

UNICAMP

PAPEL DA UMBELLIFERONA NA PRODUÇÃO DE CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS EM MODELO MURINO DE LISTERIOSE

Aquino, C.B.; Ferreira, F.G.; Silva, M.S.; Torello, C.O.; Araújo, R.S.A.; Filho, J.M.B.; Queiroz, M.L.S.

Centro de Hematologia e Hemoterapia - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Palavras Chave: Progenitores Mielóides – Umbeliferona – *Listeria monocytogenes*

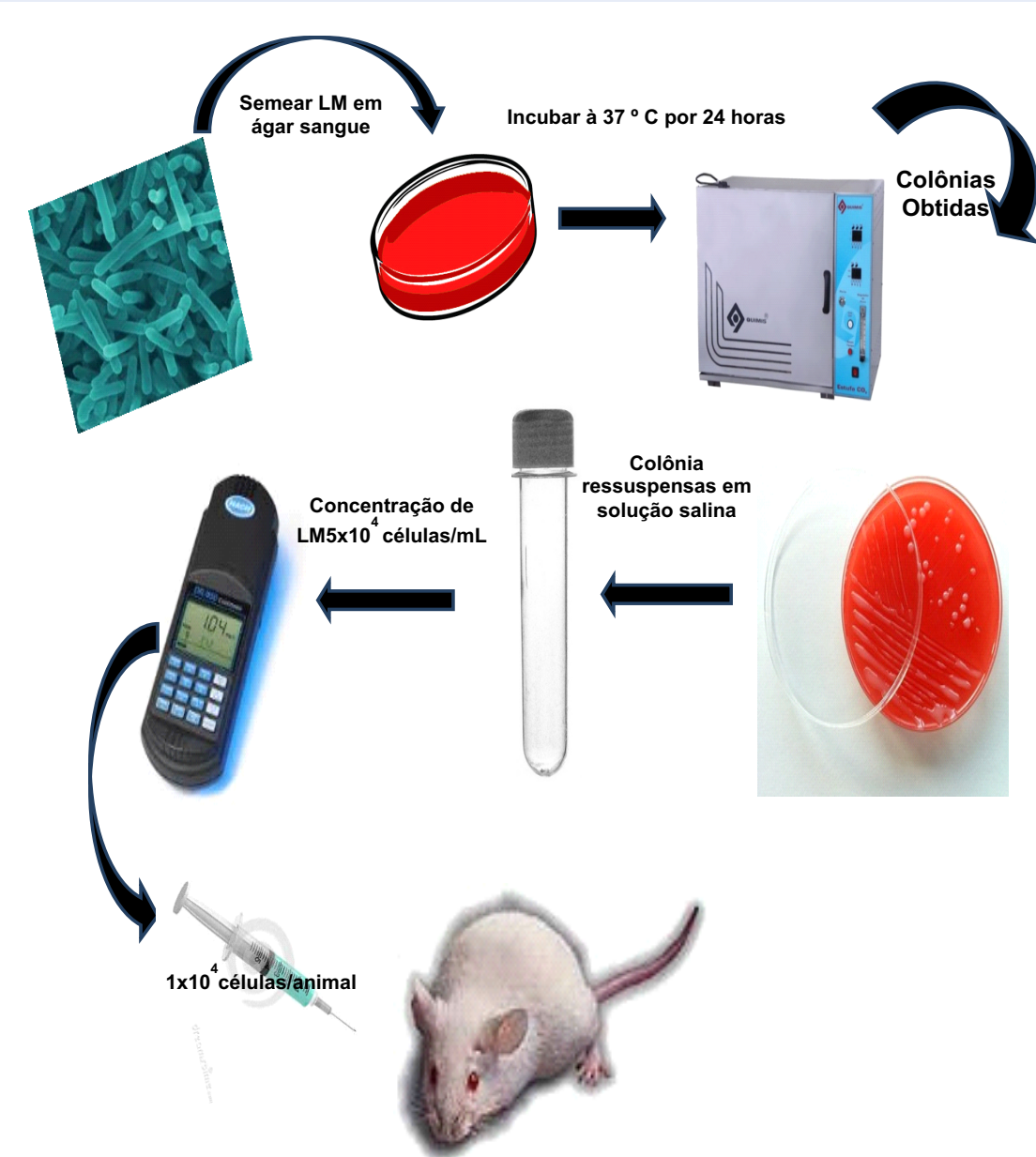


INTRODUÇÃO

A busca por métodos alternativos de combate e prevenção de diversas doenças tem aumentado nos últimos anos, levando a um grande interesse em cumarinas, uma vez que estas substâncias apresentam atividades farmacológicas relevantes^[1-2]. Em seres humanos, estes metabólitos possuem uma meia-vida curta, e o seu principal produto de biotransformação é a umbelliferona ou 7-hidroxicumarina (7-HC)^[3-4] a qual destaca-se, principalmente por sua propriedade imunomoduladora^[6-7], que neste trabalho foi isolada da planta hidrófita *Typha domingensis*^[5]. Baseando-se nas características farmacológicas, nós estudamos os efeitos da 7-HC nas células progenitoras hematopoéticas, utilizando o modelo de Listeriose murina. A *Listeria monocytogenes* (LM) é um bacilo Gram-positivo, facultativo intracelular que se replica principalmente no interior de macrófagos e desencadeia um aumento marcante na resposta imune inata que requer interações entre neutrófilos, macrófago, células NK e células T. Existem evidências de que um maior número de células progenitoras na medula óssea antes da infecção favoreça a sobrevivência de camundongos infectados com LM^[8-9]. Seguindo esta linha, vários estudos demonstram que a resistência à infecção por LM é dependente da capacidade do hospedeiro de estimular, na medula óssea, as células progenitoras, responsáveis pelo desenvolvimento de granulócitos e macrófagos^[9]. As células primitivas hematopoéticas (HSC) da medula óssea são definidas como células pluripotentes que dão origem a todas as linhagens de células sanguíneas^[10], essas células são altamente