aos animais previamente à infecção com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes*.

A administração de 50 e 300 mg/kg/dia da alga aos animais normais não infectados não alterou os valores de CFU-GM quando comparados aos controles não infectados, enquanto as doses de 150 e 200 mg/kg/dia estimularam a produção de precursores hematopoéticos (N=6, P<0,001 - ANOVA – Tukey), sem apresentarem diferença estatística significativa entre si.

A inoculação da suspensão de bactérias nos camundongos provocou mielossupressão, caracterizada pela redução no número de CFU-GM da medula óssea 48 e 72 horas após a infecção, em relação ao grupo controle (N=6, P<0,001 - ANOVA – Tukey). No entanto, o pré-tratamento com o extrato da alga por 7 dias estimulou a mielopoese nos animais infectados, aumentando o número de CFU-GM para níveis iguais ou superiores aos encontrados na medula óssea de camundongos normais (não infectados) em todos os períodos estudados (N=6, P<0,01 - ANOVA – Tukey). O aumento no número de progenitores mielóides, em relação ao controle, obtido na vigência da infecção, ocorreu quando doses de 150 e 200 mg/kg/dia foram administradas aos animais como pré-tratamento (N=6, P<0,001 - ANOVA – Tukey). Este aumento também foi estatisticamente significativo em relação ao observado para os animais infectados e pré-tratados com 50 e 300 mg/kg/dia (N=6, P<0,001 - ANOVA – Tukey).

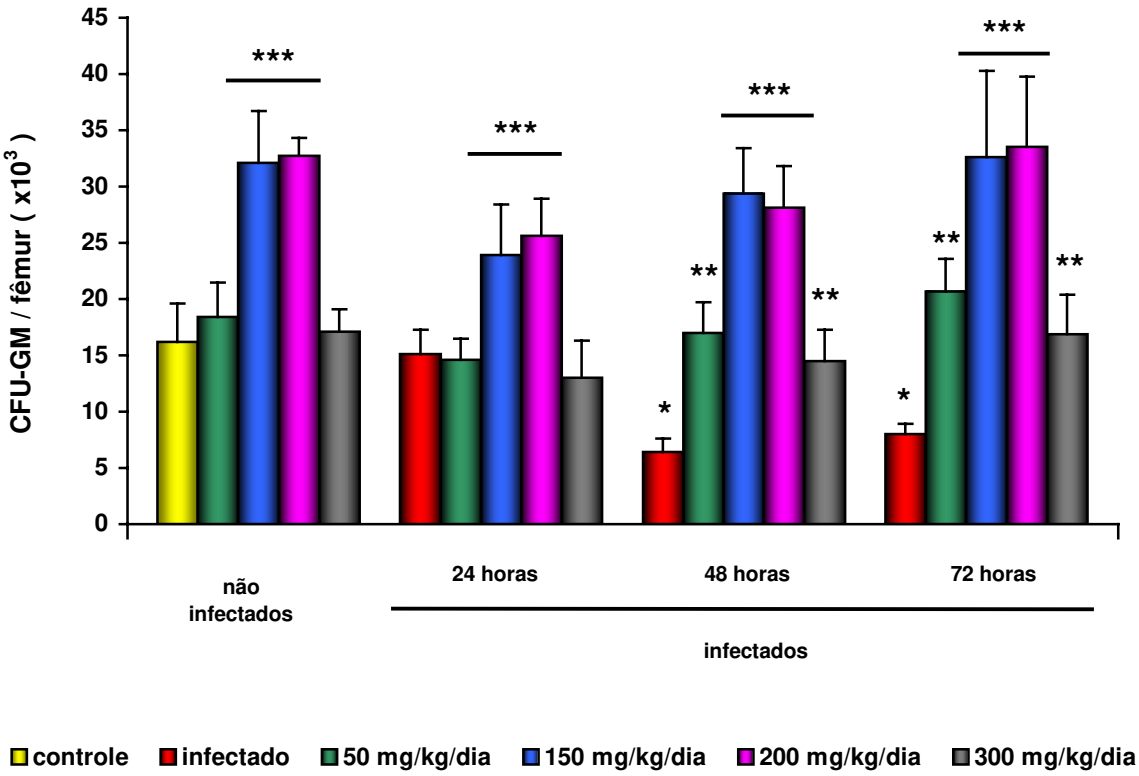

Figura 1- Número de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia). Os animais foram tratados por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à inoculação intraperitoneal de uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* ($1x10^3$ bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. Camundongos somente infectados e controles (não infectados) receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados. Os resultados representam a média ± desvio-padrão de 6 animais/grupo. *$P<0,001$ comparado ao grupo controle (não infectado); **$P<0,01$ comparado aos grupos somente infectados 48 e 72 horas; ***$P<0,001$ comparado aos grupos controle (não infectado), somente infectados e infectados pré-tratados com 50 e 300 mg/kg/dia. ANOVA – Teste de Tukey.

4.2- NÚMERO DE PRECURSORES HEMATOPOÉTICOS (CFU-GM) DO BAÇO DE CAMUNDONGOS BALB/C TRATADOS COM EXTRATO SECO DE *Spirulina sp*

A atividade hematopoética extramedular foi avaliada no baço de camundongos BALB/c submetidos ao tratamento com *Spirulina sp* durante 7 dias. Doses de 50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia foram administradas por via oral (gavagem) aos animais previamente à infecção com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes*. Os resultados obtidos para o número de CFU-GM estão representados na Figura 2 (Tabelas 6 a 9 – Apêndice).

Um aumento no número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos foi observado 48 e 72 horas após a infecção, em relação ao controle ($N=6$, $P<0,001$ - ANOVA – Tukey). A administração de *Spirulina sp* reverteu o estímulo na atividade hematopoética deste órgão causado pela infecção. Para todas as doses testadas, valores normais de CFU-GM foram determinados no baço desses animais em todos os períodos estudados ($N=6$, $P<0,001$ - ANOVA – Tukey).

Animais normais (não infectados) tratados com as diferentes doses da alga não apresentaram alterações no número de precursores hematopoéticos deste órgão quando comparados ao grupo controle.

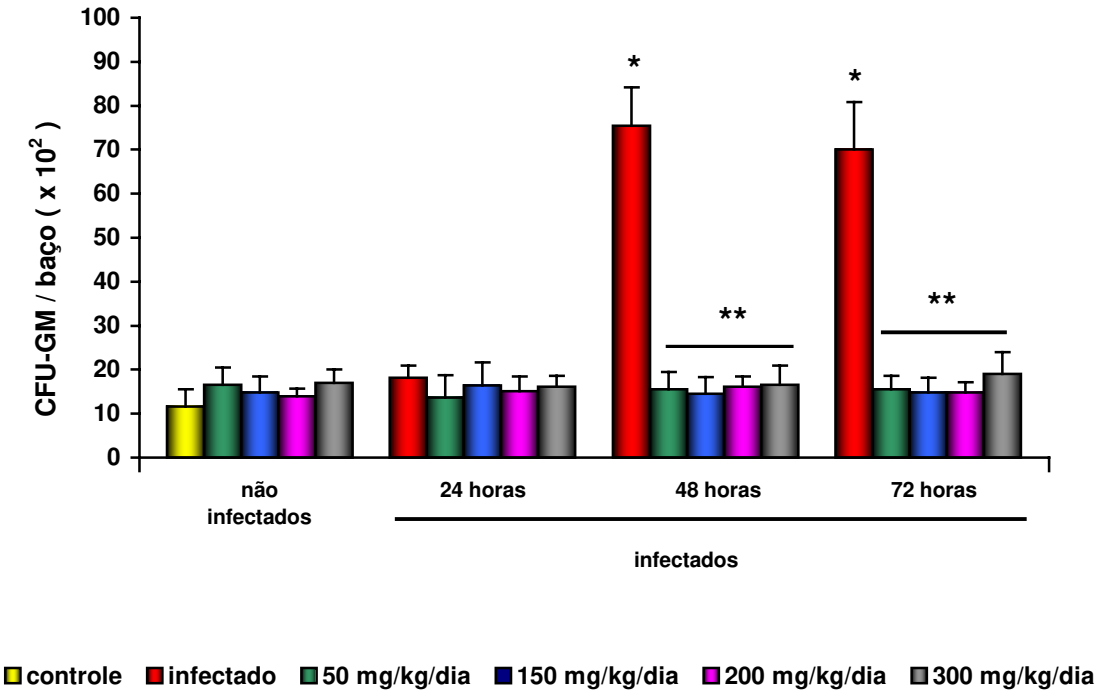

Figura 2- Número de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia). Os animais foram tratados por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à inoculação intraperitoneal de uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* ($1x10^3$ bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. Camundongos somente infectados e controles (não infectados) receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados. Os resultados representam a média ± desvio-padrão de 6 animais/grupo. *$P<0,001$ comparado ao grupo controle (não infectado); **$P<0,001$ comparado aos grupos somente infectados 48 e 72 horas. ANOVA – Teste de Tukey.

