

ORLANDO MAGNO FERNANDES CARVALHO PINTO

INFLUÊNCIA , *IN VITRO*, DA VANCOMICINA , DA ANFOTERICINA- B DESOXICOLATO E DE AMBAS SOBRE A FUNÇÃO FAGOCITÁRIA, PRODUÇÃO DE RADICAIS DE OXIGÊNIO E FATOR DE NECROSE TUMORAL- α POR FAGÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NORMAIS.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Brasília-DF 2006

ORLANDO MAGNO FERNANDES CARVALHO PINTO

INFLUÊNCIA , *IN VITRO*, DA VANCOMICINA , DA ANFOTERICINA- B DESOXICOLATO E DE AMBAS SOBRE A FUNÇÃO FAGOCITÁRIA, PRODUÇÃO DE RADICAIS DE OXIGÊNIO E FATOR DE NECROSE TUMORAL- α POR FAGÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NORMAIS.

BRASÍLIA – DF

2006

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

INFLUÊNCIA , *IN VITRO*, DA VANCOMICINA , DA ANFOTERICINA- B DESOXICOLATO E DE AMBAS SOBRE A FUNÇÃO FAGOCITÁRIA, PRODUÇÃO DE RADICAIS DE OXIGÊNIO E FATOR DE NECROSE TUMORAL- α POR FAGÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NORMAIS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. MARIA IMACULADA MUNIZ BARBOZA JUNQUEIRA

BRASÍLIA – DF
2006

A Deus,

**a razão e causa da minha
existência.**

DEDICATÓRIA

Este trabalho dedico às pessoas mais especiais da minha vida:

Eliane e Orlando, meus pais,

Cristiane, minha mulher e amiga,

Igor, meu filho espiritual,

Marconi, meu querido irmão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço humildemente a todos animais, criaturas divinas e inocentes, que tiveram suas vidas escravizadas e sacrificadas para que a ciência evoluísse, contribuindo com tantas descobertas em diversas áreas, aplicadas no dia a dia da espécie humana.

Em especial a todos os voluntários que doaram sangue e incentivo para a realização desse trabalho, sem os quais esse estudo não seria possível.

Aos meus pais que com infinita paciência e amor me guiaram pela vida sempre investindo e acreditando em mim.

A minha família, em especial a minha mulher Cristiane que nas horas mais difíceis não só contribuiu com a sua ágil digitação, mas com carinho e apoio.

Aos amigos do Núcleo de Medicina Tropical, César, Juan, Camila, Maria Vitória, Willike, Eleniza com os quais compartilhei tantos momentos felizes durante as aulas do mestrado e tanto aprendi com eles.

A Regina Borges Pacheco amiga sempre pronta a ajudar com sua calma e otimismo.

A todos os professores que doam tanto de suas vidas em prol da pesquisa e do ensino; em especial, Vanize de Oliveira Macedo (inesquecível), Cleudson Nery de Castro, João Barberino Santos, Gustavo Adolfo Sierra Romero, Celeste Aída Nogueira Silveira, Elza Ferreira Noronha, Pedro Luiz Tauil, Carlos Eduardo Tosta da Silva, Edgar Mercham Hamann, Ana Maria Nogales.

A toda equipe do laboratório de Imunologia Celular, pela ajuda com reagentes, lamínulas, contas, lavagem do material, conselhos... Especial agradecimento a Sra. Shirley Claudino Pereira Couto e as pesquisadoras e amigas Mariana Carminatti Martins, Rosana Regina Saldanha, e Viviane Nicolau de Paula Dias Coelho, as quais contribuíram de todas as maneiras para realização desse trabalho.

A minha orientadora Dra. Maria Imaculada Muniz Barbosa Junqueira que entre tantas atividades e pesquisas importantes, sempre esteve presente nas correções, conselhos e apoio.

Aos amigos Patrícia e Marcelo que tantas vezes souberam compreender minha ausência nos programas de finais de semana e me incentivaram sempre.

A toda equipe da Intermed, aos amigos do Hospital Santa Luzia e do HRAN que sempre acreditaram e me ajudaram com troca de plantões, aliviando minha carga horária.

Aos bibliotecários da Biblioteca Central da UNB, pelo auxílio nas pesquisas bibliográficas.

SUMÁRIO

1) LISTA DE ABREVIATURAS	VI
2) RESUMO	VII
ABSTRACT	X
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	13
3) MATERIAL E MÉTODOS	15
• Delineamento dos experimentos	16
• Gráfico do delineamento	17
• Grupos de estudos e aspectos éticos	18
• Concentração da anfotericina-B desoxicolato e da vancomicina	19
• Avaliação da capacidade fagocitária	20
• Teste do Nitroblue Tetrazolium (NBT)	23
• Produção do fator de necrose tumoral- α	24
• Análise estatística	26
4) RESULTADOS	28
5) DISCUSSÃO	69
6) CONCLUSÕES	87
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
8) ANEXOS	112

LISTA DE ABREVIATURAS

CMN	Células mononucleares
CO ₂	Dióxido de carbono
DP	Desvio padrão
FNT- α	Fator de necrose tumoral- α
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
INF- γ	Interferon- γ
IMC	Índice de massa corporal
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
LPS	Lipopolissacárideo
MIC	Concentração Inibitória Mínima
NADPH	Nicotinamida adenine dinucleotídeo
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NBT	Nitroblue tetrazolium
NO	Óxido nítrico
NOS _i	Óxido nítrico sintase induzível
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
SFB	Soro fetal bovino
STF	Solução salina tamponada com fosfato
TGF- β	Fator transformador de crescimento- β
HLA-DR	Antígeno DR de leucócitos humanos

RESUMO

A melhora do atendimento médico em unidades de terapia intensiva tem aumentado a sobrevivência dos pacientes, entretanto, têm aumentado o risco de infecções hospitalares múltiplas e graves. Isto resulta na necessidade de associar drogas antimicrobianas potentes, como a vancomicina e a anfotericina-B. Pouco tem sido estudado da ação destas drogas sobre as funções dos fagócitos que são a primeira linha de defesa contra os patógenos a que estes pacientes estão submetidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da anfotericina-B e vancomicina, isoladas ou associadas sobre as funções dos fagócitos. Foram retirados, após consentimento informado, 15 ml de sangue periférico de 20 indivíduos normais para avaliar a influência da anfotericina-B desoxicolato (2 mg/L) e da vancomicina (40 µg/ml), isoladamente ou associadas, sobre a capacidade fagocitária dos neutrófilos por meio dos receptores para padrões moleculares de patógenos e por meio de receptores para componentes do sistema do complemento, *in vitro*. O índice fagocitário foi determinado pela multiplicação da média de *Saccharomyces cerevisiae* ingeridas por fagócito pela proporção de fagócitos envolvidos na fagocitose. A avaliação da capacidade oxidativa dos fagócitos foi feita pelo teste do *Nitro blue tetrazolium* e produção de fator de necrose tumoral – α pelos monócitos em cultura foi avaliada pelo teste de ELISA. A vancomicina, anfotericina-B ou associação de ambas deprimiram a capacidade fagocitária dos neutrófilos, tanto quando avaliado por meio de receptores para padrões moleculares de patógenos, quanto por meio de receptores para complemento. A anfotericina-B desoxicolato diminuiu a porcentagem de fagócitos que reduzem o *nitro blue tetrazolium* (NBT) estimulado, enquanto a vancomicina não influenciou a produção de radicais de oxigênio, nem pela redução do NBT basal, nem estimulado. A associação anfotericina-B e vancomicina diminuiu a proporção de fagócitos que reduzem fracamente o NBT basal ($p=0,0137$) e o NBT estimulado ($p=0,0764$). A vancomicina não influenciou a produção de FNT- α , enquanto a anfotericina-B desoxicolato e a associação dela com a vancomicina aumentaram a produção desta citocina pelos monócitos. Enquanto para a anfotericina-B este efeito foi evidenciado quando os monócitos não estavam estimulados ($p=0,0705$), para a associação

anfotericina-B e vancomicina o aumento da produção do FNT- α ocorreu quando os monócitos foram estimulados pelo LPS ($p=0,0593$). Nossos dados mostraram que os antimicrobianos avaliados causaram, pelo menos *in vitro*, isolados ou associados, redução da capacidade fagocitária pelos neutrófilos de indivíduos saudáveis, tanto por meio de receptores para padrões moleculares de patógenos, quanto para receptores para complemento. No entanto, a anfotericina-B causou tendência ao aumento da produção de FNT- α por monócitos não estimulados por LPS, e quando em associação com vancomicina, também aumentou a produção dessa citocina por monócitos estimulados. Estas características imunomoduladoras das drogas podem ser benéficas, se a escolha de um dos antimicrobianos ou a associação de ambos, for feita baseado em critérios clínicos do paciente, microbiológico da infecção, e imunomoduladora da droga. Salientando que a produção diminuída de ânions superóxido pode, em determinadas circunstâncias, ser benéfica, e que produção exagerada pode causar dano a tecidos sãos. O FNT- α , como citocina pró-inflamatória, pode potencializar a capacidade microbicida dos fagócitos, favorecendo ao processo de cura, mas também é um dos principais causadores do choque séptico e falência orgânica. Nossos dados mostraram tanto a anfotericina como a vancomicina podem deprimir a capacidade fagocitária, mas a associação das duas drogas não agrava esta deficiência. Estas deficiências do sistema imunitário devem ser consideradas na prescrição destas drogas.

ABSTRACT

The improvement of the medical service in intensive therapy units has been increasing the survival of patients, however, they have also been increasing the risk of multiple and serious nosocomial infections. This fact results in the need of associating potent antimicrobial drugs, as vancomycin and amphotericin-B. Little has been studied about the action of these drugs on phagocyte functions, that are the first line of defense against extracellular pathogenic microorganisms, to which these patients are submitted to. This work aimed to evaluate the influence of the amphotericin-B, vancomycin, or both on phagocyte functions. Phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae* by peripheral blood neutrophils of 20 healthy individuals was assessed in the absence or presence of amphotericin-B deoxicolate (2 mg/L), vancomycin (40 µg/ml) or both, through pattern recognition receptors and through complement receptors, *in vitro*. The phagocytic index was calculated as the average number of ingested *Saccharomyces cerevisiae* yeasts per phagocytosing neutrophil multiplied by the percentage of these cells engaged in phagocytosis. The microbicidal mechanism of phagocytes was assessed by their ability to generate toxic oxygen radicals capable of reducing the nitro blue tetrazolium (NBT) compound. The production of tumor necrosis factor- α by peripheral blood mononuclear cells in culture was assessed by an ELISA test. The vancomycin, amphotericin-B and both, decreased the phagocytic indices of neutrophils, through pattern recognition receptors and complement receptors. Amphotericin-B decreased the stimulated percent of NBT reduction, while the vancomycin did not influence it. The association of amphotericin-B and vancomycin decreased the weak basal ($p=0,0137$) and stimulated ($p=0,0764$) percent of NBT reduction. The

vancomycin did not influence the production of TNF- α , while the amphotericin-B and the association of both drugs increased the production of this cytokine by monocytes. However, for amphotericin-B this effect was evidenced for non-stimulated monocytes ($p=0,0705$), while for the association of both drugs this effect was evidenced for LPS stimulated monocytes($p=0,0593$). Our data showed that, at least in vitro, these drugs reduced the phagocytic capacity of neutrophils of healthy volunteers. However, the amphotericin-B caused tendency to increase the production of TNF- α by LPS non-stimulated monocytes, and when in association with vancomycin, it also increased the production of this cytokine by stimulated monocytes. It should be pointed that the reduced production of superoxide anions can be beneficial in defense against pathogens. However, the increased production of these molecules can damage healthy tissues. TNF- α is a pro-inflammatory cytokine, that can potentiate phagocyte microbicide capacity, favoring to the cure process, but it is also one of the main causes of the septic shock. Our data showed that amphotericin-B and vancomycin can depress the phagocytic capacity of neutrophils, but the association of the two drugs does not worsen this deficiency. These immune system deficiencies should be considered in the prescription of these drugs.

INTRODUÇÃO

A melhora do atendimento médico em hospitais terciários e em unidades de terapia intensiva tem propiciado um significativo aumento na sobrevivência dos pacientes. Entretanto, a gravidade das patologias de base, associada à utilização prolongada de equipamentos, a utilização de métodos invasivos que ocasionam lesão de continuidade em pele e mucosas e tempo prolongado em ambiente hospitalar, muitas vezes associadas ao comprometimento das funções do sistema imunitário, têm aumentado também o risco de infecções hospitalares múltiplas e graves nestes pacientes. Isto resulta na necessidade de associação de drogas antimicrobianas específicas, muito freqüentemente, para estes pacientes, como a vancomicina e a anfotericina-B.

Os cocos Gram-positivos, em especial o *Staphylococcus aureus*, estão entre os microorganismos que mais freqüentemente causam infecções em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (Daum e cols., 1992). O aumento da resistência deste microorganismo aos antibióticos é um problema mundial no tratamento de pacientes graves. O uso generalizado de antimicrobianos e a grande possibilidade de disseminação de cepas resistentes ajudam explicar que certos ambientes estão sob risco particularmente elevado de desenvolver esse problema, como nos hospitais terciários, unidades de terapia intensiva e alguns indivíduos, como os imunodeprimidos (Endtz e cols., 1999).

Infecções por estafilococos geralmente iniciam na pele como uma celulite ou impetigo, em sítios diversos, podendo disseminar-se para diferentes tecidos e órgãos e provocar episódios graves como bacteremia, pneumonia,

osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite, meningite, abscessos musculares e cerebrais e septicemia (Sheagren, 1988).