enriquecidas por uma população celular caracterizada pelos marcadores Lin⁻ c-Kit⁺, sendo que o c-Kit é um receptor de citocinas, que se liga ao fator de células tronco (stem cell factor - SCF) e está diretamente relacionado com sobrevivência, proliferação e diferenciação celular^[11]. Adicionalmente, marcadores de superfície específicos para algumas linhagens, como Gr1⁺ CD11b⁺ caracterizam células progenitoras comprometidas com a linhagem mielóide, que posteriormente originarão macrófagos e granulócitos^[11-12]. Diante disto, nós estudamos o efeito da 7-HC nas células tronco pluripotente avaliando a população Lin⁻ c-Kit⁺ e as progenitoras mielóides Gr1⁺ CD11b⁺ na medula óssea de camundongos infectados com LM.

METODOLOGIA

Listeria monocytogenes foi obtida do Laboratório de Microbiologia (Departamento de Patologia Clínica, Hospital das Clínicas, UNICAMP). O preparo do inóculo foi realizado conforme descrito abaixo.



O experimento de citometria de fluxo foi realizado no laboratório de Biologia Molecular e Terapia Gênica do Centro de Hemoterapia e Hematologia de Campinas – UNICAMP.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos dias atuais, existe uma grande quantidade de prescrições de medicamentos a base de plantas, e o interesse no uso desses medicamentos está em ascensão^[15]. Dentre diversas espécies botânicas disponíveis na terapêutica destacamos as cumarinas, devido suas diversas atividades farmacológicas. Através dos experimentos descritos acima nós estudamos os efeitos da 7-HC na resposta hematopoética em camundongos infectados com LM, usando como parâmetro o número de progenitores hematopoéticos primitivos (CD117⁺Lin⁻) e progenitores hematopoéticos de macrófagos e granulócitos (Gr1⁺ CD11b⁺) na medula óssea. Nossos resultados demonstraram que a infecção com LM reduz significativamente os progenitores mielóides (Gr1⁺ CD11b⁺) na medula óssea. O tratamento com 250 mg/Kg de 7-HC (Figura 01), foi capaz de reverter essa redução dos progenitores (Gr1⁺ CD11b⁺) na medula óssea de camundongos infectados (p<0,01).