4.3- PESO DO BAÇO DE CAMUNDONGOS BALB/c TRATADOS COM EXTRATO SECO DE *Spirulina sp*

Na Figura 3 (Tabelas 10 a 13 – Apêndice) estão representados os resultados obtidos na avaliação deste parâmetro.

Animais infectados com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* apresentaram esplenomegalia, caracterizada pelo aumento do peso deste órgão 48 e 72 horas após a inoculação da bactéria (N=6, P<0,001 - ANOVA – Tukey). O pré-tratamento desses animais com a alga levou à redução do peso do baço, alcançando valores similares ao obtido no grupo de animais controle, independentemente da dose de *Spirulina sp* administrada (N=6, P<0,001 - ANOVA – Tukey).

Animais normais (não-infectados) que receberam o mesmo protocolo de tratamento com a alga não apresentaram alterações no peso do baço em relação aos controles.

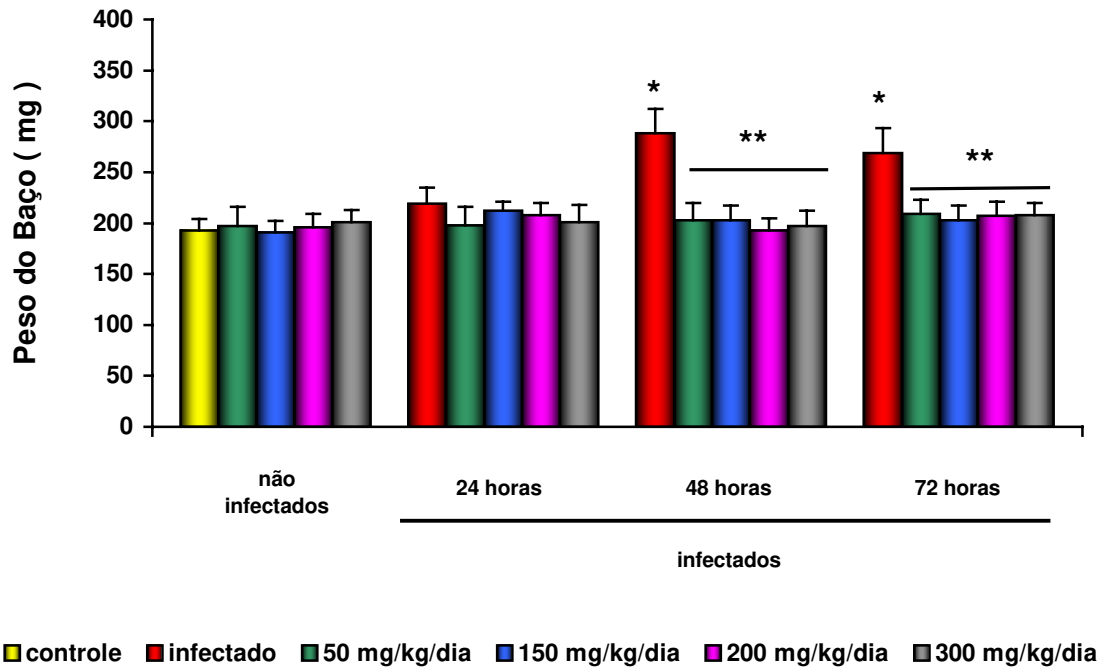

Figura 3- Peso do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia). Os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* ($1x10^3$ bactérias/animal) após receberem tratamento por via oral durante 7 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. Camundongos somente infectados e controles (não infectados) receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados. Os resultados representam a média ± desvio-padrão de 6 animais/grupo. **P<0,001* comparado ao grupo controle (não infectado); ***P<0,001* comparado aos grupos somente infectados 48 e 72 horas. ANOVA – Teste de Tukey.

4.4- SOBREVIDA DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM UMA DOSE LETAL DE *Listeria monocytogenes* E SUBMETIDOS AO PRÉ-TRATAMENTO COM EXTRATO SECO DE *Spirulina sp* POR 7 DIAS

A resistência de camundongos submetidos ao tratamento profilático com extrato seco de *Spirulina sp* à infecção com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* está representada na Figura 4.

Enquanto o grupo de animais infectados apresentou 100% de mortalidade até o 6° dia após a inoculação de bactérias, camundongos pré-tratados com as doses de 150 e 200 mg/kg/dia de *Spirulina sp* apresentaram uma maior resistência à infecção. O tratamento prévio com ambas as doses prolongou a sobrevida dos animais letalmente infectados até 12 dias, sendo estatisticamente significativo em relação ao controle ($N=20$, $P<0,05$ - método de Kaplan-Meier – teste de Log-rank). Por outro lado, camundongos pré-tratados com doses de 50 e 300 mg/kg/dia da alga sobreviveram apenas até o 8º dia após a infecção letal com *Listeria monocytogenes*, não sendo estatisticamente significativo em relação ao controle.

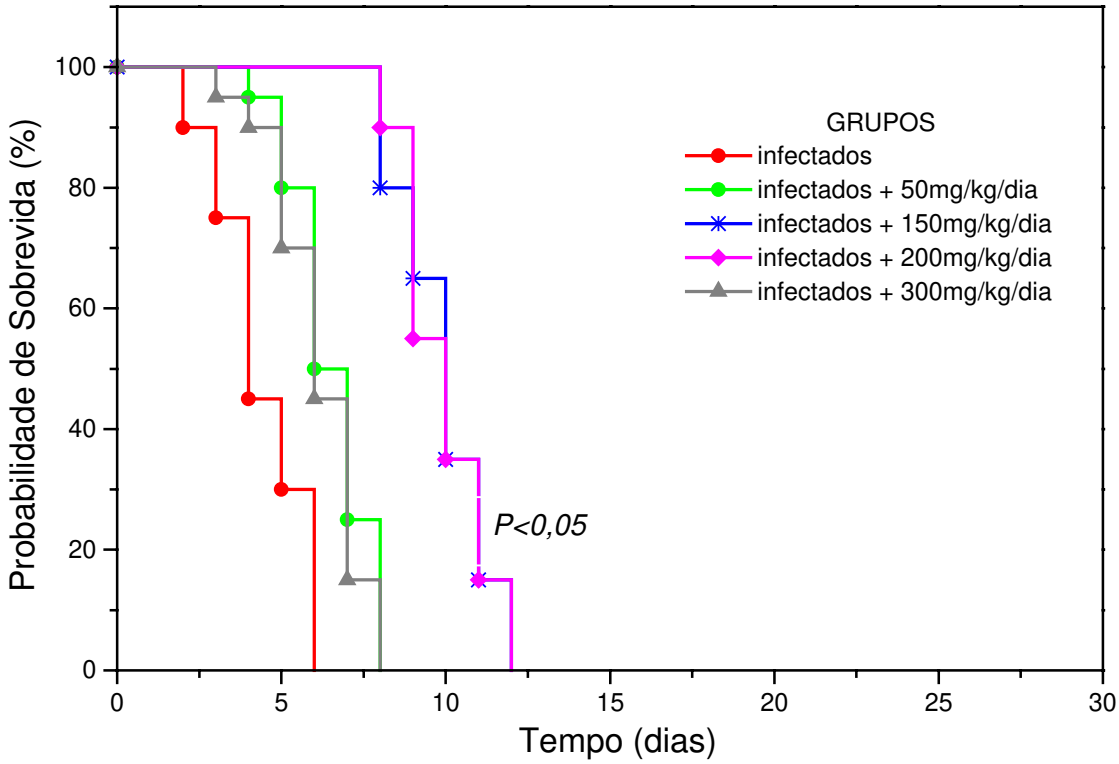

Figura 4- Probabilidade de sobrevida de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* ($6x10^4$ bactérias/animal) e submetidos ao pré-tratamento com *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por 7 dias consecutivos. Os camundongos foram inoculados com a bactéria 3 horas após a administração da última dose. Os animais somente infectados receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados. N=20. *P<0,05* comparado aos animais somente infectados. Curva de Kaplan-Meier – Teste de Log-rank.

4.5- SOBREVIDA DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM UMA DOSE LETAL DE *Listeria monocytogenes* E SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM EXTRATO SECO DE *Spirulina sp* POR 14 DIAS

Neste estudo, a resistência à infecção letal com *Listeria monocytogenes* foi avaliada empregando-se um protocolo de tratamento que consistiu da administração do extrato seco de *Spirulina sp* por via oral durante 14 dias consecutivos, sendo a suspensão de bactérias inoculada no 7° dia de tratamento. Nesse estudo, apenas as doses que apresentaram melhores resultados nos experimentos anteriormente descritos foram testadas, ou seja, 150 e 200 mg/kg/dia. Os resultados estão representados na Figura 5.