Tem sido demonstrado que, desde 1999 a freqüência de infecções por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina ultrapassa 50% do total de infecções entre os pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva. Os índices de mortalidade são significativamente mais altos em pacientes que desenvolvem bacteremia por cepas resistentes a meticilina (49 a 55%), do que quando a infecção é por *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (20 a 32%). Os índices de mortalidade foram 2,5 vezes maiores nos casos de infecções por cepas resistentes (21%) do que por cepas sensíveis (8%) (Tavares, 2001). Nestes casos de resistência do *Staphylococcus aureus* à meticilina a opção terapêutica mais freqüente é a vancomicina (Cooper and Given, 1986; Moellering e cols. 2006).

Os enterococos são também causas freqüentes de infecções nosocomiais, incluindo infecções do trato urinário e bacteremia (Murray 1990; Schaberg e cols., 1991; Spera e Farber, 1992) para os quais a vancomicina também representa uma importante opção terapêutica. (Murray 1990; Moellering e cols., 2006). O desenvolvimento da resistência à vancomicina (Arthur e Courvalin, 1993) está freqüentemente associado à múltiplas resistências a outros agentes antimicrobianos, tendo comprometido seriamente as escolhas de terapias, e já existem infecções para as quais nenhuma opção terapêutica efetiva está disponível (Arduino e Murray, 1993). Atualmente as cepas de *Enterococcus faecium* têm sido dez vezes mais comuns do que os *E.*

faecalis entre os enterococcus resistentes à vancomicina (Clark e cols., 1993; Murray 1990; Arduino e cols.,1994).

Até 1996, todos as cepas resistentes a meticilina eram universalmente sensíveis aos glicopeptídeos, sendo que em julho de 2002, foi publicado pelo *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* a primeira descrição de *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (MIC=32mg/L) relacionada à aquisição por esta cepa, de um gene de resistência classicamente descrito em *enterococcus spp.*: o gene Van A (Endtz e cols., 1999; CDC, 2005; Moellering e cols., 2006).

Os glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) são as drogas clássicas de escolha para o tratamento de infecções causadas por cepas resistentes a meticilina. Estas cepas são sempre resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos: todas as cefalosporinas, inclusive as de quarta geração, assim como os carbapenêmicos, independente do resultado obtido no antibiograma; embora não seja a única ou a melhor opção, a vancomicina vem sendo o antibiótico com maior uso em infecções por estafilococos resistentes à oxacilina apesar dos efeitos colaterais de toxicidade, já que possui um baixo custo (Moellering e cols., 2006).

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídeo descoberto em 1956 por McCormik e cols., extraída de culturas do *Streptomyces orientalis*, um actinomiceto descoberto em amostras de solo obtidas nas selvas da Indonésia. Embora seja uma droga ativa sobre microorganismos gram-positivos, gonococo e alguns anaeróbios, ela é especificamente indicada como uma opção para o tratamento de infecções estafilocócicas sistêmicas em pacientes alérgicos às

penicilinas ou para as infecções por estafilococos resistentes a meticilina e, portanto, as isoxazolilpenicilinas e as cefalosporinas. A vancomicina é ativa em concentrações inferiores a 5 µg/mL contra o *Staphylococcus aureus* e *S.epidermidis* independentemente da sensibilidade destes germes a penicilina G e a meticilina (Moellering e cols., 2006). Administrando-se 1g de 12/12 horas por via endovenosa obtêm-se uma concentração média de 18 a 47 µg/ml, que é bactericida para a maioria das cepas de estafilococos (Sorrel e cols. 1982; Cafferkey e cols. 1982; Viladrich e cols. 1991).

Alem de seus efeitos bactericidas e bacteriostáticos específicos, quase todas as classes de antimicrobianos exercem efeitos sobre o sistema imunitário inato e adquirido. Sulfonamidas, tetraciclina, β-lactâmicos, aminoglicosídeos, lincosamidas, cloranfenicol, rifampicina, benzylpirimidonas, ácido fusídico, fosfomicina, inibidores da β-gyrase, macrolídeos, fluorquinolonas (Labro, 2000), assim como a anfotericina-B e vancomicina, podem aumentar ou diminuir as funções fagocitárias. Para muitas dessas drogas, os mecanismos de imunomodulação não estão bem definidos e alguns eventos são fortemente dependentes do método utilizado no estudo (Dalhoff e Shalitt, 2003).

Pouco tem sido estudado sobre a ação da vancomicina sobre o sistema imunitário. Tem sido observado que ela pode causar neutropenia em alguns pacientes (Segarra-Newnham e Tagoff, 2004). Em macrófagos peritoneais de camundongos a vancomicina pode aumentar a quimiotaxia e a capacidade de aderência a substratos, como também estimular a capacidade fagocitária e a produção de radicais de oxigênio quando utilizada em níveis elevados. O efeito da teicoplanina e da vancomicina sobre o processo fagocitário foi comparado,

avaliando-se as diferentes atividades da função fagocitária dos macrófagos peritoneais de ratos tratados com esses antibióticos. Os resultados indicam que a teicoplanina e a vancomicina aumentam o substrato de aderência e a quimiotaxia dos macrófagos peritoneais, e que nenhum dos dois antibióticos, nas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100 mg/ L, tiveram qualquer capacidade quimioatrativa. Houve um aumento da aderência da *Candida albicans* apenas em macrófagos tratados com vancomicina. A fagocitose da *C. albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e de partículas inertes, assim como, a capacidade de redução do nitroblue tetrazolium aumentaram na presença de ambos antibióticos (Barriga e cols, 1996).

Entretanto, não se encontra ainda totalmente esclarecida influência da vancomicina sobre as funções dos fagócitos humanos.

Por outro lado, a incidência de infecções fúngicas oportunistas sistêmicas tem aumentado dramaticamente durante os últimos 20 anos e presentemente constituem a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes neutropênicos. A incidência de candidíase sistêmica passou de 2,6 casos por milhão de habitantes em 1980-1982 para 228,2 casos por milhão em 1996, assim como o número de casos de aspergilose cresceu de 8,4 para 34,3, e de criptococose, de 4,0 para 29,6 casos por milhão (CDC, 2005). Além do aumento das micoses invasivas graves que colocam a vida em risco, houve aumento da variedade de patógenos que as determinam. Afora os já conhecidos, *Cândida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, observa-se maior número de casos de infecções por espécies de *Cândida* não-*albicans* e de

Aspergillus não-fumigatus, de leveduras não-*Candida*, de *Zygomycetes* e de mofos hialinos e dermatiáceos (Latge, 1999; CDC, 2005).

Apesar de avanços e do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, a anfotericina-B continua sendo a pedra angular para a terapia antifúngica (Gallis e cols. 1990) de pacientes gravemente enfermos com infecção fúngica sistêmica e freqüentemente recomendada como tratamento de segunda linha para leishmaniose visceral, mucocutânea e cutânea, especialmente em casos de co-infecção pelo HIV (Thakur e cols., 1997; Murray, 2000). Contudo, o uso clínico é limitado pela toxicidade intrínseca à molécula, a qual causa disfunção orgânica dose-dependente em alguns casos, assim como a insolubilidade da droga na água requer a adição de um detergente desoxicolato ou lipídeos para infusão endovenosa, para administração em humanos. Apesar das formulações dissolvidas em lipídeos estarem associadas com menores efeitos colaterais elas são de alto custo e não são mais efetivas do que a anfotericina B em desoxicolato (Latge, 1999; Richardson e Kokki, 1998a; 1998b; Tavares 2001).

Apesar do largo uso da anfotericina-B, durante os últimos 30 anos, a farmacocinética desse agente em humanos continua pouco esclarecida. As concentrações séricas medidas após a administração de doses convencionais (0,4-1mg/kg por dia) varia de 0,5 a 2 ug/ml e, normalmente, ultrapassam o MIC para a maioria das formas fúngicas patogênicas. Contudo, a fase de distribuição e eliminação da droga da corrente sangüínea parece ser rápida e seguida por uma fase beta prolongada de aproximadamente 15 dias (Atkinson and Bennett, 1978). Levando em conta a rápida disseminação de infecções

fúngicas em pacientes imunocomprometidos, o papel da concentração tissular da anfotericina B para a eficácia terapêutica é controverso, como foi sugerido por um estudo prévio realizado em oito pacientes (Christiansen e cols. 1985). Nesse estudo a recuperação total da anfotericina-B calculado em apenas 6 pacientes variou de 15,8 a 50,8% da dose administrada; contudo, pesquisas foram realizadas em número limitado de diferentes órgãos. Esses autores sugeriram, baseado em estudo com cães (Craven e cols. 1979), que a bile poderia ser a maior via de excreção, embora nenhum dado em humanos tenha sido apresentado. Eles também sugeriram que a anfotericina-B poderia ser estocada em tecidos na forma bioinativa, embora nenhum metabolismo pôde ser provado.

A anfotericina-B é um antibiótico poliênico hapteno obtido a partir de culturas de um estreptomiceto, o *Streptomyces nodosus*, isolado de amostras de solo obtidas das margens do rio Orenoco, na Venezuela. Ela tem efeito fungistático e fungicida. Além de seu efeito antifúngico, o fármaco apresenta potente ação imunoestimulante, tanto sobre a imunidade humoral como sobre a imunidade celular. Desta maneira, este polieno não só atua sobre os microorganismos infectantes como aumenta a resistência do hospedeiro à infecção, podendo aumentar as propriedades fungicidas dos macrófagos (Lyman e Walsh, 1992; Martin e Cols, 1994; Perfect e Cols, 1987). Esta ação da anfotericina-B é de grande importância clínica, uma vez que pacientes com infecções micóticas sistêmicas com frequência apresentam depressão da imunidade celular (Van Vlem e cols 1996; Tavares, 2001). Existe uma crescente evidência de que a atividade imunoestimulante da anfotericina-B

pode ser responsável por parte de sua atividade antimicrobiana. Muitos autores têm notado diferenças em sensibilidades *in vitro* e *in vivo* da anfotericina-B a vários microorganismos como: *Listeria monocytogenes* (Medoff e cols., 1973; Thomas, Medoff e Kobayashi, 1973; Brajtburg e cols. 1986), *Schistosoma mansoni* (Olds e cols, 1981), *Toxoplasma gondii* (Hisaeda e cols, 1996) e *Trypanosoma cruzi* (Horvath e Zierdt, 1974), sugerindo que mecanismos indiretos estão envolvidos.

A ação fungicida ou fungistática dos polienos é dependente da concentração da droga no meio. A anfotericina-B em baixas concentrações liga-se de maneira reversível à membrana, independente de gasto energético, e provoca aumento da permeabilidade da membrana dos fungos para íons potássio, ocasionando efeito fungistático, com inibição do crescimento do fungo. Em altas concentrações, a ligação da anfotericina B à membrana fúngica requer energia e é irreversível, causando a morte da célula por alterar as propriedades físico-químicas da membrana, que se torna permeável aos constituintes essenciais da célula (fosfatos, nucleotídeos, proteínas) (Tavares, 2001; Hoepric, 1992; Lyman e Walsh, 1992).

A anfotericina-B desoxicolato tem em sua apresentação 50mg de anfotericina, 41mg de deoxicolato e 25 mg de fosfato de sódio como tampão, só podendo ser dissolvida em água ou solução glicosada a 5% , de modo a produzir uma concentração não superior a 10mg / 100ml. A concentração inibitória mínima para *Candida albicans* está entre 0,5 – 3,7 µg/ml. A apresentação convencional da dose de 1mg / kg provoca o nível sérico de 1 µg/ml por 8 horas, caindo para 0,36 µg/mL em 24 horas e para 0,3 µg/mL em

48 horas (Tavares, 2001). Vale salientar que a anfotericina-B é organodepositária, permanecendo na circulação em níveis terapêuticos por 48 horas e sendo detectada no soro em níveis baixos por vários dias após sua administração (Craven e cols. 1979; Christiansen e cols. 1985; Tavares, 2001).

Este antibiótico penetra no interior das células, o que explica sua ação contra o *Histoplasma capsulatum*, parasita intracelular. Está indicada para o tratamento de micoses profundas, particularmente da coccidioidomicose, paracoccidioidomicose, criptococose, histoplasmose, candidíase generalizada, meningites por amebas de vida livre, das infecções por algas e como droga alternativa nas leishmanioses. Sendo indicada também em pacientes granulocitopênicos febris, que permanecem com febre apesar do uso de antimicrobianos antibacterianos por mais de cinco dias, pela possibilidade de infecção fúngica. Sua associação com a vancomicina em pacientes muito graves é uma alternativa terapêutica (Smith, 1973).

Tem sido demonstrado que a febre e os calafrios provocados pelo uso da anfotericina B podem ser decorrentes da produção de prostaglandina E₂, mostrando-se o antibiótico um potente indutor da síntese desta prostaglandina pelas células mononucleares. É possível que tais efeitos sejam também decorrentes da liberação do fator de necrose tumoral e de citocinas de monócitos lesados pela droga (Chia e Mc Manus 1990; Cleary e cols. 1992; Tokuda e cols. 1993; Louie e cols. 1994 e 1995; Tavares, 2001). A eficácia e a toxicidade de certos agentes anti-fúngicos pode estar relacionado a sua capacidade de induzir a produção de citocinas por fagócitos. Louie e cols. 1994; demonstraram que a anfotericina-B (0,25 – 10 mg/L) após 3 e 6 h de

incubação com macrófagos peritoneais de murinos foi capaz de estimular a produção de FNT- α ; mas o mesmo não foi evidenciado com fluconazol e 5 – fluorocitosina.