Além disso, notamos que a droga não altera a população de Gr1⁺ CD11b⁺ na medula dos camundongos saudáveis. Este trabalho comprovou que a infecção com LM não é capaz de afetar a população (CD117⁺ Lin⁻) de células tronco pluripotentes da medula óssea (dados não mostrados).

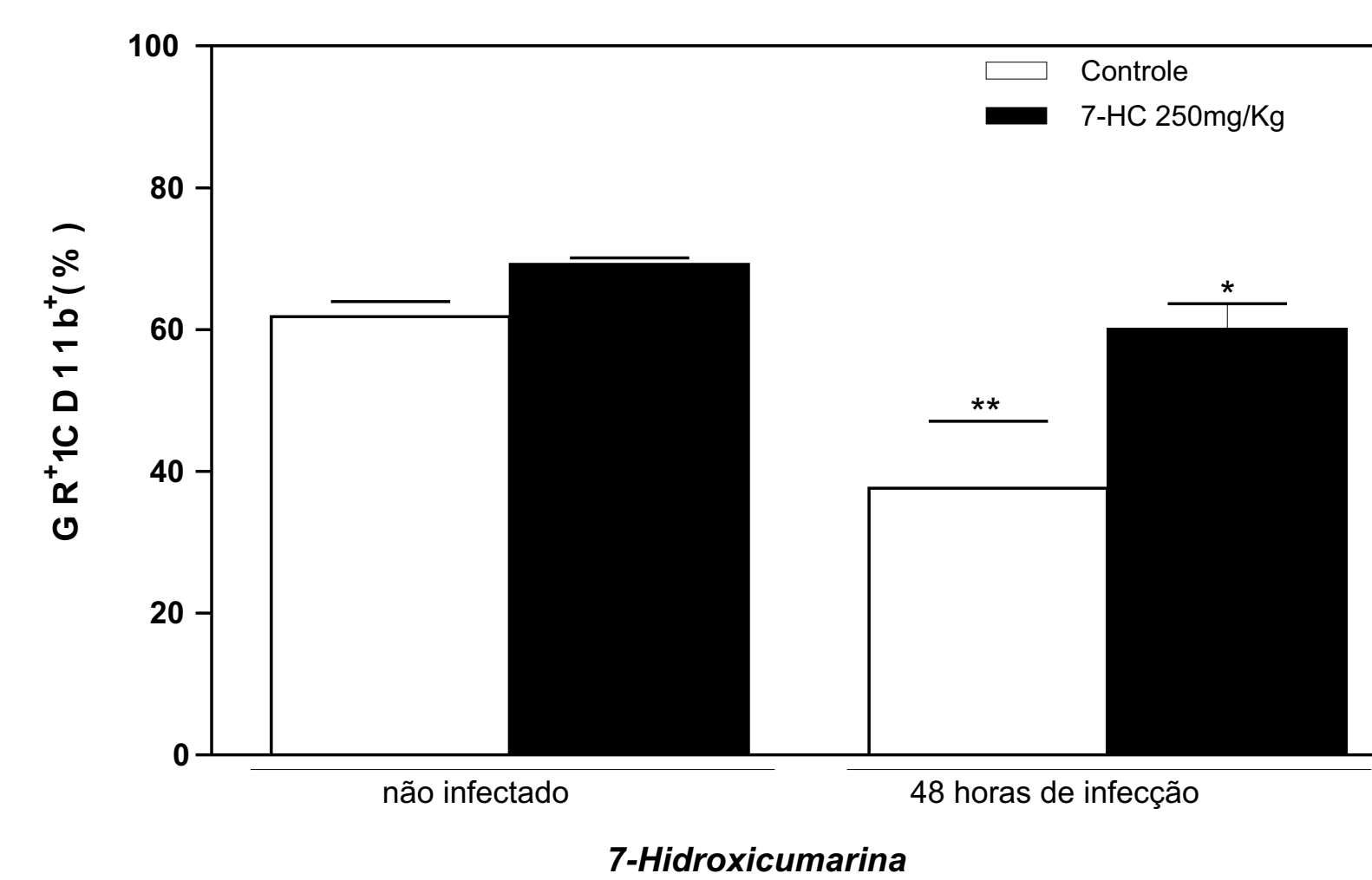


Figura 01. Progenitores Mielóides (Gr1⁺ CD11b⁺). Porcentagem dos progenitores mielóides (Gr1⁺ CD11b⁺) em camundongos Balb/c tratados por via oral com 7-HC, a 250 mg / kg / dia por 7 dias antes da infecção. Os camundongos foram divididos em grupos sendo eles: Sem infecção, 24 horas de infecção, 48 horas de infecção e 72 horas de infecção e então foram sacrificados após o último tratamento nos respectivos tempos. Os camundongos controle receberam apenas veículo (salina). Os resultados foram estatisticamente significantes apresentando *P <0,01 comparando-se os animais infectados ao grupo controle.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados discutidos acima, podemos concluir que após a inoculação da LM no camundongo balb/C, a população de Gr1⁺ CD11b⁺ na medula óssea reduz significativamente. O tratamento com 250 mg/Kg de 7-HC, foi capaz de reverter essa redução dos progenitores na medula óssea dos camundongos infectados. Tratando-se dos animais saudáveis, podemos concluir que a 7-HC não altera em números a população Gr1⁺ CD11b⁺.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Hengge UR, Benninghoff B, Ruzicka T, Goos M. Topical immunomodulators- progress towards treating inflammation, infection, and cancer. *Lancet Infect Dis*; v.1, p.189-98, 2001.
- 2- Masihi KN. Immunomodulators in infectious diseases: panoply of possibilities. *Int J Immunopharmacol*; v.22, p.1083-9, 2000.
- 3- Houlst, J. R. S.; Payá, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol.* v.27, p.713-722, 1996.