Enquanto os animais letalmente infectados com a bactéria apresentaram 100% de mortalidade até o 6° dia após a inoculação de *Listeria monocytogenes*, os grupos de animais tratados por 14 dias com 150 e 200 mg/kg/dia de extrato da alga apresentaram 35% e 30% de sobrevida, respectivamente (N=20, $P<0,01$ - método de Kaplan-Meier – teste de Log-rank), não havendo diferenças estatisticamente significativas entre essas doses.

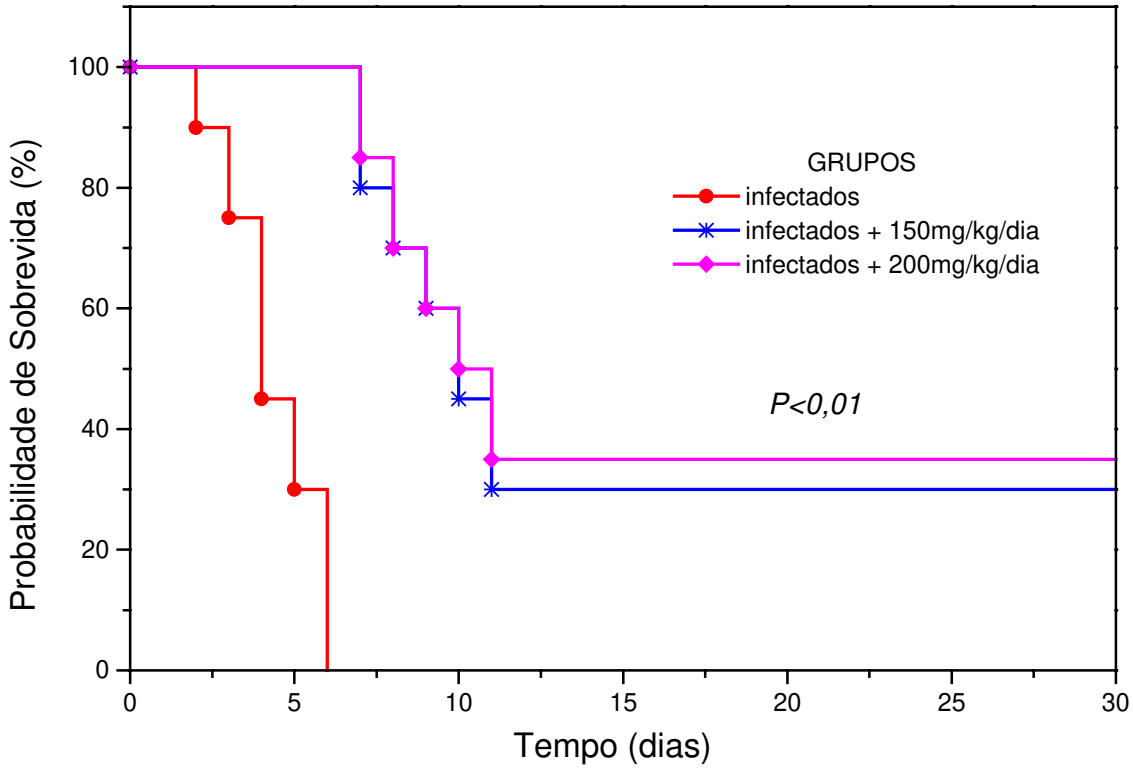

Figura 5- Probabilidade de sobrevida de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* e submetidos ao tratamento com *Spirulina sp* (150 e 200 mg/kg/dia) por 14 dias consecutivos. No 7° dia de tratamento os animais foram inoculados intraperitonealmente com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* ($6x10^4$ bactérias/animal). Os animais somente infectados receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados. Os animais foram observados por 30 dias. N=20. *P<0,01* comparado aos animais somente infectados. Curva de Kaplan-Meier – Teste de Log-rank.

4.6- SOBREVIDA DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM UMA DOSE LETAL DE *Listeria monocytogenes* E SUBMETIDOS AO PÓS-TRATAMENTO COM EXTRATO SECO de *Spirulina sp* POR 7 DIAS

Neste estudo, os efeitos do pós-tratamento por 7 dias com *Spirulina sp* sobre a resistência de camundongos infectados intraperitonealmente com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* foram avaliados. Da mesma forma que no experimento anterior, apenas as doses efetivas foram testadas, ou seja, 150 e 200 mg/kg/dia. Os resultados estão apresentados na Figura 6.

Nessas condições experimentais, o extrato seco de *Spirulina sp*, administrado após a inoculação bacteriana, não apresentou nenhum efeito sobre a resistência dos animais à infecção com *Listeria monocytogenes*. Todos os grupos experimentais apresentaram 100% de mortalidade, sendo que camundongos somente infectados sobreviveram até o 5^{o} dia após a inoculação bacteriana, enquanto animais tratados com as doses de 150 e 200 mg/kg/dia da alga sobreviveram até o 7^{o} dia.

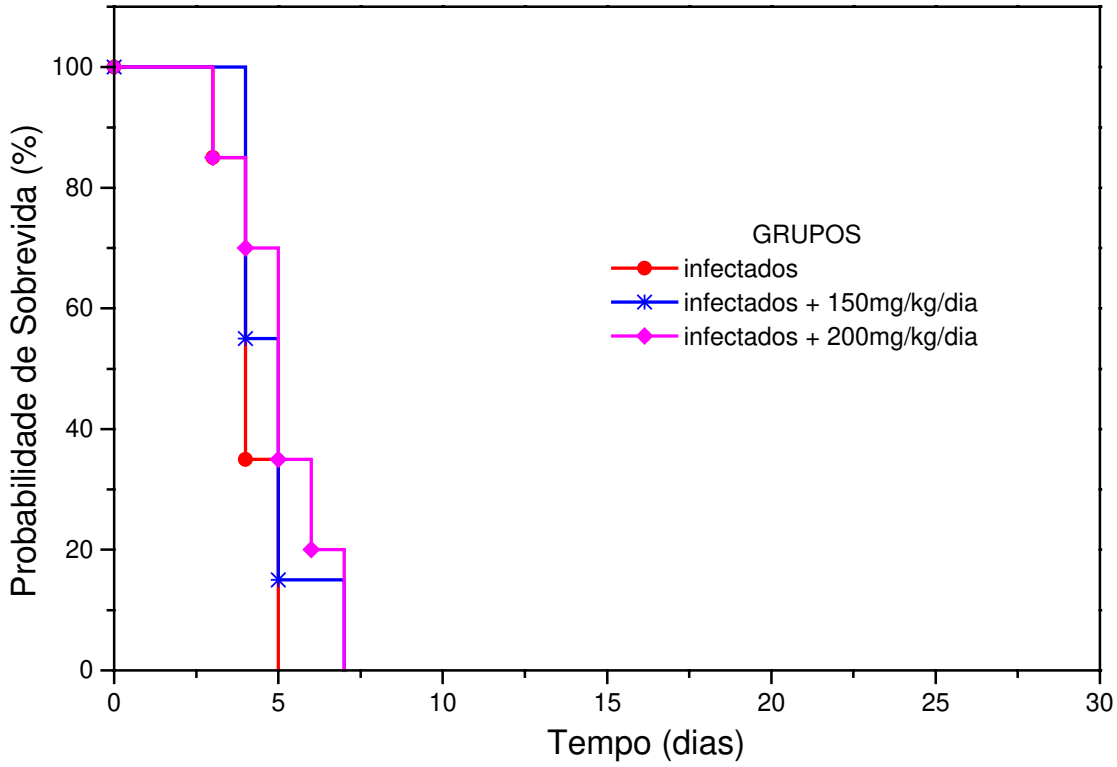

Figura 6- Probabilidade de sobrevida de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmete com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* ($6x10^4$ bactérias/animal) e submetidos ao pós-tratamento com *Spirulina sp* (150 e 200 mg/kg/dia) por 7 dias consecutivos. O tratamento dos camundongos iniciou 3 horas após a inoculação da bactéria. Os animais somente infectados receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados. N=20. Curva de Kaplan-Meier.

5- DISCUSSÃO

O estudo do modelo de listeriose murina tem permitido a compreensão de vários aspectos da resposta imunológica já que este modelo de infecção compromete significativamente o sistema imunológico (MACKANESS, 1962; HAHN e KAUFMANN, 1981; UNANUE, 1997; GOLDFINE e WADSWORTH, 2002). Várias células efetoras operam na infecção com *Listeria monocytogenes* como macrófagos, neutrófilos, células NK e células T específicas. Aspectos bioquímicos e celulares da interação dessas células fornecem informações importantes sobre os mecanismos envolvidos na resistência do hospedeiro ao patógeno e contribuem nos estudos que avaliam o impacto de diversos agentes sobre a defesa antibacteriana (UNANUE, 1997; RAYBOURNE et al., 2001; GOLDFINE e WADSWORTH, 2002).