Pela avaliação da ação da anfotericina-B sobre o sistema imunitário tem sido observado que ela pode potencializar a produção de anticorpos, sendo que para os da classe IgG é maior que os da classe IgM. Ademais, a anfotericina-B aumenta as reações de hipersensibilidade retardada. Tem sido observado que ela pode aumentar a destruição intracelular de microorganismos fagocitados. Entretanto, pode inibir a quimiotaxia dos fagócitos (Tavares, 2001). Os trabalhos analisando sua influência sobre a fagocitose têm sido controversos, mostrando que esta droga pode deprimir, estimular ou não afetar a capacidade fagocitária (Van Vlem e cols, 1996; Nosanchuk e cols, 1999). Tem sido observado também que a anfotericina B pode influenciar a produção de citocinas como a IL1- β e o fator de necrose tumoral- α (Vonk e cols, 1998). Martin e cols. (1994) ao analisar a influência de baixas doses de anfotericina-B sobre a capacidade de monócitos humanos matar *Cândida albicans*, analisada pela pré-incubação de monócitos, durante 6–20h, com baixa concentração desse antifúngico (0,2 μ g/ml), observaram marcante aumento de sua capacidade antifúngica (80% \pm 11%). Diferente de outros estudos, esse efeito não parecia ter sido devido a ativação de monócitos pela anfotericina- B; a explosão respiratória e expressão de antígeno DR de leucócitos humanos estavam inalterados, e nenhum estímulo à liberação de interleucina-1 β ocorreu. A responsabilidade pelo aumento da capacidade fungicida dos monócitos foi atribuída ao acúmulo intracelular da droga, já que não houve alteração da

fagocitose de *Staphylococcus aureus*, e o aumento da morte de *C. albicans* resistentes a anfotericina-B foi mínimo. Ainda continua desconhecido se tais observações poderiam ser estendidas a neutrófilos humanos em uma situação *in vivo*. A ação da anfotericina-B sobre os neutrófilos, que representam a primeira linha de defesa do organismo, ainda está pouco esclarecida.

Ainda não foram estudadas as influências da associação de drogas, como a anfotericina B e a vancomicina, sobre as funções dos fagócitos, desde que estas células fazem parte da defesa inata do indivíduo e a associação destas drogas é freqüente em pacientes graves. O esclarecimento da ação destas drogas, isoladamente ou associadas, pode propiciar um tratamento mais adequado para os pacientes que precisam deste tipo de terapia.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência vancomicina e da anfotericina-B, *in vitro*, isoladamente e associadas, sobre as funções dos fagócitos de indivíduos normais, e foi realizado pela avaliação da capacidade fagocitária de neutrófilos do sangue periférico para leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), produção de radicais de oxigênio (pelo teste do NBT) pelos fagócitos e produção do fator de necrose tumoral- α pelas células mononucleares do sangue periférico, antes e após o tratamento *in vitro* com as duas drogas isoladamente ou associadas.

Objetivos específicos

Avaliação da influência *in vitro* da vancomicina e da anfotericina B, isoladas e associadas, sobre a capacidade fagocitária por meio de receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos na presença de soro fetal bovino e por meio de opsoninas presentes em soro humano fresco.

Avaliação da influência *in vitro* da vancomicina e da anfotericina B, isoladas e associadas, sobre o metabolismo oxidativo pelo teste do nitroblue tetrazolium (NBT).

Avaliação da influência *in vitro* da vancomicina e da anfotericina B, isoladas e associadas, sobre a produção de fator de necrose tumoral- α .

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento dos Experimentos

No presente estudo foram feitos três tipos de abordagem para avaliar a influência da anfotericina-B desoxicolato e da vancomicina, isoladamente ou associadas, sobre a função dos fagócitos de indivíduos normais : o estudo da função fagocitária por meio dos receptores para padrão de reconhecimento e por meio de receptores para componentes do sistema do complemento, a avaliação da capacidade oxidativa dos fagócitos, pelo teste do *Nitro blue tetrazolium* e produção de fator de necrose tumoral – α pelos monócitos em cultura. O diagrama do protocolo experimental encontra-se descrito na **figura 1**.

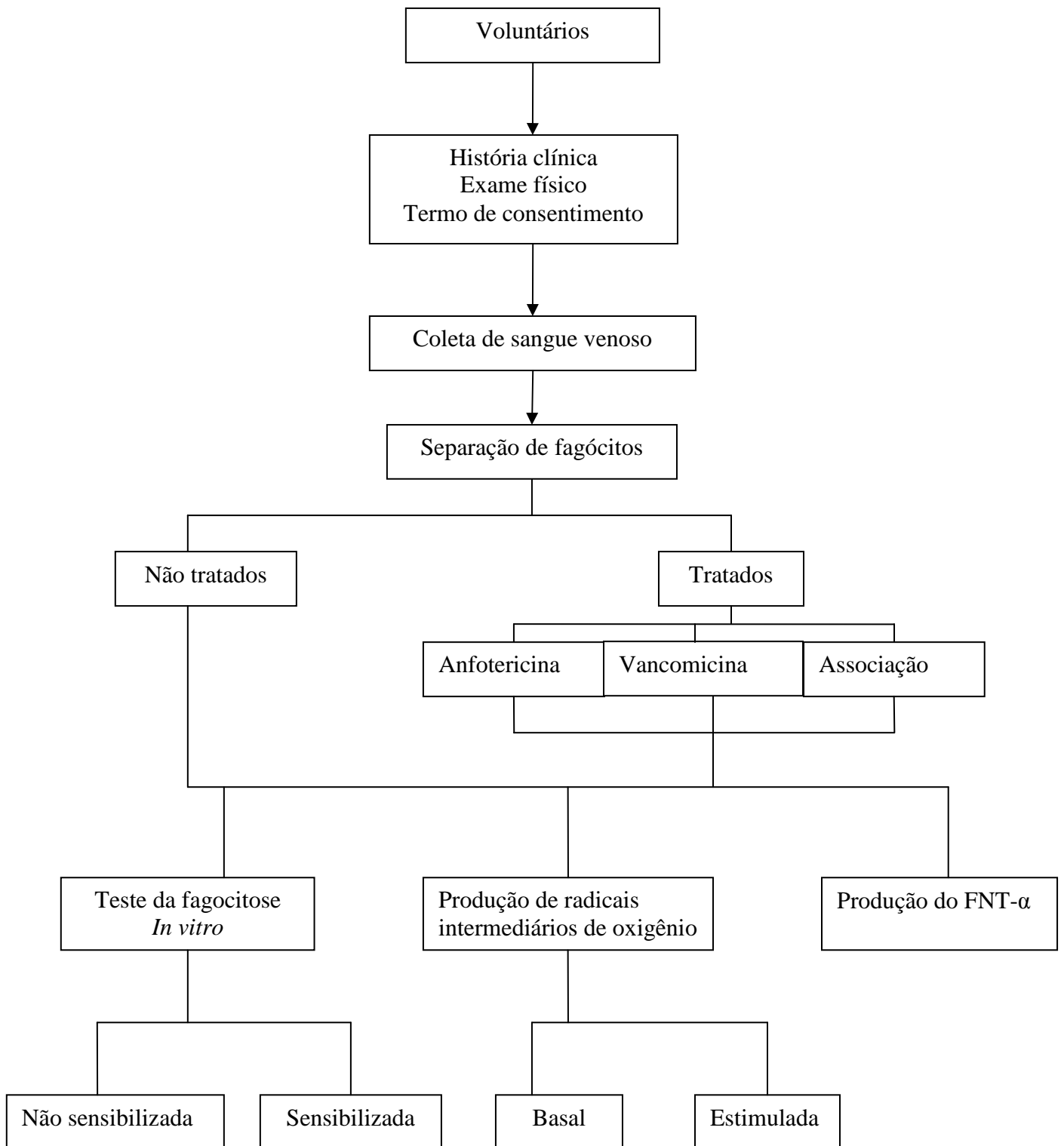


Figura 1. Delineamento experimental

Grupos de estudo e aspectos éticos

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da UnB, no qual se avaliou a influência dos antimicrobianos vancomicina e anfotericina-B sobre as funções dos fagócitos in vitro utilizando sangue periférico de indivíduos normais.

As normas éticas para a pesquisa científica em seres humanos, estabelecidas pela declaração de Helsinki atualizada e pelo Ministério da Saúde Brasileiro, resolução 196/96, foram rigorosamente observadas. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Foram incluídos no estudo somente os indivíduos que consentiram voluntariamente em participar da pesquisa, e que leram e assinaram o termo de consentimento que se encontra em anexo. Foram selecionados 20 indivíduos voluntários normais, dos quais foram coletados 10ml de sangue venoso periférico com vacutainer heparinizado e 5ml não heparinizado, por punção da veia radial, mediante o uso de material estéril e descartável, uma única vez, precedido pelo consentimento escrito dos voluntários após serem informados sobre os objetivos do projeto e dos procedimentos a serem realizados. Para esta avaliação foram utilizados fagócitos desses 20 indivíduos normais, sendo 12 homens e 8 mulheres cujas idades variaram de 20 a 40 anos, sendo a média $28,4 \pm 6,0$ DP e peso de 47 a 87kg, com média $66,4 \pm 12,2$ DP e IMC cuja média foi $23 \pm 2,8$ DP.

Os critérios de exclusão foram: qualquer doença que possa alterar a resposta imunitária, idade maior que 40 anos ou menor que 20 anos, hábitos

de tabagismo e/ou alcoolismo, uso de medicamentos ou drogas, cirurgias há menos de um ano, diabetes, obesidade mórbida, doenças auto-imunes, infecciosas, alérgicas, gastrointestinais ou outras, desnutrição, gestantes, alterações renais, câncer ou outra situação clínica que possa alterar a função do sistema imunitário.

O trabalho foi realizado e desenvolvido com total isenção de quaisquer conflitos de interesse.

Concentração da anfotericina-B desoxicolato utilizada nos testes *in vitro*:

Cada frasco comercializado de anfotericina B desoxicolato (Cristália, Itapira - SP) tem 50mg de anfotericina, 41mg de desoxicolato e 25 mg de fosfato de sódio como tampão. O frasco foi diluído com 10ml de água destilada. Os fagócitos foram submetidos ao tratamento com 2mg/ L da droga baseado na concentração terapêutica observada durante tratamento. (Collette e cols., 1989)

Concentração da vancomicina utilizada nos testes *in vitro*:

Utilizamos o cloridrato de vancomicina (ABL, Cosmópolis - SP); na apresentação de 1g de pó liofilizado que foi reconstituído com água estéril.

A vancomicina foi utilizada na dose de 40 µg /mL, pois doses fixas de vancomicina 1g a cada 12h produzem um pico e uma concentração sérica que varia de 18µg/mL até 47µg/mL (Cantú T G e cols.).

Teste de fagocitose pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos ou pelos receptores para complemento.

Para avaliar a capacidade fagocitária de neutrófilos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos e pelos receptores para complemento foi realizado o teste de fagocitose descrito por Muniz-Junqueira e cols, 2003, na presença do soro fetal bovino inativado ou soro fresco do próprio paciente, respectivamente. A técnica realizada na presença de soro fetal bovino inativado permite avaliar a ingestão de partículas por meio dos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, entre eles, os receptores para manose, glucana e receptores de limpeza. Quando as leveduras são sensibilizadas com soro fresco do próprio indivíduo a fagocitose realiza-se principalmente por meio dos receptores para complemento, presentes na superfície dos fagócitos (Gordon, 2002).

Foram coletados 15 ml de sangue venoso, sendo 10 ml em vacutainer heparinizado estéril, o qual era centrifugado e retirado o plasma a fim de sensibilizar as leveduras e 5 ml de sangue venoso em vacutainer não heparinizado estéril, do qual eram dispostos 40 μ L de sangue por escavação em lâminas para microscopia previamente marcadas com epóxi, delimitando uma área de 7mm de diâmetro, contendo 8 áreas cada lâmina. Em seguida as lâminas eram incubadas em câmara úmida a 37°C por 45 min. Após este tempo as células não aderentes (hemácias e linfócitos) eram retiradas pela lavagem das lâminas com salina tamponada com fosfato (STF), pH 7,2 a 37°C, em ambiente umidificado e incubadas por 30 minutos com vancomicina ou anfotericina B ou ambas ou sem nenhuma droga, apenas meio de cultura,

como controle, em câmara úmida a 37°C. Em seguida as células eram incubadas com 20 *Saccharomyces cerevisiae* por fagócito em Hanks-triz (Gibco), com soro fetal bovino (Gibco) (não sensibilizadas) e em outra lâmina com soro humano fresco do próprio paciente (sensibilizadas). Em seguida as preparações eram novamente lavadas com STF, pH 7,2 para retirar as leveduras não fagocitadas, sendo que a última lavagem era realizada com Hanks-Triz contendo 30% de SFB para melhor preservar as preparações. As lâminas eram secas em vento quente, fixadas com metanol absoluto (Vetec) por um minuto e coradas com Giemsa (Dinâmica) a 10% em tampão para coloração, pH 7,2 por 10 minutos. Os fagócitos eram analisados ao microscópio óptico com objetiva de imersão, sendo contados 200 neutrófilos por área da preparação, para determinação do índice fagocitário. As lâminas foram identificadas apenas ao final das leituras.

O índice fagocitário foi determinado pela multiplicação da média de *Saccharomyces cerevisiae* ingeridas por neutrófilo pela proporção de neutrófilo envolvidos na fagocitose (Muniz-Junqueira, 2003).

Índice fagocitário = média de leveduras ingeridas por neutrófilo x proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose.

Preparação da suspensão de estoque de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) para utilização no teste de fagocitose.

Para preparação da suspensão estoque de leveduras foi utilizado a técnica de Lachman e Hobart (1978). Com a preparação das leveduras por esta técnica ocorre uma modificação na superfície do fungo *Saccharomyces*

cerevisiae que facilita a adsorção do componente C₃ do complemento. Brandi (1993) demonstrou que anticorpos presentes no soro podem também adsorver-se às leveduras quando tratadas utilizando-se essa técnica.