- 4- Egan, D.; James, P.; Cooke, D.; O'Kennedy, R. Studies on the cytostatic and cytotoxic effects and mode of action of 8-nitro-7-hydroxycoumarin. *Cancer Lett.* v.118, p.201-211, 1997.
- 5- Callisto, M.; et al. Chironomids on leaves of *Typha domingensis* in lagoon of Rio de Janeiro State (Brazil). Laboratório de imunologia, departamento de ecologia, instituto de biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1996.
- 6- Pamer EG. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nature Rev Immunol*, v.4, p.812-23, 2004.
- 7- North, R.J.; Dunn, P.L.; Conlan, J.W. Murine listeriosis as a model of antimicrobial defense. *Immunol Rev.* v.158, p.27-36, 1997.
- 8- Queiroz ML., et al., Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Int Immunopharmacol.* v.3(6), p.889-900, 2003.
- 9- Ruco, L.P.; Meltzer, M.S. Stimulation of myelopoiesis in *Listeria monocytogenes*-infected mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. *Cell Immunol.* v.41, p.35-51, 1978.
- 10- Domen J.; Weissman I.L. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol. Med.* p. 201-208, 1999.
- 11- Spangrude G.J.; Heimfeld S.; Weissman I.L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, v.241 p. 58-62, 1988.
- 12- Lyman S.D.; Jacobsen S.E. Jacobsen S.E. C-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood*, v.91, p. 1101-1134, 1998.
- 13- Eberlin, S. Avaliação do extrato de *Uncaria tomentosa* na resposta hematopoética em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- 14- Thati, B., et al. Mechanism of action of coumarin and silver (I)-coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicol. in Vitro.* v.21, p.801-808, 2007.
- 15- Smith, R.C.; Wang, C.T.; Smith, J.R.C.; Hai, C.Z. *BMJ.* v.307, p.1037-1041, 1993.
- 18- Lake, B. G. *Food Chem. Toxicol.* v.37, p.423-453, 1999.
- 19- Marshall, M.E.; Butler, K.; Fried, A. *Mol. Biother.* v.3, p.170-8, 1991.