A *Listeria monocytogenes* é um parasita intracelular que atinge principalmente as células hepáticas e macrófagos. Embora a erradicação da infecção ocorra por um mecanismo dependente de células T, o envolvimento de células maduras da série granulocítica-macrofágica na resposta inicial do animal à bactéria é fundamental para a resistência inicial ao patógeno (KAUFMANN, 1993). Macrófagos e neutrófilos são células responsáveis pelo controle inicial da proliferação bacteriana, além de secretarem citocinas que agem sobre as células T, formando uma rede de interação no sistema imunológico (UNANUE, 1997). Estas células são provenientes de precursores hematopoéticos da medula óssea, com potencial de diferenciação em qualquer linhagem sanguínea dependendo do estímulo recebido. A ação de fatores estimuladores de colônias (CSFs) específicos como G-CSF, M-CSF e GM-CSF regula o crescimento e diferenciação desses precursores em linhagens comprometidas com a série granulocítica-macrofágica (METCALF, 1991).

A diminuição do número dos precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos na medula óssea de camundongos BALB/c no início da infecção com *Listeria monocytogenes* está bem documentada na literatura (NORTH, 1970; WING et al., 1984; LEPAY et al., 1985; CHEERS e STANLEY, 1988; ROSEN et al., 1989; ROGERS et al., 1994; BINCOLLETO e QUEIROZ, 1996; DANTAS e QUEIROZ, 1999; MELO et al., 2001; QUEIROZ et al., 2000a/b/d/e, 2003). Este efeito pode ser atribuído à diferenciação das células pluripotentes em células maduras e também à migração das células precursoras

para tecidos hematopoéticos secundários, como por exemplo, o baço (NORTH, 1970; WING et al., 1984; LEPAY et al., 1985; CHEERS e STANLEY, 1988; ROSEN et al., 1989; ROGERS et al., 1994).

Os resultados deste estudo corroboram com estas informações, uma vez que observou-se um decréscimo significativo no número de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos na medula óssea nas 48 e 72 horas após a infecção com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes*. Em contrapartida, a hematopoese extramedular foi evidente nesses animais neste mesmo período de tempo, com significativo aumento de precursores hematopoéticos no baço e conseqüentemente no peso deste órgão.

É consenso que a migração dos fagócitos mononucleares da medula óssea para o campo de infecção é crítica para a sobrevivência do animal durante a infecção primária com *Listeria monocytogenes* (NORTH, 1970; BENNET e BAKER, 1977; STEVENSON et al., 1981; LEPAY et al., 1985; ROSEN et al., 1989; GREGORY e WING, 1993; KOLB-MÄURER, 2002), e a rápida mobilização desses fagócitos em direção aos órgãos infectados é responsável pela maior resistência dos camundongos à infecção bacteriana (CZUPRYNSKI et al., 1985; MIELKE et al., 1988). Essas características são observadas na linhagem de camundongos C57BL/6 resistentes a *Listeria monocytogenes* (MANDEL e CHEERS, 1980; YOUNG e CHEERS, 1986). Esses animais apresentam um maior número de precursores hematopoéticos na medula óssea, em relação a outras linhagens de animais susceptíveis, mesmo na ausência da infecção. Este fato favorece a pronta eliminação de bactérias pelos fagócitos provenientes dos compartimentos geradores dessas células, em particular a medula óssea, conferindo, portanto, maior resistência aos animais (MANDEL e CHEERS, 1980; SADARANGANI et al., 1980; STEVENSON et al., 1981; CHEERS e STANLEY, 1988; CZUPRYNSKI et al., 2003).

O tratamento profilático utilizando-se as doses de 50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia de extrato de *Spirulina sp* promoveu um estímulo na mielopoese em animais infectados intraperitonealmente com dose subletal de *Listeria monocytogenes*, recuperando ou ainda aumentando o número de CFU-GM na medula óssea em relação ao controle. Embora este efeito ocorresse durante todo o período estudado, o elevado número de CFU-GM na medula óssea dos animais pré-tratados com as doses de 150 e 200 mg/kg/dia durante a fase de

intensa multiplicação bacteriana, ou seja, 48 e 72 horas após a infecção, é de particular importância para a sobrevivência do animal. Características semelhantes foram encontradas em animais resistentes à bactéria, nos quais não há diminuição do número de CFU-GM na medula óssea (SANDARANGANI et al., 1980; YOUNG e CHEERS, 1986). Portanto, parece razoável propor que o efeito imunoestimulante observado para as doses de 150 e 200 mg/kg/dia sobre a mielopoese tenha contribuído para aumentar a resistência dos animais a uma dose letal de *Listeria monocytogenes*. Neste caso, um aumento no número de fagócitos maduros proporcionado pelo tratamento profilático com a alga poderia favorecer o controle da proliferação bacteriana. De fato, os resultados desta tese demonstraram que os animais que receberam 150 e 200 mg/kg/dia da alga apresentaram um maior número de CFU-GM na medula óssea e maior resistência à infecção. Estes resultados concordam com dados da literatura que sugerem um efeito protetor sobre a hematopoese para a ficocianina-C e polissacarídeos isolados da *Spirulina sp* (ZHANG CHENG-WU et al., 1994). Estimulação da diferenciação e proliferação de células progenitoras hematopoéticas comprometidas com a série de granulócitos e macrófagos em camundongos irradiados foi observada na presença desses componentes. Atividade semelhante também foi relatada para outras algas, como a *Chlorella vulgaris*, cujo efeito mieloprotetor foi demonstrado em inúmeros modelos experimentais (HASEGAWA et al., 1989, 1990; KONISHI et al., 1990; DANTAS e QUEIROZ, 1999; JUSTO et al., 2001; QUEIROZ et al., 2002, 2003).

Durante a listeriose, a resistência do animal pode ser alcançada por diferentes mecanismos. A utilização da *Spirulina sp* intensifica a atividade de várias citocinas como IL-1, TNF-α e IL-12, as quais são responsáveis por estimular as células NK a produzirem INF-γ que por sua vez intensifica a atividade antimicrobiana e citotóxica dos macrófagos devido ao aumento da capacidade fagocitária e da produção de óxido nítrico (NO) por estas células (BAOJIANG et al., 1994; QURESH et al., 1994, 1996; AL-BATSHAN et al., 2001; BLINKOVA et al., 2001; PUGH et al., 2001; HIRAHASHI et al., 2002). Sendo macrófagos células fundamentais para o início da resposta à *Listeria monocytogenes*, o aumento da sua capacidade listericida contribui para a resistência do hospedeiro à bactéria (HAHN e KAUFMANN, 1981; COLAN e NORTH, 1991; APPELBERG et al., 1994; ROGERS et al., 1994; KALFMANN, 1993; AL-BATSHAN, 2001). A IL-12 também é responsável por direcionar a resposta imunológica específica para o padrão Th1, com

intensa produção de linfócitos T citotóxicos, células responsáveis pelo extermínio da infecção com *Listeria monocytogenes* (MOMBAERTS et al., 1993; UNANUE, 1997).

Na literatura constam relatos de outras algas utilizadas como suplemento alimentar que, assim como a *Spirulina sp*, intensificam a atividade de citocinas reguladoras da resposta imunológica. PUGH et al. (2001) testaram polissacarídeos de alto peso molecular, isolados da *Spirulina platensis*, *Chlorella pyrenoidosa, Aphanizomenon flos-aquae*, denominados *Immulina, Immurella* e *Immunon*, respectivamente, e constataram aumento na atividade de IL-1β e TNF-α. Testes *in vitro* demonstraram que estes compostos apresentaram-se 100 a 1.000 vezes mais potentes na ativação de macrófagos e monócitos em comparação a outros polissacarídeos já utilizados na imunoterapia como *schizophyllan, lentinan* e *krestin*, isolados dos fungos *Schizophyllun commune, Lentinus edodes* e *Coriolus versicolor*, respectivamente, além do *acemannan*, que corresponde a uma fração da *Aloe sp* (PUGH et al., 2001).

Trabalhos da literatura demonstraram a capacidade da alga *Chlorella vulgaris* de intensificar a produção de IFN-γ e IL-2 (HASEGAWA et al., 1997; QUEIROZ et al., 2002). Animais infectados com *Listeria monocytogenes* pré-tratados com esta alga apresentaram aumento na atividade de células NK e nos níveis de IL-2 e IFN-γ, conferindo ao animal maior resistência à infecção (DANTAS et al., 1999; DANTAS e QUEIROZ, 1999; QUEIROZ et al., 2002). Estudos recentes constataram que indivíduos que consomem *Aphanizomenon flos-aquae* apresentam aumento nos níveis de IL-1β, TNF-α e IFN-γ bem como estímulo da atividade de macrófagos com a utilização da alga (PUGH e PASCO, 2001).