Um tablete de 50 g de fermento fresco para pão (Fleishmann) foi dissolvido em 220 ml de STF, pH 7,2, e autoclavado a 121° C em uma atmosfera, por 30 minutos, e em seguida a suspensão foi lavada com STF, pH 7,2, várias vezes por centrifugação até obter-se o sobrenadante límpido. O sedimento foi suspenso em 28 ml de STF, pH 7,2, contendo 0,1M de 2-mercaptoetanol e em seguida incubado a 37°C por 2h em agitação. A suspensão foi lavada três vezes para retirar o 2-mercaptoetanol e suspensa em 55ml de solução de iodocetamida 0,002M em STF, pH 7,2. Foi feita outra incubação à temperatura ambiente por 2h com agitação, e em seguida a suspensão foi lavada três vezes por centrifugação em STF, suspensa em 220 ml de STF e o pH acertado para 7,2. A suspensão era autoclavada novamente por 30 min a 121°C, em seguida lavada por centrifugação até obter um sobrenadante límpido e suspensa em 110ml de tampão veronal, pH 7,2, contendo 200mg/L de azida sódica, como preservativo. A suspensão estoque preparada foi mantida a 4°C, e pode ser utilizada por anos.

Preparação das leveduras para uso no teste de fagocitose.

Para cada experimento, uma alíquota de 50 µL era retirada da solução estoque, o volume completado para 1ml de PBS, e a suspensão lavada três vezes em microcentrífuga. Após a última centrifugação, as leveduras eram ressuspensas em 1ml de PBS, retirados 20 µL e colocado em 980 µL de PBS

(diluição de 1:50) e contados em câmara de Neubauer. O número de leveduras presentes na suspensão de 1ml de PBS era calculado pela seguinte:

$N = \text{soma do número de leveduras contadas nos 4 quadrados externos e no central de contagem de hemácias da câmara de Neubauer} \times 5 \times \text{volume (em ml)} \times \text{diluição} \times 10 \times 1000.$

As suspensões foram preparadas contendo 250 mil leveduras em 20 µL suspensas em Hanks-triz com soro fetal bovino a 20% ou soro humano fresco do próprio doador dos neutrófilos contendo anfotericina-B, ou vancomicina, ambas ou sem drogas (meio de cultura) e incubadas por 30 minutos em banho Maria a 37°C.

Teste do *nitroblue tetrazolium* (NBT)

Por meio deste teste detectamos de maneira indireta a produção do ânion superóxido (Nydegger, 1973). O processo de redução converte o NBT de um composto amarelo e solúvel, em um material insolúvel de coloração azul, visível no citoplasma do fagócito. A proporção de células que reduzem o NBT tem relação direta com a produção de radicais de oxigênio (Campbell e Douglas, 1997).

Do sangue venoso não heparinizado eram coletados 40 µL que eram distribuídos por cada área de 7mm de diâmetro delimitada com epóxi em lâminas de microscopia, com 8 áreas cada lâmina, sendo incubadas em câmara úmida a 37°C por 45 min. Após este tempo as células não aderentes (hemácias e linfócitos eram retiradas pela lavagem das lâminas com PBS a 37°C, em ambiente umidificado e incubadas por 30 minutos com vancomicina,

anfotericina B, ambas ou o controle, sem as drogas, em câmara úmida a 37°C e com 20 µL de NBT a 0,05% (Gibco). O mesmo processo também era realizado promovendo um estímulo para a produção de radicais de oxigênio pelo acréscimo de leveduras sensibilizadas (5 leveduras/ fagócito/ escavação). Após a incubação, as preparações eram lavadas com STF e a última lavagem era realizada com Hanks-triz com 30% de soro para melhor preservação das preparações, e secas com vento quente. Em seguida, eram fixadas com metanol e contra coradas com safranina a 0,05% (Reagen) por 5 min e examinadas ao microscópio óptico, contando em 200 células a porcentagem de redução do NBT (Muniz-Junqueira e cols, 2003), como também o percentual de células que reduziram fracamente, de modo intermediário ou fortemente o corante.

Influência da anfotericina-B, vancomicina ou ambas sobre a produção *in vitro* do fator de necrose tumoral- α pelos monócitos do sangue periférico.

As células mononucleares do sangue periférico de outros 8 indivíduos normais foram separadas em Percoll (densidade 1,077), ressuspensas em RPMI 1640, pH 7,2, sem soro fetal bovino, e 5×10^5 macrófagos, em um volume final de 500 µl, eram distribuídos por escavação, em placa de 24 escavações, em duplicata. Após incubação por 2 horas em câmara úmida a 37°C, em 5% de CO₂ em ar, as escavações eram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7.2, a 37°C para retirar as células não aderentes, e as células eram ressuspensas em 500 µl de RPMI 1640, pH 7,2 com 10% de soro fetal bovino, contendo ou não 10

$\mu\text{g/ml}$ de LPS (Sigma), como estímulo para a produção de fator de necrose tumoral. As placas foram incubadas por 6 horas em câmara úmida a 37°C , em 5% de CO_2 em ar, os sobrenadantes eram então coletados e as amostras foram individualmente armazenados a -80°C até a determinação do fator de necrose tumoral- α .

A determinação do FNT foi feita por um ensaio imunoenzimático utilizando um kit de ELISA comercializado (BioSouce, Bélgica). O procedimento utilizado foi o recomendado pelo fabricante. Todas as amostras foram testadas no mesmo ensaio após descongelamento das amostras até a temperatura ambiente. Uma curva padrão utilizando fator de necrose tumoral humano foi feita simultaneamente. Em placa sensibilizada com anti-FNT- α humano de captura foram adicionados um tampão para estabilizar a reação e as amostras a serem analisadas. Após um período de incubação de 2 horas a temperatura ambiente para a ocorrência da reação antígeno-anticorpo, a placa foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem e adicionou-se então um segundo anticorpo anti-FNT- α conjugado com biotina. Novamente a placa foi incubada por uma hora, a temperatura ambiente para formar o complexo anticorpo-antígeno-anticorpo biotinilado ("ac-ag-ac-biotinilado") e lavada por 4 vezes com solução de lavagem para retirada do segundo anticorpo não ligado. Uma solução de estreptavidina-peroxidase foi adicionada às escavações e a placa foi incubada por mais 30 minutos. Após lavagem por 4 vezes com solução de lavagem foi acrescentado o cromógeno estabilizado (tetrametilbenzidina) e incubado por mais 30 minutos no escuro, sendo então adicionada a solução de

interrupção e a leitura feita em espectrofotômetro de placa com filtro de 450 nm (Titertek).

Uma curva padrão utilizando escala semi logarítmica foi feita pelo programa computadorizado do espectrofotômetro e a densidade óptica convertida em pg/ml de FNT- α .

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software SigmaStat[®] (Jandel Scientific, San Rafael /Califórnia , USA, Prism[®] (GraphPad, USA, 1997).

Para a aplicação dos testes estatísticos verificou-se previamente a normalidade ou não das variáveis nas amostras. Para comparação entre duas variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste t pareado e para aquelas que não apresentaram distribuição normal foi utilizado o teste de Wilcoxon. Para análise de mais do que duas variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste de ANOVA seguido do método de Student-Newman-Keuls para comparação entre grupos, e para aquelas com distribuição não normal, o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos.

As diferenças entre as variáveis comparadas foram consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade bi-caudal da sua ocorrência devida ao acaso (erro tipo I) foi menor que 5% ($p < 0,05$).

Os dados foram expressos graficamente como média e desvio padrão para as amostras com distribuição normal e como mediana, quartis e extremos para aquelas com distribuição não normal.

RESULTADOS

Influência do tratamento de fagócitos de indivíduos normais com anfotericina-B, vancomicina, ou ambas sobre a capacidade fagocitária:

Avaliamos a influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com anfotericina-B, vancomicina ou ambas sobre a capacidade fagocitária dos neutrófilos pelo teste de fagocitose realizado em lâmina. Foram utilizados como parâmetros para avaliar a capacidade fagocitária, o índice fagocitário, a proporção dos fagócitos envolvidos na fagocitose e a média de leveduras ingeridas/ aderidas por fagócito.

A fagocitose foi avaliada pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, quando testada na presença de soro fetal bovino inativado e pelos receptores para complemento e anticorpos, quando testada utilizando soro fresco do doador.

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B desoxicolato sobre a fagocitose pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógeno (soro fetal bovino).

A influência da anfotericina-B na dose de 2mg/ L sobre a capacidade fagocitária de neutrófilos do sangue periférico para *Saccharomyces cerevisiae* foi testada utilizando $2,5 \times 10^5$ leveduras por escavação. Pelo teste da fagocitose realizado na presença de soro fetal bovino, avaliamos a capacidade de ingestão das partículas predominantemente pelos receptores para padrões de reconhecimento, entre os quais encontra-se o receptor de limpeza pelo qual ocorre principalmente a ingestão de *Saccharomyces cerevisiae*.

A anfotericina-B, diminuiu significativamente a média do índice fagocitário dos neutrófilos de 30 ± 17 para 18 ± 13 , $p = 0,042$ pelo teste t pareado. A diminuição da capacidade fagocitária dos neutrófilos pelo tratamento com a anfotericina, deveu-se principalmente ao menor envolvimento dos neutrófilos na fagocitose, pois observamos uma diminuição da proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose de 14 ± 8 para 6 ± 4 , $p = 0,0002$, pelo teste t pareado; enquanto não houve alteração da média de leveduras fagocitadas, sendo a média de $1,7 \pm 0,7$ para o grupo controle e de $1,6 \pm 0,8$, para o grupo com anfotericina-B; $p = 0,319$, pelo teste t pareado (**Figura 2**).

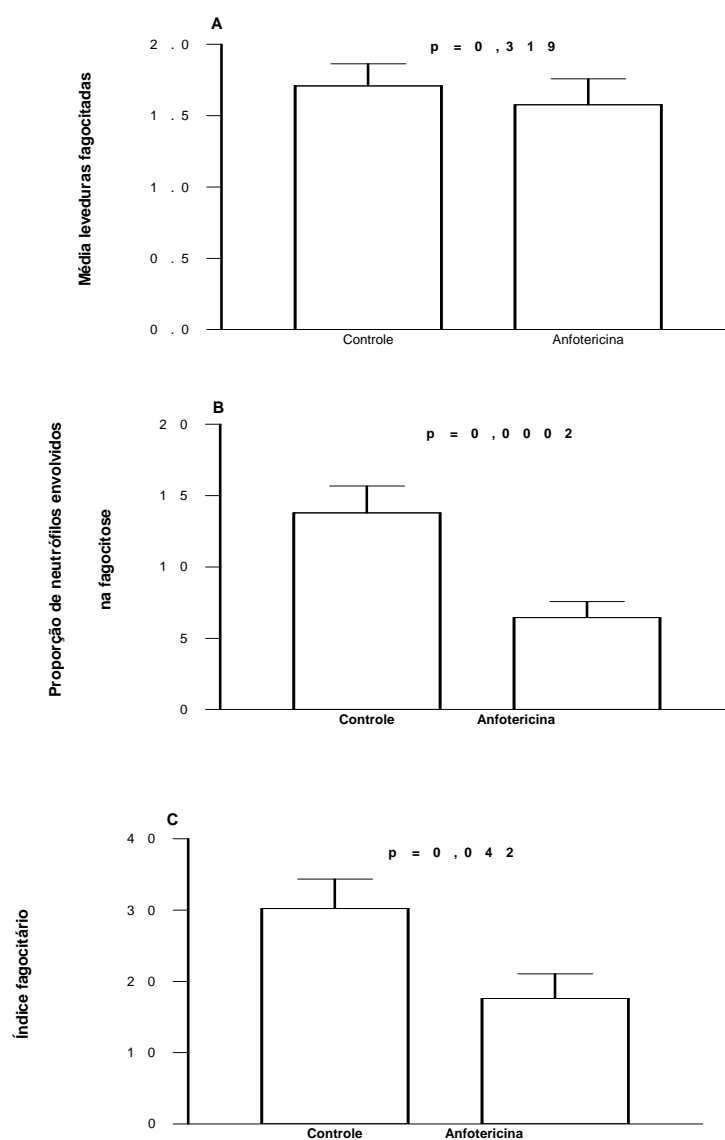


Figura 2. Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos com anfotericina-B desoxicolato sobre a capacidade fagocitária, utilizando $2,5 \times 10^5$ *Saccharomyces cerevisiae* por escavação, na presença de soro fetal bovino. A- Média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilo; B- Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose; C- Índice fagocitário. Em A: Não houve alteração na média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilos no grupo tratado com anfotericina-B ($p= 0,319$, teste t pareado). Em B: Diminuição significativa da proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose no grupo tratado com anfotericina-B ($p= 0,0002$, teste t pareado) em relação ao controle. Em C: Diminuição significativa do índice fagocitário no grupo tratado com anfotericina-B ($p=0,042$, teste t pareado).

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com vancomicina sobre a fagocitose pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógeno (soro fetal bovino).

Após o tratamento dos neutrófilos com 50 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ de vancomicina observamos diminuição biológica da média do índice fagocitário de 27 ± 18 para 18 ± 16 , embora sem significância estatística, $p = 0,155$, pelo teste t pareado. A diminuição da capacidade fagocitária dos neutrófilos pelo tratamento com a vancomicina, deveu-se principalmente a diminuição na proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose, sendo que a média diminuiu de $14 \pm 8 \%$ para $9 \pm 6 \%$ após o tratamento com a vancomicina, $p = 0,119$ pelo teste t pareado; já que a média de leveduras envolvidas na fagocitose não foi diferente sem e com o tratamento com a droga ($1,8 \pm 0,5$ para o grupo controle *versus* $1,8 \pm 0,6$ para os neutrófilos tratados com a vancomicina), $p = 0,736$, pelo teste t pareado **(Figura 3)**.