Em conjunto, esses dados sugerem que o tratamento com o extrato seco de *Spirulina sp* pode estimular outros mecanismos do sistema imunológico importantes para a recuperação dos animais com listeriose.

Um resultado interessante foi a ausência de estímulo no número de progenitores hematopéticos na medula óssea dos animais que receberam doses de 300 mg/kg/dia de *Spirulina sp*, apesar de ter sido observada a recuperação dessas células precursoras nos animais infectados. Já está bem estabelecido na literatura que no controle da mielopoese

CSFs agem em cooperação com outros sinais reguladores que podem aumentar ou diminuir seus efeitos (METCALF, 1993). Neste sentido, a estimulação da mielopoese é limitada pela produção de fatores inibitórios, particularmente PGE, cuja secreção regula a maturação de células progenitoras teciduais (KURLAND et al., 1978; WILLIAMS, 1979; BROEXMEYER, 1984; PELUS, 1984). A *Spirulina sp* ativa macrófagos, população identificada como produtora de CSFs e também de prostaglandina E (PGE). Portanto, é possível que a redução da atividade estimuladora dessa alga em doses mais elevadas seja a resposta de um progressivo aumento na produção de fatores inibitórios da mielopoese, como PGE. Resultados semelhantes, obtidos por MELO et al. (2001) para um metabólico fúngico no modelo de listeriose murina, corroboram com esta hipótese. Portanto, conforme proposto por MELO et al. (2001), a atividade protetora da *Spirulina sp* poderia estar relacionada à sua habilidade de manter o equilíbrio entre estímulo positivo e negativo na mielopoese, que pode ser ocasionado pelo resultado de mudanças no comportamento local de vários tipos celulares.

Outras citocinas induzidas pela *Spirulina sp*, como a IL-1, também poderiam contribuir para a inibição do efeito mieloestimulante desta alga em doses acima de 300 mg/kg/dia. Segundo GASPARETTO et al. (1989), a mielossupressão e conseqüentemente neutropenia causada pelo 5-fluorouracil (5-FU) pode ser reduzida pela utilização de doses adequadas de IL-1, enquanto a administração de doses elevadas ou por períodos prolongados desta citocina parece limitar a recuperação da produção de CFU-GM e neutrófilos.

Considerando o uso da *Spirulina sp* como suplemento alimentar, o efeito de um tratamento prolongado com a alga sobre a resistência dos animais infectados também foi investigado. O protocolo de tratamento utilizado nesse estudo consistiu da administração do extrato seco de *Spirulina sp* por 14 dias consecutivos e infecção dos animais no 7^{o} dia de tratamento. Nestas condições obteve-se 30% e 35% de aumento na probabilidade de sobrevida para as doses de 150 e 200 mg/kg/dia, respectivamente. Com base neste resultado, considerou-se importante verificar um possível efeito terapêutico da alga neste modelo de infecção. Para isto, a sobrevida de camundongos infectados com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* foi realizada empregando-se um protocolo de pós-tratamento

por 7 dias com doses de 150 e 200 mg/kg/dia do extrato. Nenhuma alteração no tempo de sobrevida de animais infectados foi observada nessas condições experimentais, sugerindo uma contribuição importante da *Spirulina sp* administrada profilaticamente à maior resistência à infecção bacteriana. Além disso, este resultado reforça a idéia de que o estímulo produzido sobre a mielopoese nos animais submetidos ao pré-tratamento com a alga possui um papel fundamental na expressão dessa atividade.

Diante desses resultados pode-se concluir que a *Spirulina sp* é uma alga com propriedade imunoestimulante, que pode aumentar a resistência do hospedeiro à infecção bacteriana quando utilizada profilaticamente, provavelmente devido à estimulação da geração de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos, críticos para a defesa inicial do organismo contra a infecção.

6- CONCLUSÃO

O presente estudo sobre a avaliação dos efeitos do extrato seco de *Spirulina sp* sobre as células progenitoras da medula óssea de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* demonstrou:

1. aumento no número de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* e tratados previamente com *Spirulina sp*;

2. prevenção da hematopoese extramedular e da esplenomegalia de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* e tratados previamente com *Spirulina sp*;

3. atividade mieloestimulante para o extrato de *Spirulina sp* em camundongos normais quando doses de 150 e 200 mg/kg/dia foram administradas por 7 dias consecutivos;

4. aumento da resistência de camundongos letalmente infectados com *Listeria monocytogenes* quando o extrato foi administrado profilaticamente nas doses de 150 e 200 mg/kg/dia;

5. aumento da probabilidade de sobrevida de camundongos letalmente infectados com *Listeria monocytogenes* quando o tratamento com o extrato nas doses de 150 e 200 mg/kg/dia foi prolongado por mais 7 dias após a infecção bacteriana (total de 14 dias de tratamento);

6. ausência de efeito terapêutico quando doses de 150 e 200 mg/kg/dia do extrato foram administradas aos camundongos letalmente infectados com *Listeria monocytogenes*.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-BATSHAN, H.A.; AL-MUFARREJ, S.I.; AL-HOMAIDAN, A.A.; QURESHI, M.A. Enhancement of chicken macrophage phagocytic function and nitrite production by dietary *Spirulina platensis*. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 23:281-9, 2001.

APPELBERG, R.; CASTRO, A.G.; SILVA, M.T. Neutrophils as effector cells of T-cell-mediated, acquired immunity in murine listeriosis. **Immunology,** 83:302-7, 1994.

BAIANOVA, I.U.I.; TRUBACHEV, I.N. Comparative evaluation of the vitamin composition of unicellular algae and higher plants grown under artificial conditions. **Prikl Biokhim Mikrobiol**, 17:400-7, 1981.

BAOJIANG, G. et. al. Study on effect and mechanism of Polysaccharides of spirulina on body immune function improvement. SECOND ASIA-PACIFIC CONFERENCE ON ALGAL. Biotechnology. Singapore, April, p. 24, 1994.

BENNET, M.; BAKER, E.E. Marrow-dependent cell function in early stages of infection with *Listeria monocytogenes*. **Cell Immun**, 33:203-10,1977.

BINCOLETTO, C.; QUEIROZ, M.L. The effect of lead on the bone marrow stem cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Vet Hum Toxicol**, 38:186-90, 1996.

BLINKOVA, L.P.; GOROBETS, O.B.; BATURO, A.P. Biological activity of Spirulina. **Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol**, 2:114-8, 2001.

BORCHERS, A.T.; STEM, J.S. HACKMAN, R.M.; KEEN, C.I.; GERSHWIN, M.E. Mushrooms, tumors, and immunity. **Proc Soc Exp Biol Med**, 221: 281-91, 1999.

BROXMEYER, H.E. Negative regulators of hematopoiesis. **Kroc Found Ser,** 18:363-97, 1984.

BUJARD, E.; BRANCO, U.; MAURON, J.; MOTTU, F.; NABHOLZ, A.; WUHRMANN, J.J.; CLÉMENT, G. Composition and nutritive value of blue green algae (spirulina) and their possible use in food formulations. 3rd. INTERNATIONAL CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND THECNOLOGY, Washington, 1970.

CHAMORRO, G.; SALAZARE, M.; ARAUJO, K.G.; SANTOS, C.P.; CEBALLOS, G.; CASTILHO, L.F. Update on the pharmacology of Spirulina (Arthrospira), an unconventional food. **Arch Latinam Nutr,** 52:232-40, 2002.

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**, 56:2972-8, 1988.

CHEERS, C.; ZHAN, Y.F.; EGAN, P.J. In vivo IL-1 potentiates both specific and non-specific arms of immune response to infection. **Immunology,** 70:411-3, 1990.

CONLAN, J.W.; NORTH, R.J. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cell a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. **J Exp Med**,174:741-4, 1991.

COSSART, P.; MENGAUD, J. *Listeria monocytogenes*. A model system for the molecular study of intracellular parasitism. **Mol Biol Med**, 6:463-74, 1989.

CZUPRYNSKI, C.J.; HENSON, P.M.; CAMPBELL, P.A. Killing of *Listeria monocytogenes* by inflammatory neutrophils and mononuclear phagocytes from immune and nonimmune mice. **J Leukoc Biol**, 35:193-208, 1984.

CZUPRYNSKI, C.J.; CANONO, B.P.; HENSON, P.M.; CAMPBELL, P.A. Genetically determined resistance to listeriosis is associated with increased accumulation of inflammatory neutrophils and macrophages which have enhanced listericidal activity. **Immunology**, 55:511-8, 1985a.