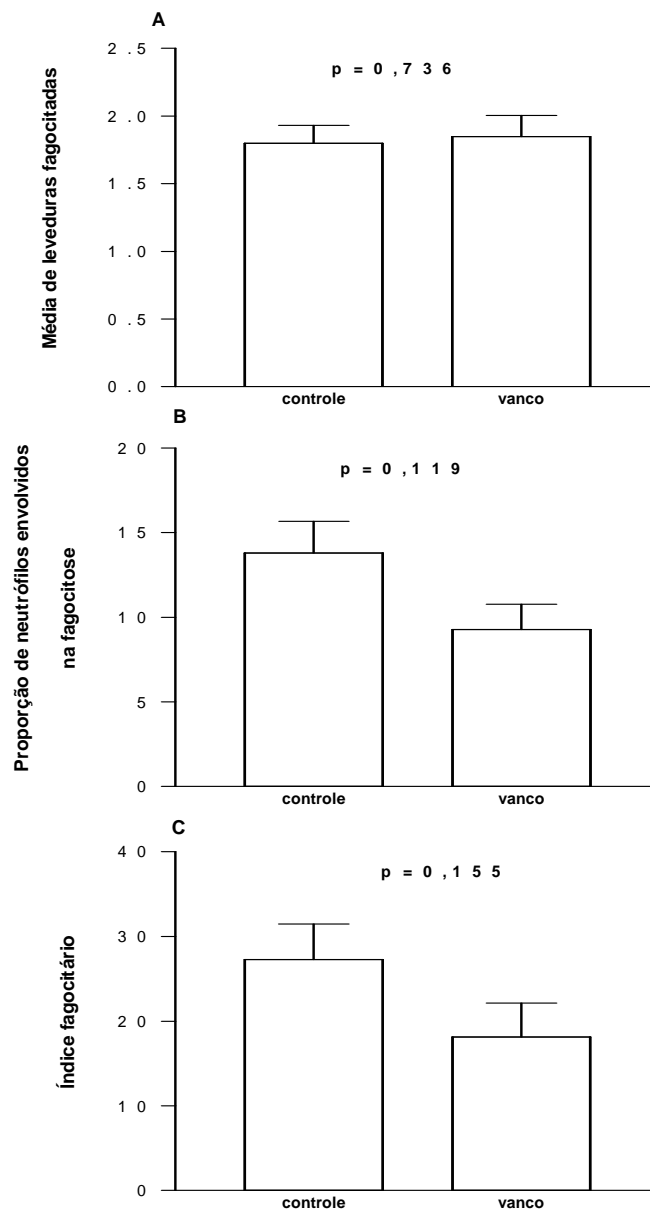


Figura 3. Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos com vancomicina sobre a capacidade fagocitária, para leveduras não sensibilizadas. A- Média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilo; B- Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose; C- Índice fagocitário. Em A: Não houve alteração na média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilos do grupo tratado com vancomicina ($p= 0,736$, teste t pareado) em relação ao controle. Em B: Diminuição, embora não significativa estatisticamente, da proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose no grupo tratado com vancomicina ($p= 0,119$, teste t pareado) em relação ao controle. Em C: Diminuição, embora não significativa estatisticamente, do índice fagocitário no grupo tratado com vancomicina ($p=0,155$, teste t pareado).

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com associação anfotericina-B desoxicolato e vancomicina sobre a fagocitose pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógeno (soro fetal bovino)

Quando avaliamos a influência do o tratamento com a anfotericina-B desoxicolato e vancomicina associadas, observamos diminuição da média do índice fagocitário de neutrófilos de 27 ± 18 para 18 ± 13 , $p = 0,051$ pelo teste t pareado. A diminuição da capacidade fagocitária dos neutrófilos pelo tratamento com ambas as drogas deveu-se principalmente a diminuição na proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose, sendo a média de $14 \pm 8\%$ para o controle para $8 \pm 6 \%$ para a associação de ambas $p = 0,038$ pelo teste t pareado; pois não houve diferença na média de leveduras envolvidas na fagocitose, $p = 0,416$, pelo teste t pareado **(Figura 4)**.

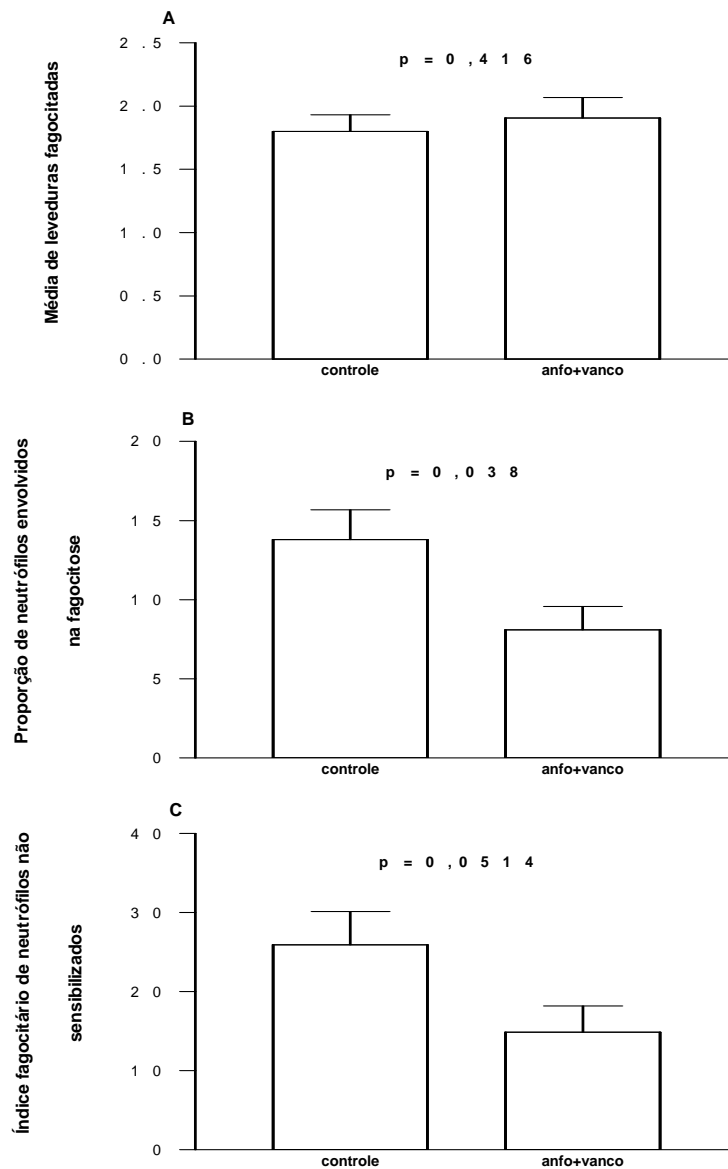


Figura 4. Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos com anfotericina-B e vancomicina associadas sobre a capacidade fagocitária, para leveduras não sensibilizadas. A- Média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilo; B- Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose; C- Índice fagocitário. Em A: Não houve diferença na média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilos do grupo tratado ($p= 0,416$, teste t pareado) em relação ao controle. Em B: Diminuição da proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose no grupo tratado ($p=0,038$, teste t pareado. Em C: Diminuição do índice fagocitário no grupo tratado ($p=0,0514$, teste t pareado).

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B desoxicolato sobre a capacidade fagocitária pelos receptores para componentes sistema do complemento (soro humano fresco).

Plasma fresco normal contém frações do complemento, e após sua incubação com as leveduras a 37°C, ocorre adsorção das proteínas do complemento à superfície das leveduras, particularmente o componente C₃ do complemento. Como neutrófilos e monócitos possuem receptores para a fração C₃ do complemento, esta proteína funciona com opsonina, ligando-se à levedura por um lado e ao neutrófilo por outro, facilitando assim a fagocitose.

Com o objetivo de testar a fagocitose na presença das frações do sistema complemento, foi realizado o teste de fagocitose acima descrito substituindo o soro fetal bovino inativado por plasma fresco do próprio indivíduo para sensibilização das leveduras, sendo que todo o procedimento da fagocitose foi semelhante ao já descrito. As leveduras utilizadas nos experimentos de fagocitose facilitada pelo complemento foram sensibilizadas, ou seja, as frações do complemento foram adsorvidas à superfície da levedura, pela incubação a 37°C, por 30 min., em banho-Maria, na presença do soro fresco a 10% do mesmo indivíduo que os neutrófilos estavam sendo testados.

A influência da anfotericina na dose de 2mg/ L sobre a capacidade fagocitária de neutrófilos para *Saccharomyces cerevisiae* foi avaliada pela

determinação do índice fagocitário, proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose e o número médio de leveduras ingeridas/aderidas por fagócito. A fagocitose foi testada utilizando $2,5 \times 10^5$ leveduras por escavação.

Quando foi avaliada a influência da anfotericina-B sobre a fagocitose, observamos diminuição significativa da média do índice fagocitário de neutrófilos de 300 ± 111 para 256 ± 85 , $p = 0,019$ pelo teste t pareado. Esta diminuição da capacidade fagocitária dos neutrófilos deveu-se a diminuição da média de leveduras fagocitadas no grupo tratado com anfotericina, que foi de $3,3 \pm 0,92$ para o grupo controle e de $2,9 \pm 0,8$ para o grupo tratado com anfotericina B, $p = 0,024$, pelo teste t pareado. Não houve diferença na proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose $87 \pm 13 \%$ para o grupo controle e $88 \pm 11 \%$ para o grupo tratado com a anfotericina, $p = 0,686$ pelo teste t pareado (**figura 5**).

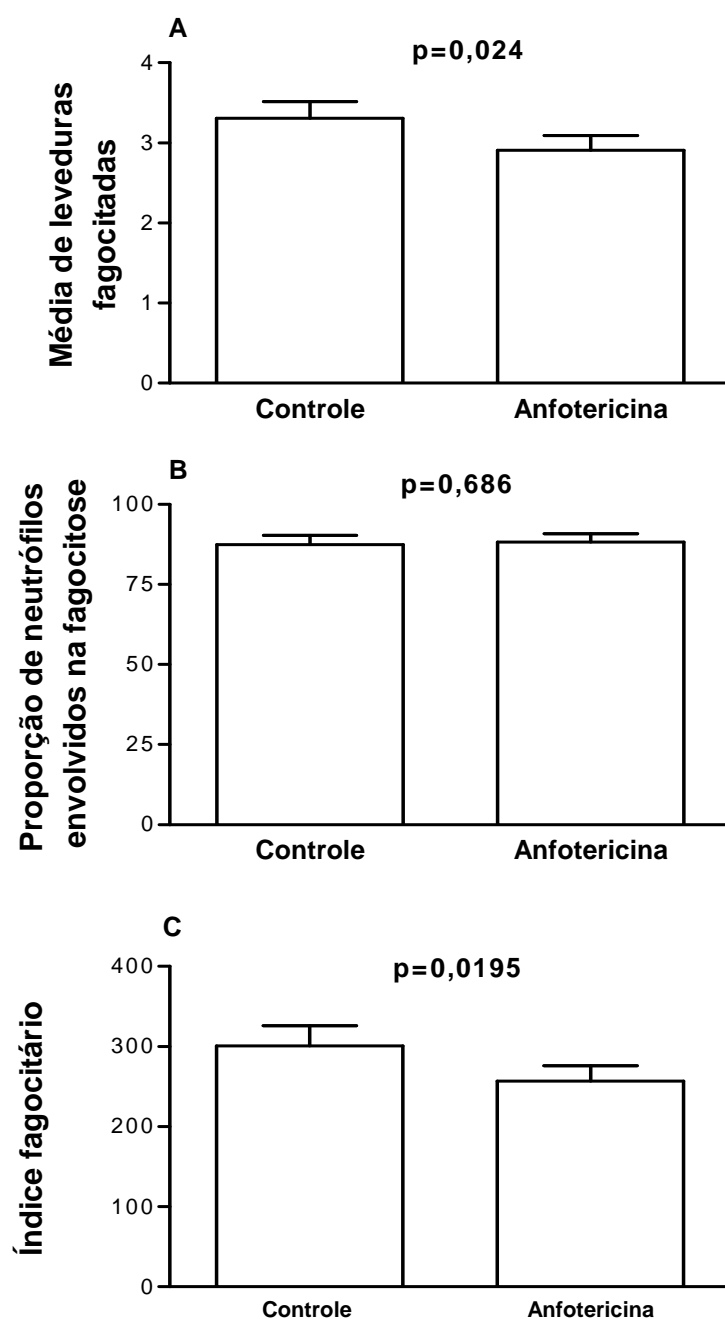


Figura 5. Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos com anfotericina-B desoxicolato sobre a capacidade fagocitária, utilizando $2,5 \times 10^5$ *Saccharomyces cerevisiae* por escavação, na presença de soro humano. A- Média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilo; B- Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose; C- Índice fagocitário. Em A: Diminuição na média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilos do grupo tratado com anfotericina-b ($p = 0,024$, teste t pareado) em relação ao controle. Em B: Não houve diferença entre os grupos ($p = 0,686$, teste t pareado). Em C: Diminuição do índice fagocitário no grupo tratado com anfotericina-b ($p=0,0195$, teste t pareado).

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com vancomicina sobre a capacidade fagocitária pelos receptores para componentes do sistema do complemento (soro humano fresco)

Quando avaliada a influência do tratamento com a vancomicina na dose de 50 µg / µL sobre a fagocitose, observamos diminuição da média do índice fagocitário dos neutrófilos de 324 ± 90 para 251 ± 81 , $p = 0,044$ pelo teste t pareado. A diminuição da capacidade fagocitária dos neutrófilos pelo tratamento com a vancomicina, deveu-se principalmente à diminuição na média de leveduras envolvidas na fagocitose, de $3,5 \pm 0,7$ (controle) para $2,9 \pm 0,8$ (grupo tratado), $p = 0,095$, teste t pareado, pois não houve diferença na proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose, 87 ± 13 (controle) *versus* 86 ± 15 (vancomicina), $p = 0,7271$ pelo teste t pareado, (**figura 6**).

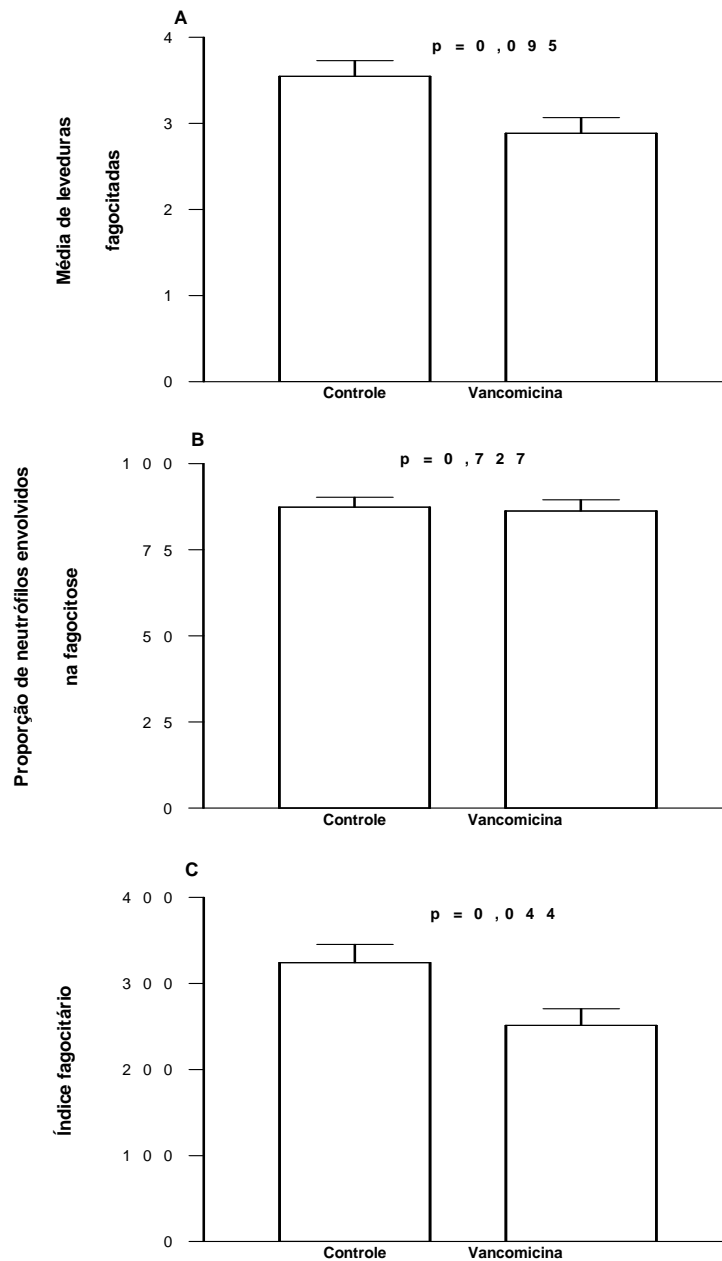


Figura 6. Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos com vancomicina sobre a capacidade fagocitária, para leveduras sensibilizadas. A- Média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilo; B- Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose; C- Índice fagocitário. Em A: Embora sem significância estatística houve diminuição na média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilos do grupo tratado com vancomicina ($p= 0,095$, teste t pareado) em relação ao controle. Em B: Não houve diminuição significativa da proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose no grupo tratado com vancomicina ($p= 0,7271$, teste t pareado) em relação ao controle. Em C: Diminuição do índice fagocitário no grupo tratado com vancomicina ($p=0,044$, teste t pareado).

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com a associação anfotericina-B e vancomicina sobre a capacidade fagocitária pelos receptores para componentes do sistema do complemento (soro humano fresco)

Quando o tratamento com a anfotericina-B e vancomicina nas doses previamente citadas foi avaliado observamos que a média do índice fagocitário de neutrófilos foi de 324 ± 90 para o grupo controle e 279 ± 96 para o tratado com as duas drogas, $p = 0,146$ pelo teste t pareado. A média de leveduras fagocitadas foi de $3,5 \pm 0,7$ para o grupo controle e de $3,0 \pm 0,8$ para o grupo tratado, $p = 0,0673$, teste t pareado. Para a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose as médias foram 87 ± 13 (controle) e 89 ± 10 (tratado), $p = 0,143$ pelo teste t pareado **(figura 7)**.

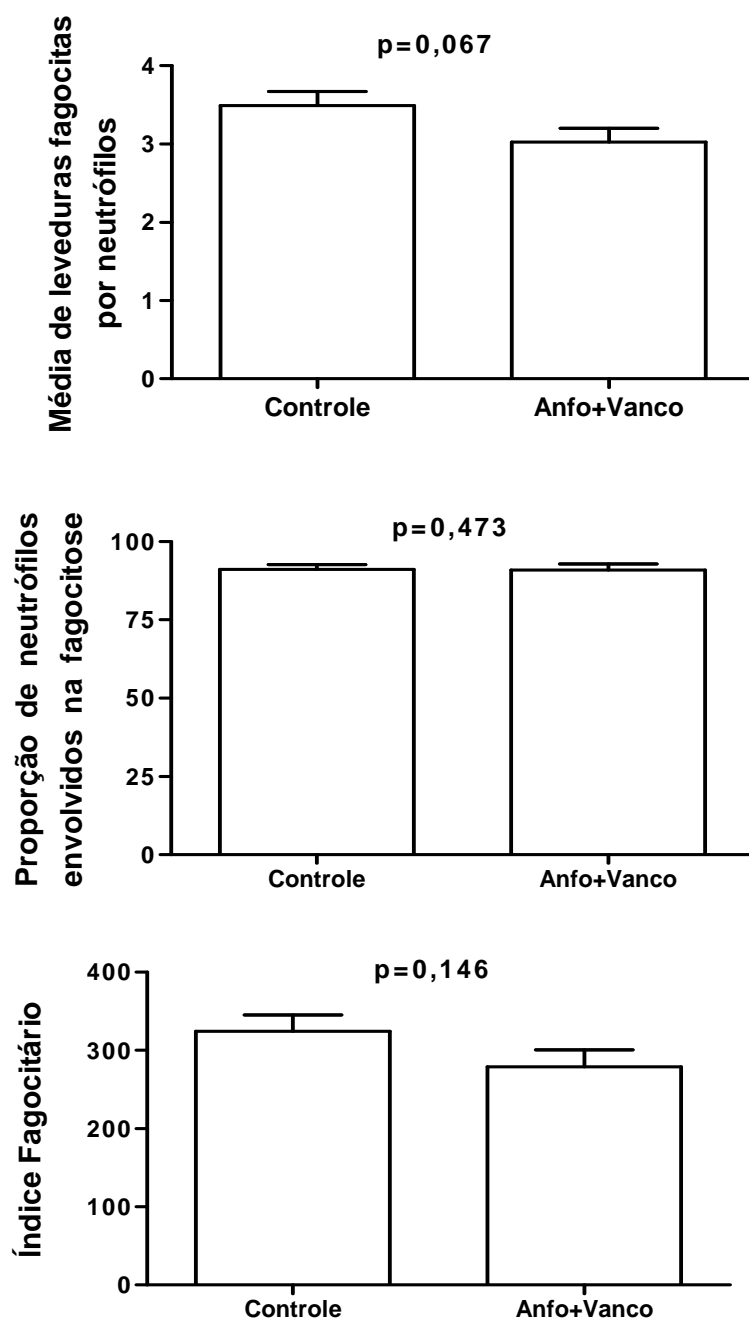


Figura 7: Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos com anfotericina-B e vancomicina sobre a capacidade fagocitária, para leveduras sensibilizadas. A- Média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilo; B- Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose; C- Índice fagocitário. Em A: Embora sem significância estatística houve diminuição na média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilos do grupo tratado com anfotericina-B e vancomicina ($p= 0,067$, teste t pareado) em relação ao controle. Em B: Não houve diferença entre os grupos ($p= 0,473$, teste t pareado) . Em C: Diminuição do índice fagocitário no grupo tratado ($p=0,146$, teste t pareado) .

Análise comparativa da influência da anfotericina-B, vancomicina e a associação de ambas sobre a capacidade fagocitária dos neutrófilos.

Quando comparamos o índice fagocitário utilizando leveduras não sensibilizadas ou sensibilizadas entre os grupos controle (sem droga), anfotericina-B, vancomicina ou ambas, observamos que tanto para as leveduras não sensibilizadas, ($p=0,8587$, ANOVA) quanto sensibilizadas, ($p=0,7477$, ANOVA), não houve diferença na média no índice fagocitário entre os grupos estudados. **(Figura 8)**.

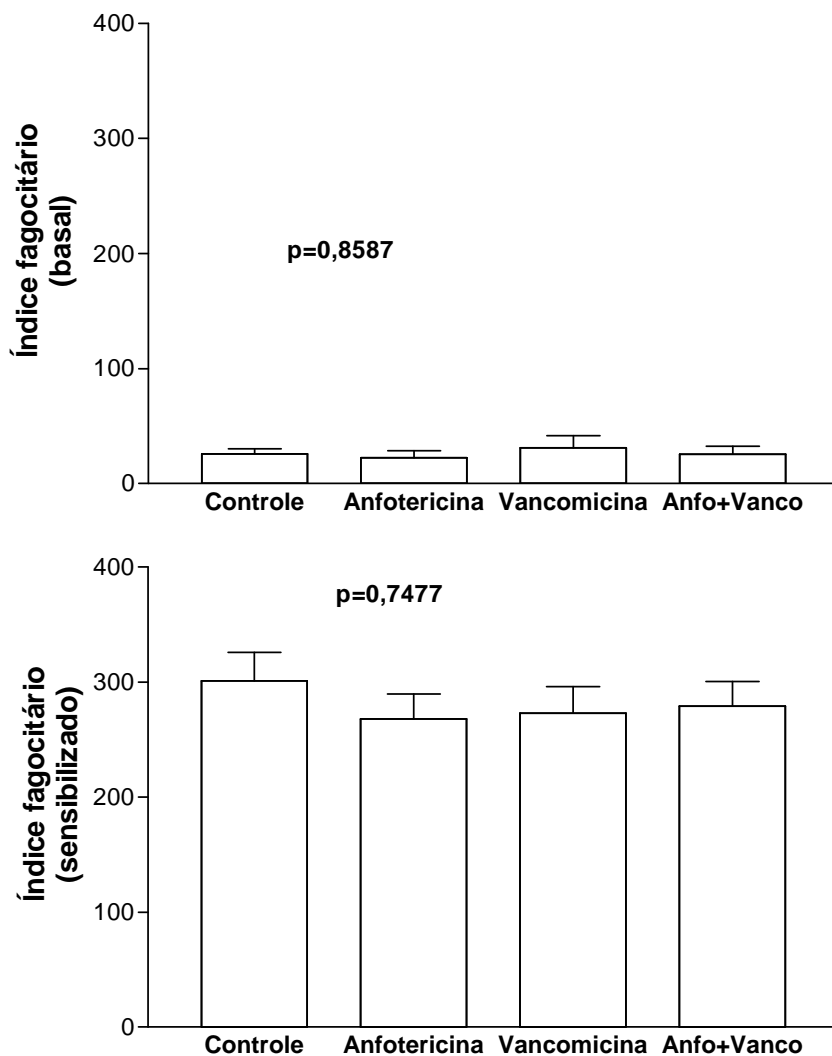


Figura 8: Comparação entre o índice fagocitário em testes não sensibilizado e sensibilizado com os grupos controle (sem droga), anfotericina-B, vancomicina e ambas. No gráfico A, o estudo com leveduras não sensibilizadas ($p=0,8587$), não houve diferença estatística entre os índices fagocitários dos grupos estudados. Em B o experimento feito com leveduras sensibilizadas ($p=0,7477$) também não houve diferença estatística entre os grupos estudados.

Análise comparativa da influência da anfotericina-B, vancomicina e a associação de ambas sobre a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose basal e estimulado.

Quando realizamos a comparação entre a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose em testes não sensibilizado e sensibilizado com os grupos controle (sem droga), anfotericina-B, vancomicina e ambas, observamos que tanto no estudo com leveduras não sensibilizadas ($p=0,944$), quanto no experimento feito com leveduras sensibilizadas ($p=0,8878$) não houve diferença entre os grupos estudados. Foi utilizado o teste de ANOVA, para comparação entre grupos **(figura 9)**.