CZUPRYNSKI, C.J.; HENSON, P.M.; CAMPBELL, P.A. Enhanced accumulation of inflammatory neutrophils and macrophages mediated by transfer of T cells from mice immunized with *Listeria monocytogenes***. J Immunol**, 134:3449-54, 1985b.

CZUPRYNSKI, C.J.; BROWN, J.F.; WAGNER, R.D.; STEINBERG, H. Administration of antigranulocyte monoclonal antibody RB6-8C5 prevents expression of acquired resistance to *Listeria monocytogenes* infection in previously immunized mice. **Infect Immun**, 62:5161-3, 1994.

CZUPRYNSKI, C.J.; FAITH, N.G.; STEINBERG, H. A/J mice are susceptible and C57BL/6 mice are resistant to *Listeria monocytogenes* infection by intragastric inoculation. **Infect Immun**, 71:682-9, 2003.

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**, 63:2262-8, 1995.

DANTAS, D.C.; KANENO, R.; QUEIROZ, M.L. The effects of *Chlorella vulgaris* in the protection of mice infected with *Listeria monocytogenes*. Role of natural killer cells. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 21:609-19, 1999a.

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

DRAMSI, S. et al. – Entry of Listeria monocytogenes into neurons occurs by cell-to-cell spread: na in-vitro study. **Infect Immun**, 66:4461-8, 1998.

EBINA, T. e FUJIMIYA, Y. Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. **Biotherapy**, 11: 259-65, 1998.

FALQUET, J. Os aspectos nutritivos da Spirulina. ANTENNA TECHNOLOGY. Disponível em :<http://antenna.ch>. Acesso em: 12 nov. 2003.

FARGEAS, C.; WU, C.Y.; NAKAJIMA, T.; COX, D.; NUTMAN, T.; DELESPESSE, G. Differential effect of transforming growth factor beta on the synthesis of Th1- and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes. **Eur J Immunol**, 22:2173-6, 1992.

GASPARETTO, C.; LAVER, J.; ABBOUD, M.; GILLIO, A.; SMITH, C.; O'REILLY, R.J.; MOORE, M.A. Effects of interleukin-1 on hematopoietic progenitors: evidence of stimulatory and inhibitory activities in a primate model. **Blood**, 74:547-50, 1989.

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

GREGORY, H.S.; WING, E.J. Macrophage colony-stimulating factor and enhanced migration of monocytes are essential in primary but not secondary host defense to Listeria organisms. **J Infect Dis**, 42: 168-934, 1993.

GREGORY, S.H.; WING, E.J. Neutrophil-Kupffer-cell interaction in host defenses to systemic infections. **Immunol Today**, 19:507-10, 1998.

GREGORY, S.H.; WING, E.J. Neutrophil-Kupffer-cell interaction in host defenses to systemic infections Immunol Today. 19:507-10, 1998.

HAHN, H. et al. The role of cell-mediates immunity in bacterial infections. **Ver Infect Dis**, 3:1221-50, 1981.

HAHN, H.; KAUFMANN, S.H. The role of cell-mediated immunity in bacterial infections. **Rev Infect Dis**, 3:1221-50, 1981.

HASEGAWA, T.; TANAKA, K.; UENO, K.; UENO, S.; OKUDA, M.; YOSHIKAI, Y.; NOMOTO, K. Augmentation of the resistance against *Escherichia coli* by oral administration of a hot water extract of *Chlorella vulgaris* in rats. **Int J Immunopharmacol**, 11:971-6, 1989.

HASEGAWA, T.; YOSHIKAI, Y.; OKUDA, M.; NOMOTO, K. Accelerated restoration of the leukocyte number and augmentated resistance against *Escherichia coli* in cyclophosphamide-treated rats orally administered with a hot water extract of *Chlorella vulgaris*. **Int J Immunopharmacol**, 12: 883-91, 1990.

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: 273-82, 1997.

HASEGAWA, T.; MATSUGUSHI, T.; NODA, K.; TANAKA, K.; KUMAMOTO, S.; SHOYAMA, Y.; YOSHIKAI, Y. Toll-like receptor 2 is at least partly involved in the antitumor activity of glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. **Int Immunopharmacol**, 2: 579-89, 2002.

HIRAHASHI, T.; MATSUMOTO, M.; HAZEKI, K.; SAEKI, Y.; UI, M.; SEYA, T. Activation of the human innate immune system by Spirulina: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. **Int Immunopharmacol,** 2:423-34, 2002.

HUNTER, C.A.; CHIZZONITE, R.; REMINGTON, J.S. IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens. **J Immunol**, 155:4347-54, 1995.

JENSEN, G.S.; GINSBERG, D.I.; HUERTA, P.; CITTON, M.; DRAPEU, C. Consumption of *Aphanizomenon flos-aquae* has rapid effects on the circulation and function of immune cells in humans. **J Am Nutr Assoc**, 2: 50-80, 2000.

JUSTO, G.Z.; SILVA, M.R.; QUEIROZ, M.L. Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal ehrlich ascites tumor transplantation in mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol**. 23:119-32, 2001.

KAUFMANN, S.H. Immunity to intracellular bacteria. **Annu Rev Immunol**, 11:129-63, 1993.

KAUFMANN, S.H.; HUG, E.; VATH, U.; DE LIBERO, G. Specific lysis of *Listeria monocytogenes*-infected macrophages by class II-restricted L3T4+ T cells. **Eur J Immunol,** Feb;17:237-46, 1987.

KAY, R.A. Microalgae As Food And Supplement. **Crit Rev Food Sci Nutr,** 30:555-73, 1991.

KOLB-MAURER,A.; WILHELM, M.; WEISSINGER, F.; BROCKER, E.B.; GOEBEL, W. Interaction of human hematopoietic stem cells with bacterial pathogens. **Blood**, 100:3703-9, 2002.

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

KURLAND, J.I.; BOCKMAN, R.S.; BROXMEYER, H.E.; MOORE, M.A. Limitation of excessive myelopoiesis by the intrinsic modulation of macrophage-derived prostaglandin E. **Science,** 199:552-5, 1978.

KURLAND, J.I.; BROXMEYER, H.E.; PELUS, L.M.; BOCKMAN, R.S.; MOORE, M.A. Role for monocyte-macrophage-derived colony-stimulating factor and prostaglandin E in the positive and negative feedback control of myeloid stem cell proliferation. **Blood,** 52:388-407, 1978.

KURLAND, J.I.; PELUS, L.M.; RALPH, P.; BOCKMAN, R.S.; MOORE, M.A. Induction of prostaglandin E synthesis in normal and neoplastic macrophages: role for colony-stimulating factor(s) distinct from effects on myeloid progenitor cell proliferation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 76:2326-30, 1979.

LEPAY, D.A.; STEINMAN, R.M.; NATHAN, C.F.; MURRAY, H.W.; COHN, Z.A. Liver macrophages in murine listeriosis: cell-mediated immunity is correlated with na influx of macrophages capable of generating reactive oxygen intermediates. **J Exp Med**, 161:1503-12, 1985.

LIU, Z.; CHEERS, C. The cellular source of interleukin-6 during Listeria infection. **Infect Immun**, 61:2626-31, 1993.

LIU W, KURLANDER RJ. Analysis of the interrelationship between IL-12, TNF-alpha, and IFN-gamma production during murine listeriosis. **Cell Immunol**, 163:260-7, 1995.

MACKANESS, G.B. Cellular resistance. **J Exp Med**, 116:381-390, 1962.

MACKANESS, G.B; BLANDEN, R.V. Cellular immunity. **Prog Allergy**,11:89-140. Review. 1967.

MANDEL, T.E.; CHEERS, C. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: histopathology of listeriosis in resistant and susceptible strains**. Infect Immun**, 30:851-61, 1980.

MEDZHITOV, R. e JANEWAY, C.A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**, 91: 295-8, 1997.

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

METCALF, D. The hematopoietic colony simulating factors. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984.

METCALF, D. The Florey Lecture, 1991. The colony-stimulating factors: discovery to clinical use. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,** 29;333:147-3, 1991.

METCALF, D. The cellular basis for enhancement interactions between stem cell factor and the colony stimulating factors. **Stem Cells,** 11 Suppl 2:1-11, 1993a.

METCALF, D. The molecular control of proliferation and differentiation in hemopoietic cells. **C R Acad Sci III,** 316:860-70, 1993b.

MIELKE, M.; EHLERS, S.; HAHN, H. The role of T cell subpopulations in cell mediated immunity to facultative intracellular bacteria. **Infection**,16 Suppl 2:123-7, 1988.

MIELKE, M.E.; EHLERS, S.; HAHN, H. T-cell subsets in delayed-type hypersensitivity, protection, and granuloma formation in primary and secondary Listeria infection in mice: superior role of Lyt-2+ cells in acquired immunity. **Infect Immun**, 56:1920-5, 1988.

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

MOORE, M.A.S. Clinical Imlications of Positive and Negative Hematopoietic Stem Cell Regulators – **Blood**, 78: 1-19, 1991.

NISHIBORI, T. et al. – Indution of cytokine gene expression by listeriolysin O and roles of macrophages and NK cells. **Infect Immunol,** 64:3188-95, 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**, 132:521-34, 1970.

PELUS, L.M. Prostaglandin-E-mediated modulation of human marrow CFU-GM Ia-antigen expression: kinetics and specificity. **Exp Hematol,** 12:831-7, 1984.

PREMKUMAR, K.; PACHIAPPAN, A.; ABRAHAM, S.K.; SANTHIYA, S.T.; GOPINATH, P.M.; RAMESH, A. Effect of *Spirulina fusiformis* on cyclophosphamide and mitomycin-C induced genotoxicity and oxidative stress in mice. **Fitoterapia,** 72:906-11, 2001.

PUGH, N.; PASCO, D.S. Characterization of human monocyte activation by a water soluble preparation of *Aphanizomenon flos-aquae*. **Phytomedicine,** 8:445-53, 2001.

PUGH, N.; ROSS, S.A.; ELSOHLY, H.N.; ELSOHLY, M.A.; PASCO, D.S. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis, aphanizomenon flos-aquae and Chlorella pyrenoidosa*. **Planta Med,** 67:737-42, 2001.

QUEIROZ, M.L.S. Células pluripotenciais em cultura – revisão bibliográfica. **Ciência e Cultura**, 40: 421-6, 1988.

QUEIROZ, M. L. S.; JUSTO, G. Z.; PEREIRA-DA-SILVA, F. R. R.; MULLER, A. H. P.; GUILHON, G. M. S. Stimulatory action of *Pluchea quitoc* extract on the hematopoietic response during murine listeriosis. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 22: 721-40, 2000a.

QUEIROZ, M.L.; QUADROS, M.R.; SANTOS, L.M. Cytokine profile and natural killer cell activity in *Listeria monocytogenes* infected mice treated orally with *Petiveria alliacea* extract. **Immunopharmacol Immunotoxicol,** 22:501-18, 2000b.

QUEIROZ, M. L. S.; JUSTO, G. Z.; VALADARES, M. C.; PEREIRA-DA-SILVA, F. R. R. Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 23: 367-82, 2001.

QUEIROZ, M.L.; BINCOLLETO, C.; VALADARES,M.C.; DANTAS, D.C.; SANTOS, L.M. Effects of *Chlorella vulgaris* extract on cytokines production in *Listeria monocytogenes* infected mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol,** 24:483-96, 2002.

QUEIROZ, M.L.; RODRIGUES, A.P.; BINCOLETTO, C.; FIGUEIREDO, C.A.; MALACRIDA, S. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Int Immunopharmacol**, 3:889-900, 2003.

QURESHI, M.A.; ALI, R.A. *Spirulina platensis* exposure enhances macrophage phagocytic function in cats**. Immunopharmacol Immunotoxicol,** 18:457-63, 1996.

QURESHI, M.A.; GARLICH, J.D.; KIDD, M.T. Dietary *Spirulina platensis* enhances humoral and cell-mediated immune functions in chickens. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 18:465-76, 1996.

RAYBOURNE, R.B.; ROTH, G.; DEUSTER, P.A.; STERNBERG, E.M.; SINGH, A. Uptake and killing of *Listeria monocytogenes* by normal human peripheral blood granulocytes and monocytes as measured by flow cytometry and cell sorting FEMS. **Immunol Med Microbiol**, 31:219-25, 2001.

REMIREZ, D.; GONZALEZ, R.; MERINO, N.; RODRIGUEZ, S.; ANCHETA, O. Inhibitory effects of Spirulina in zymosan-induced arthritis in mice. **Mediators Inflamm,** 11:75-9, 2002.

ROGERS, H.W.; SHEEHAN, K.C.; BRUNT, L.M.; DOWER, S.K.; UNANUE, E.R.; SCHREIBER, R.D. Interleukin 1 participates in the development of anti-Listeria responses in normal and SCID mice. **Proc Natl Acad Sci U S A,** 89:1011-5, 1992.

ROGERS, H.W.; TRIPP, C.S.; SCHREIBER, R.D.; UNANUE, E.R. Indogenous IL-1 is required for neutrophil recruitment and macrophage activation during murine listeriosis. **J Immunol**, 153:2093-101, 1994.

ROSEN, H.; GORDON, S.; NORTH, R.J. Exacerbation of murine listeriosis by a monoclonal antibody specific for the type 3 complement receptor of myelomonocytic cells. Absence of monocytes at infective foci allows Listeria to multiply in nonphagocytic cells. **J Exp Med**, 170:27-37, 1989.

SADARANGANI, C.; SKAMENE, E.; KONGSHAVN, P.A. Cellular basis for genetically determined enhanced resistance of certain mouse strains to listeriosis. **Infect Immun**, 28:381-6, 1980.

SOUTHWICK, F.S.; PURICH, D.L. Intracellular pathogenesis of listeriosis**. New Engl J Med**, 334:770-6, 1996.

STEVENSON, M.M.; KONGSHAVN, P.A.; SKAMENE, E. Genetic linkage of resistance to *Listeria monocytogenes* with macrophage inflammatory responses. **J Immunol**, 127:402-7, 1981.

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: 277-91, 1990.

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.

WEINBERG, S. L.; GOLDBERG, K. P. (eds), **Statistics for the behavioral sciences.** Cambridge University Press, New York, 1990, pp 1-617.

WILLIAMS, N. Preferential inhibition of murine macrophage colony formation by prostaglandin E. **Blood,** 53:1089-94, 1979.

WING, E.J. et al. Changes in serum colony – simulation factor and monocytic progenitor cells during *Listeria monocytogenes* infection in mice**. Infect Immunol**, 45:180-4, 1984.

WING, E.J.; BARCZYNSKI, 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,** 49:325-8, 1995.

WING, E.J.; GREGORY, S.H. *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. **J Infect Dis**, 185 (Suppl 1):S18-24, 2002.

YOUNG, A.M.; CHEERS, C. Colony-forming cells and colony-stimulating activity during listeriosis in genetically resistant or susceptible mice. **Cell Immuno,** 97:227-37, 1986.

ZHANG CHENG-WU, et al. Effects of polyssaccharide and phycocyanin from spirulina on peripheral blood and hematopoietic system of bone marrow in mice. Nanjing Univ. China. Pub. in PROC OF SECOND ASIA PACIFIC CONF. ON ALGAL BIOTECH. Univ. of Malaysia. China. April 1994. p.58.

8- APÊNDICES

Tabela 2: Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos e sacrificados 24 horas após o término do tratamento. Os animais controles receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

CFU-GM / Fêmur x 10^3

N	Controle (veículo)	Sp 50 mg/kg	Sp 150 mg/kg	Sp 200 mg/Kg	Sp 300 mg/kg
1	11,0	24,0	39,3	31,7	13,9
2	16,0	18,9	28,8	32,3	21,1
3	21,0	17,1	32,6	32,2	19,8
4	18,4	18,1	33,2	30,9	12,7
5	16,0	17,3	31,7	35,3	18,9
6	17,7	14,7	26,6	33,7	15,9
X	**16,2**	**18,4**	**32,1**	**32,7**	**17,1**
DP	**3,4**	**3,1**	**4,6**	**1,6**	**2,0**

Tabela 3: Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à infecção com *Listeria monocytogenes*, sacrificados 24 horas após a inoculação da bactéria. Os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose subletal da bactéria ($1x10^3$ bactérias/animal). Os animais somente infectados e controles receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

CFU-GM / Fêmur x 10^3

N	Controle (veículo)	I (veículo)	I/Sp 50 mg/kg	I/Sp 150 mg/kg	I/Sp 200 mg/kg	I/Sp 300 mg/kg
1	11,0	12,0	17,1	32,7	30,2	10,9
2	16,0	17,8	15,0	21,2	28,9	13,7
3	21,0	16,9	13,7	20,9	24,5	15,4
4	18,4	14,2	15,9	24,4	21,7	14,5
5	16,0	13,6	11,6	21,4	23,2	11,1
6	17,7	15,8	14,0	22,9	25,3	12,3
X	**16,2**	**15,1**	**14,6**	**23,9**	**25,6**	**13,0**
DP	**3,4**	**2,2**	**1,9**	**4,5**	**3,3**	**3,3**

Tabela 4: Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à infecção com *Listeria monocytogenes*, sacrificados 48 horas após a inoculação da bactéria. Os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose subletal da bactéria ($1x10^3$ bactérias/animal). Os animais somente infectados e controles receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