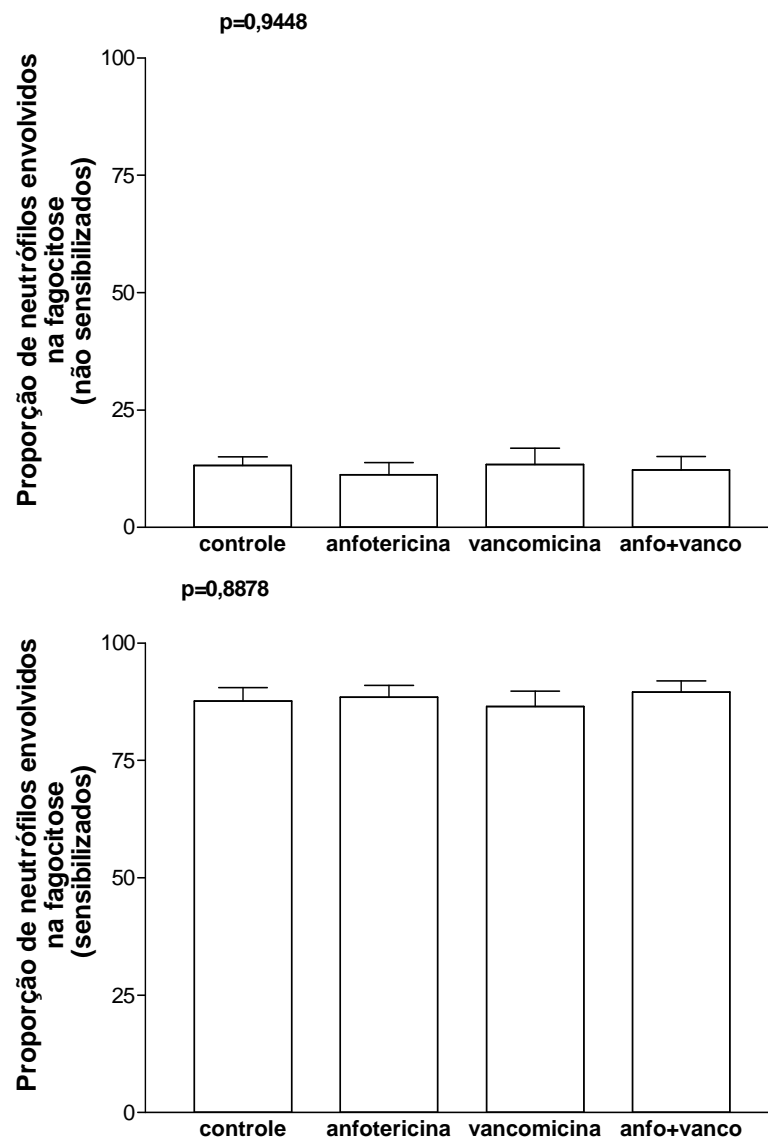


Figura 9: Comparação entre a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose em testes não sensibilizado e sensibilizado para os grupos controle (sem droga), anfotericina-B, vancomicina e ambas. Em A: leveduras não sensibilizadas ($p=0,944$). Em B: leveduras sensibilizadas ($p=0,8878$).

Análise comparativa da influência da anfotericina-B, vancomicina e a associação de ambas sobre a média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilos envolvidos na fagocitose.

Quando feita a comparação entre a média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilos envolvidos na fagocitose em testes não sensibilizado e sensibilizado com os grupos controle (sem droga), anfotericina-B, vancomicina e ambas, observamos que no estudo com leveduras não sensibilizadas ($p=0,5481$) e com leveduras sensibilizadas ($p=0,5867$) não houve diferença entre os grupos estudados. Foi utilizado o teste de ANOVA para comparação entre grupos **(Figura 10)**.

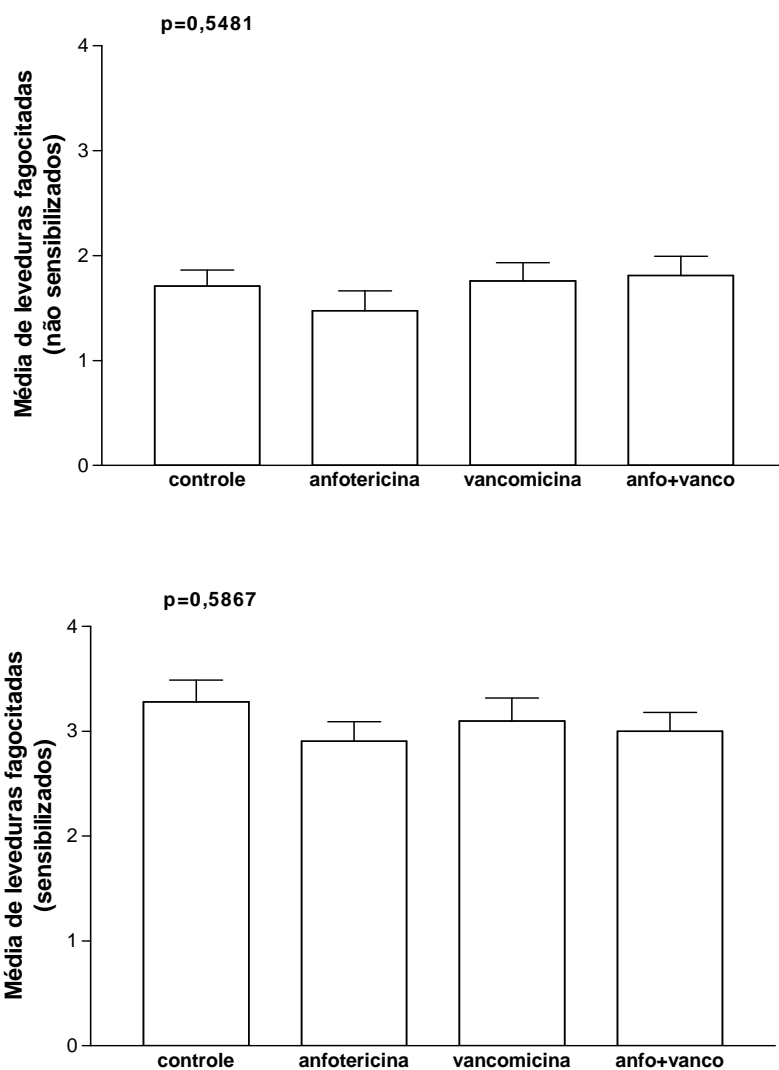


Figura 10: Comparação entre a média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilos em testes não sensibilizado e sensibilizado com os grupos controle (sem droga), anfotericina-B, vancomicina e ambas. Em A: leveduras não sensibilizadas ($p=0,5481$). Em B: leveduras sensibilizadas ($p=0,5867$).

Avaliação da influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais, com anfotericina-B, vancomicina, ou com ambas sobre a produção de radicais de oxigênio pelo teste do *nitro blue tetrazolium* basal ou estimulado.

Com objetivo de verificar a influência da anfotericina-B, vancomicina, e ambas sobre a capacidade microbicida dos fagócitos foi avaliada a produção de radicais de oxigênio pelo teste do NBT antes e após o tratamento *in vitro* com 40 µg/ml de vancomicina ou 2 mg/L de anfotericina B ou a associação de ambas.

Por este teste não foi possível evidenciar influência das drogas avaliadas sobre a capacidade de redução do corante pelos fagócitos, nem quando testada em uma situação basal, nem após estímulo. Apenas a anfotericina-B diminuiu a proporção de fagócitos que reduzem o NBT estimulado ($p=0,0059$, teste de Wilcoxon). **(Figuras 11 e 12).**

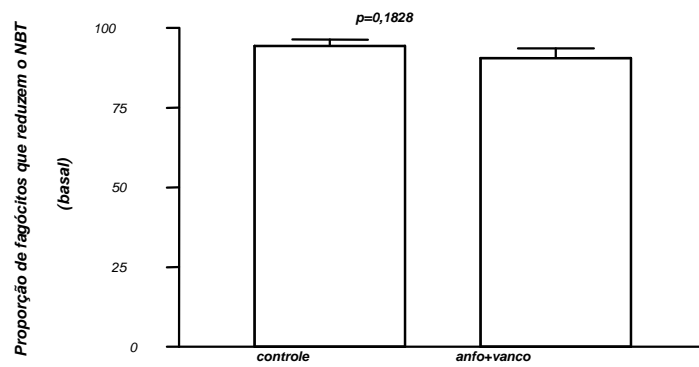
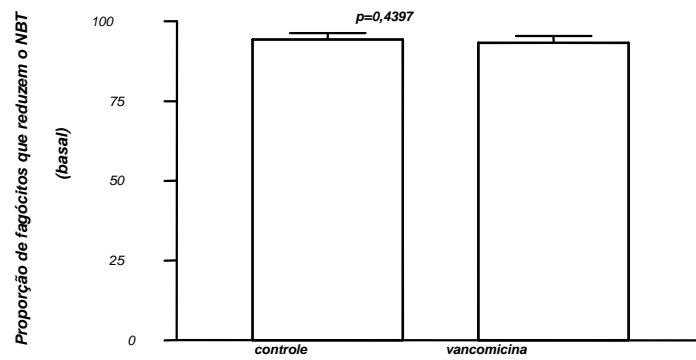
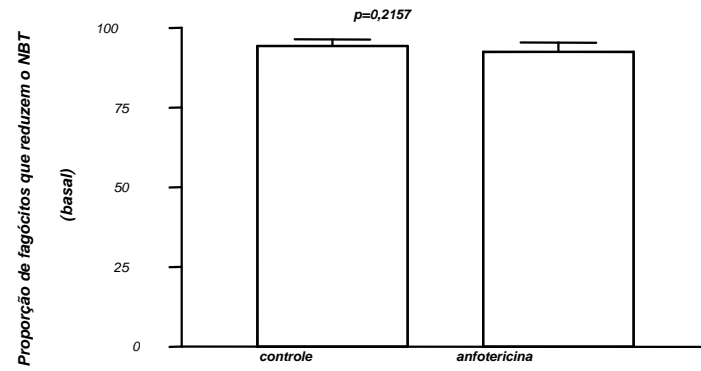


Figura 11: Influência do tratamento com anfotericina-B, vancomicina e da associação de ambas sobre a porcentagem de redução do NBT basal pelos fagócitos. Não houve diferença entre os grupos ($p>0,05$).

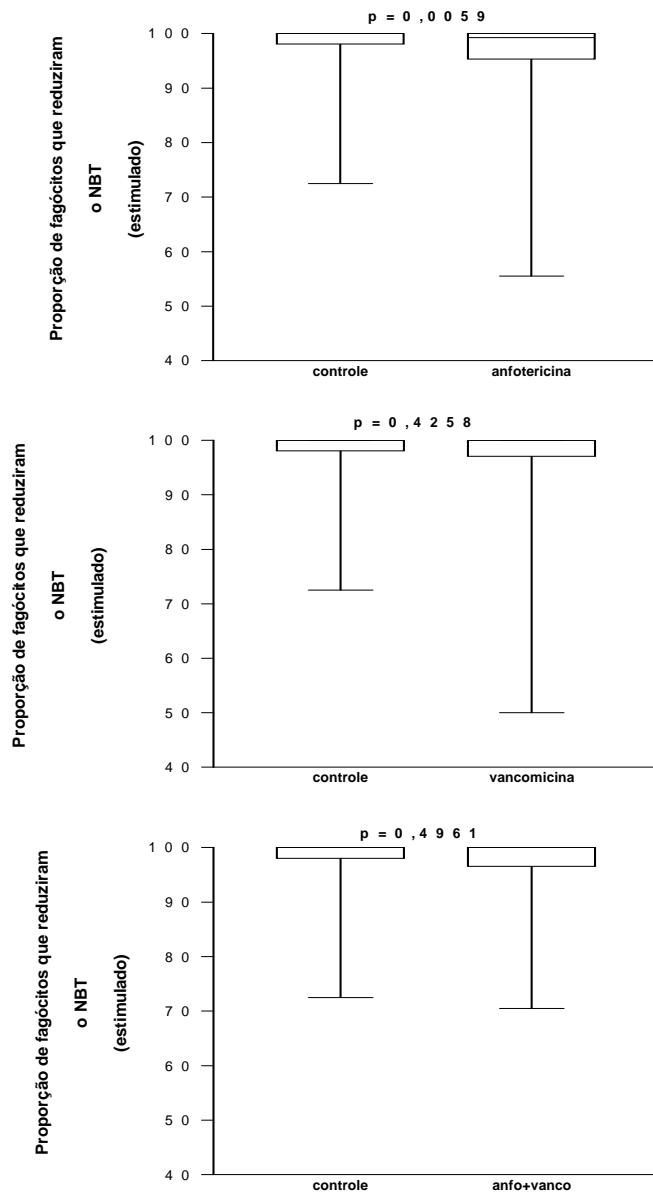


Figura 12: Porcentagem redução do NBT por fagócitos estimulado com leveduras, para os grupos controle (sem droga), anfotericina-B, vancomicina ou ambas. Em A: Anfotericina-B. Houve redução da proporção de fagócitos que reduzem o NBT pela anfotericina-B em relação ao controle ($p=0,0059$, teste de Wilcoxon). Em B: não houve diferença entre os grupos ($p=0,4258$). Em C: Associação das duas drogas. Não houve diferença ($p=0,4961$).

Avaliação da influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com anfotericina-B, vancomicina, ou com ambas sobre a produção de radicais de oxigênio pelo teste do *nitro blue tetrazolium* basal e estimulado.

Pela análise comparativa não houve diferença estatística entre os 4 grupos quanto a proporção de fagócitos que reduzem o NBT (basal), ($p=0,7533$, ANOVA). No gráfico do NBT estimulado ($p=0,8547$, teste de Kruskal-Wallis) o mesmo foi observado **(figura13)**.