CFU-GM / Fêmur x 10^3

N	Controle (veículo)	I (veículo)	I/Sp 50 mg/kg	I/Sp 150 mg/kg	I/Sp 200 mg/kg	I/Sp 300 mg/kg
1	11,0	8,0	16,8	24,8	24,1	15,8
2	16,0	7,3	15,0	30,1	23,8	11,9
3	21,0	5,3	13,5	24,4	31,8	13,9
4	18,4	4,8	19,6	31,6	26,8	14,5
5	16,0	6,2	20,6	34,1	30,7	12,1
6	17,7	7,0	16,4	31,5	31,3	18,7
X	**16,2**	**6,4**	**17,0**	**29,4**	**28,1**	**14,5**
DP	**3,4**	**1,2**	**2,7**	**4,0**	**3,7**	**2,8**

Tabela 5: Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à infecção com *Listeria monocytogenes*, sacrificados 72 horas após a inoculação da bactéria. Os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose subletal da bactéria ($1x10^3$ bactérias/animal). Os animais somente infectados e controles receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

CFU-GM / Fêmur x 10^3

N	Controle (veículo)	I (veículo)	I/Sp 50 mg/kg	I/Sp 150 mg/kg	I/Sp 200 mg/kg	I/Sp 300 mg/kg
1	11,0	8,8	24,9	36,8	31,7	19,3
2	16,0	6,5	17,8	27,2	30,2	20,1
3	21,0	8,8	22,5	20,7	43,9	15,9
4	18,4	7,8	20,6	37,3	27,5	12,3
5	16,0	7,3	17,3	41,8	29,3	15,8
6	17,7	8,6	20,8	31,7	38,2	17,8
X	**16,2**	**8,0**	**20,7**	**32,6**	**33,5**	**16,9**
DP	**3,4**	**0,9**	**2,9**	**7,7**	**6,3**	**3,5**

Tabela 6: Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos e sacrificados 24 horas após o término do tratamento. Os animais controle receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

CFU-GM / Baço x 10^2

N	**Controle (veículo)**	**Sp 50 mg/kg**	**Sp 150 mg/kg**	**Sp 200 mg/kg**	**Sp 300 mg/kg**
1	10,8	18,0	8,6	14,0	21,7
2	6,1	16,2	13,0	13,1	15,9
3	12,6	17,3	15,2	11,7	18,5
4	15,1	14,0	16,2	15,9	17,9
5	8,6	22,6	17,3	16,1	15,3
6	16,2	10,8	18,4	12,7	12,7
X	**11,6**	**16,5**	**14,8**	**13,9**	**17,0**
DP	**3,9**	**4,0**	**3,6**	**1,8**	**3,1**

Tabela 7: Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à infecção com *Listeria monocytogenes*, sacrificados 24 horas após a inoculação da bactéria. Os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose subletal da bactéria ($1x10^3$ bactérias/animal). Os animais somente infectados e controles receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

CFU-GM / Baço x 10^2

N	Controle (veículo)	I (veículo)	I/Sp 50 mg/kg	I/Sp 150 mg/kg	I/Sp 200 mg/kg	I/Sp 300 mg/kg
1	10,8	18,0	10,1	15,8	14,5	15,4
2	6,1	19,4	21,6	23,8	13,9	20,1
3	12,6	17,3	18,7	21,6	18,3	18,3
4	15,1	14,0	11,5	10,8	11,7	15,1
5	8,6	17,3	9,7	14,0	20,1	13,7
6	16,2	22,7	10,1	12,6	12,2	14,3
X	**11,6**	**18,1**	**13,6**	**16,4**	**15,1**	**16,2**
DP	**3,9**	**2,9**	**5,2**	**5,2**	**3,4**	**2,5**

Tabela 8: Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à infecção com *Listeria monocytogenes*, sacrificados 48 horas após a inoculação da bactéria. Os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose subletal da bactéria ($1x10^3$ bactérias/animal). Os animais somente infectados e controles receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

CFU-GM / Baço x 10^2

N	Controle (veículo)	I (veículo)	I/Sp 50 mg/Kg	I/Sp 150 mg/kg	I/Sp 200 mg/kg	I/Sp 300 mg/kg
1	10,8	75,6	20,7	15,8	14,3	19,7
2	6,1	81,0	13,9	11,5	19,7	18,3
3	12,6	88,9	15,5	12,6	13,3	23,1
4	15,1	70,2	19,7	21,6	16,8	12,9
5	8,6	73,4	12,3	14,0	17,5	13,3
6	16,2	63,3	11,2	11,5	15,1	11,7
X	**11,6**	**75,4**	**15,6**	**14,5**	**16,1**	**16,5**
DP	**3,9**	**8,8**	**3,9**	**3,8**	**2,3**	**4,5**

Tabela 9: Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à infecção com *Listeria monocytogenes*, sacrificados 72 horas após a inoculação da bactéria. Os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose subletal da bactéria ($1x10^3$ bactérias/animal). Os animais somente infectados e controles receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

CFU-GM / Baço x 10^2

N	Controle (veículo)	I (veículo)	I/Sp 50 mg/kg	I/Sp 150 mg/kg	I/Sp 200 mg/kg	I/Sp 300 mg/kg
1	10,8	74,9	13,1	20,1	18,1	18,3
2	6,1	70,2	12,7	12,7	13,7	15,6
3	12,6	73,4	15,3	15,9	14,1	12,3
4	15,1	59,4	17,9	11,3	13,3	19,4
5	8,6	85,7	14,4	16,4	17,4	23,1
6	16,2	56,1	20,3	12,1	12,1	25,7
X	**11,6**	**70,0**	**15,6**	**14,8**	**14,8**	**19,1**
DP	**3,9**	**10,8**	**3,0**	**3,3**	**2,4**	**4,9**

Tabela 10: Peso do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos e sacrificados 24 horas após o término do tratamento. Os animais controle receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

Peso (mg)

N	**Controle (veículo)**	**Sp 50 mg/kg**	**Sp 150 mg/kg**	**Sp 200 mg/kg**	**Sp 300 mg/kg**
1	211	203	210	205	210
2	176	170	177	211	215
3	189	226	193	198	193
4	193	201	188	196	189
5	191	198	186	188	190
6	200	185	191	175	210
X	**193**	**197**	**191**	**196**	**201**
DP	**11**	**19**	**11**	**13**	**12**

Tabela 11: Peso do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à infecção com *Listeria monocytogenes*, sacrificados 24 horas após a inoculação da bactéria. Os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose subletal da bactéria ($1x10^3$ bactérias/animal). Os animais somente infectados e controles receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

Peso (mg)

N	Controle (veículo)	I (veículo)	I/Sp 50 mg/Kg	I/Sp 150 mg/Kg	I/Sp 200 mg/Kg	I/Sp 300 mg/Kg
1	211	215	225	215	215	177
2	176	203	211	205	225	187
3	189	199	198	228	219	199
4	193	227	187	214	198	205
5	191	241	188	211	199	211
6	200	230	177	201	197	225
X	**193**	**219**	**198**	**212**	**208**	**201**
DP	**11**	**16**	**18**	**9**	**12**	**17**

Tabela 12: Peso do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à infecção com *Listeria monocytogenes*, sacrificados 48 horas após a inoculação da bactéria. Os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose subletal da bactéria ($1x10^3$ bactérias/animal). Os animais somente infectados e controles receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

Peso (mg)

N	Controle (veículo)	I (veículo)	I/Sp 50 mg/kg	I/Sp 150 mg/kg	I/Sp 200 mg/kg	I/Sp 300 mg/kg
1	211	253	185	218	175	208
2	176	271	179	198	188	220
3	189	291	215	196	198	190
4	193	307	220	186	195	186
5	191	318	201	221	189	179
6	200	288	215	200	211	199
X	**193**	**288**	**203**	**203**	**193**	**197**
DP	**11**	**24**	**17**	**14**	**12**	**15**

Tabela 13: Peso do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de *Spirulina sp* (50, 150, 200 e 300 mg/kg/dia) por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à infecção com *Listeria monocytogenes*, sacrificados 72 horas após a inoculação da bactéria. Os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose subletal da bactéria ($1x10^3$ bactérias/animal). Os animais somente infectados e controles receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

Peso (mg)

N	Controle (veículo)	I (veículo)	I/Sp 50 mg/kg	I/Sp 150 mg/kg	I/Sp 200 mg/kg	I/Sp 300 mg/kg
1	211	241	223	196	190	201
2	176	273	215	198	189	222
3	189	239	208	200	211	218
4	193	295	219	206	225	213
5	191	287	199	230	216	206
6	200	277	187	189	208	188
X	**193**	**269**	**209**	**203**	**207**	**208**
DP	**11**	**24**	**14**	**14**	**14**	**12**