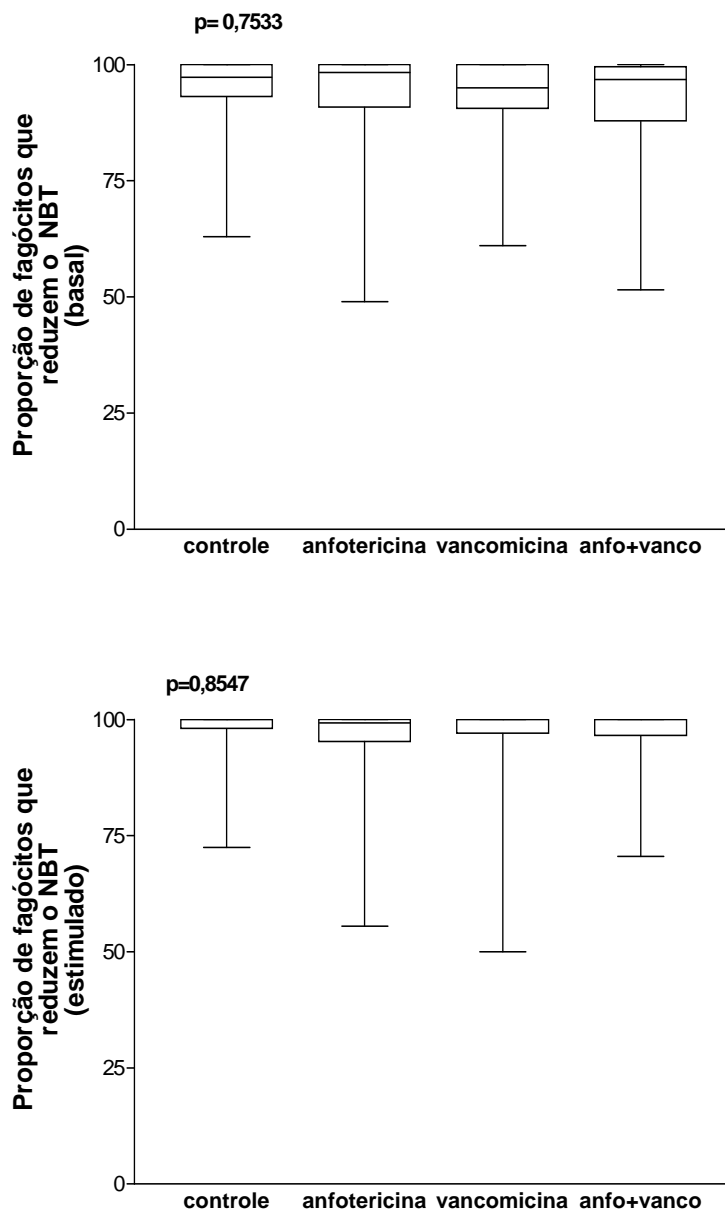


Figura 13: Porcentagem de redução do NBT por fagócitos, estimulados por leveduras ou não, pelos grupos controle (sem droga), anfotericina-B, vancomicina ou ambas. Em A: Basal. Em B: estimulado. Não houve diferença entre os grupos estudados ($p > 0,05$).

Avaliação da influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais, com anfotericina-B, vancomicina, ou com ambas sobre a redução forte do *nitro blue tetrazolium* basal.

Ao avaliarmos a influência dos antimicrobianos isolados ou associados, quanto a redução forte do NBT basal, ou seja, produção intensa de ânions superóxido, observamos que não houve diferença entre os grupos estudados (figura 14).

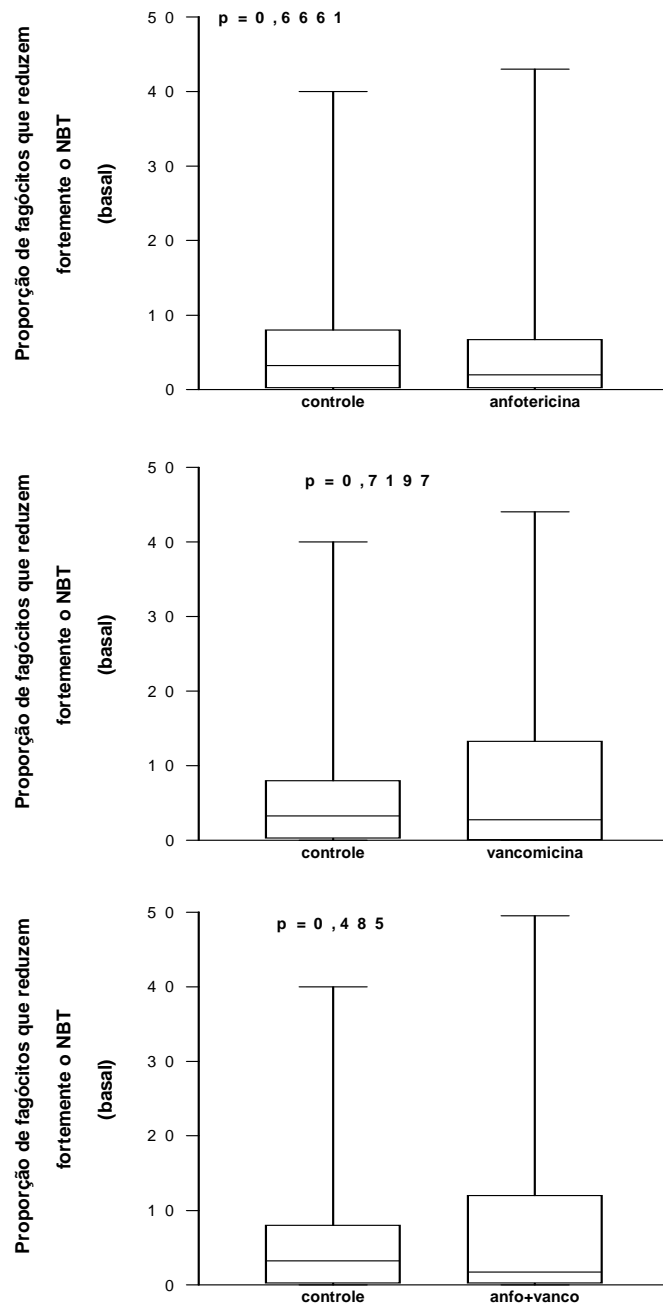


Figura 14: Porcentagem de fagócitos que reduzem fortemente o NBT basal, dos grupos controle (sem droga), anfotericina-B, vancomicina ou ambas. Em todos foram utilizados o teste de Wilcoxon e não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Avaliação da influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com anfotericina-B, vancomicina, ou com ambas sobre a redução intermediária do *nitro blue tetrazolium* basal.

Ao avaliarmos a influência dos antimicrobianos isolados ou associados, quanto a redução intermediária do NBT basal, ou seja, produção de intermediária intensidade de ânions superóxido, percebemos que não houve diferença estatística entre os grupos estudados **(figura 15)**.

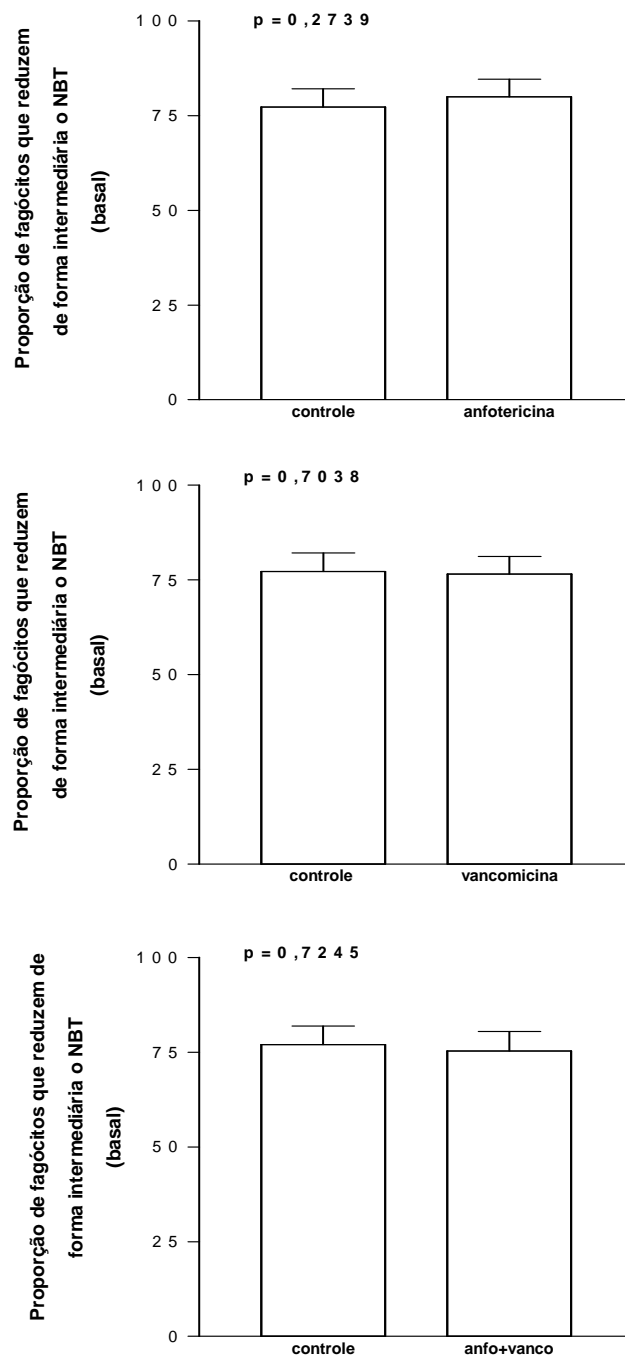


Figura 15: Porcentagem de fagócitos que reduzem de modo intermediário o NBT basal, dos grupos controle (sem droga), anfotericina-B, vancomicina ou ambas. Em todos três gráficos foi utilizado o teste t pareado, e em nenhum houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Avaliação da influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com anfotericina-B, vancomicina, ou com ambas sobre a redução fraca do *nitro blue tetrazolium* basal.

Em estudo comparativo sobre a redução fraca do NBT basal entre a anfotericina- B, vancomicina ou ambas em relação ao controle, observamos que a anfotericina-B causou menor proporção de fagócitos que reduzem fracamente o NBT ($p = 0,0542$, test t pareado), a vancomicina não influenciou ($p = 0,3284$, test t pareado) e a associação evidenciou expressiva diminuição na redução fraca do NBT basal ($p = 0,0137$, teste de Wilcoxon) **(figura 16)**.

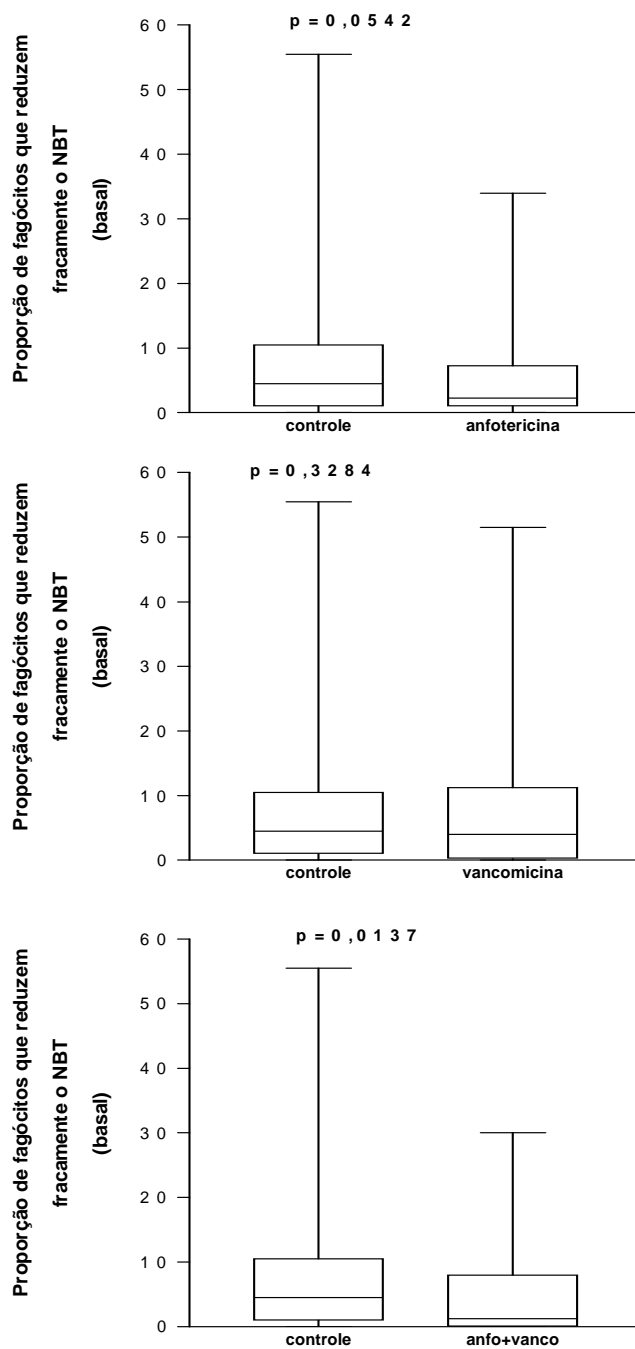


Figura 16: Porcentagem de fagócitos que reduzem de modo fraco o NBT basal, dos grupos controle (sem droga), anfotericina-B, vancomicina ou ambas Em A: Anfotericina-B. Houve diminuição da proporção de fagócitos reduzem fracamente o NBT pela anfotericina-B ($p = 0,0542$, teste t pareado). Em B: Vancomicina ($p = 0,3284$, teste t pareado). Em C: Associação de ambas. Houve diminuição da proporção de fagócitos que reduzem de modo fraco o NBT basal ($p = 0,0137$, teste de Wilcoxon).

Avaliação da influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com anfotericina-B, vancomicina, ou com ambas sobre a redução forte do *nitro blue tetrazolium* estimulado.

Ao procedermos a comparação entre a redução forte do NBT estimulado, por neutrófilos em testes sensibilizados entre os grupos controle (sem droga), anfotericina-B, vancomicina ou ambas, observamos que somente no estudo feito com anfotericina-B houve tendência estatística para diminuição da proporção de fagócitos que reduzem fortemente o NBT estimulado ($p=0,079$). A vancomicina ($p = 0,2470$) e a associação ($p = 0,7434$) não influenciaram esta resposta, teste *t* pareado, **(figura 17)**.

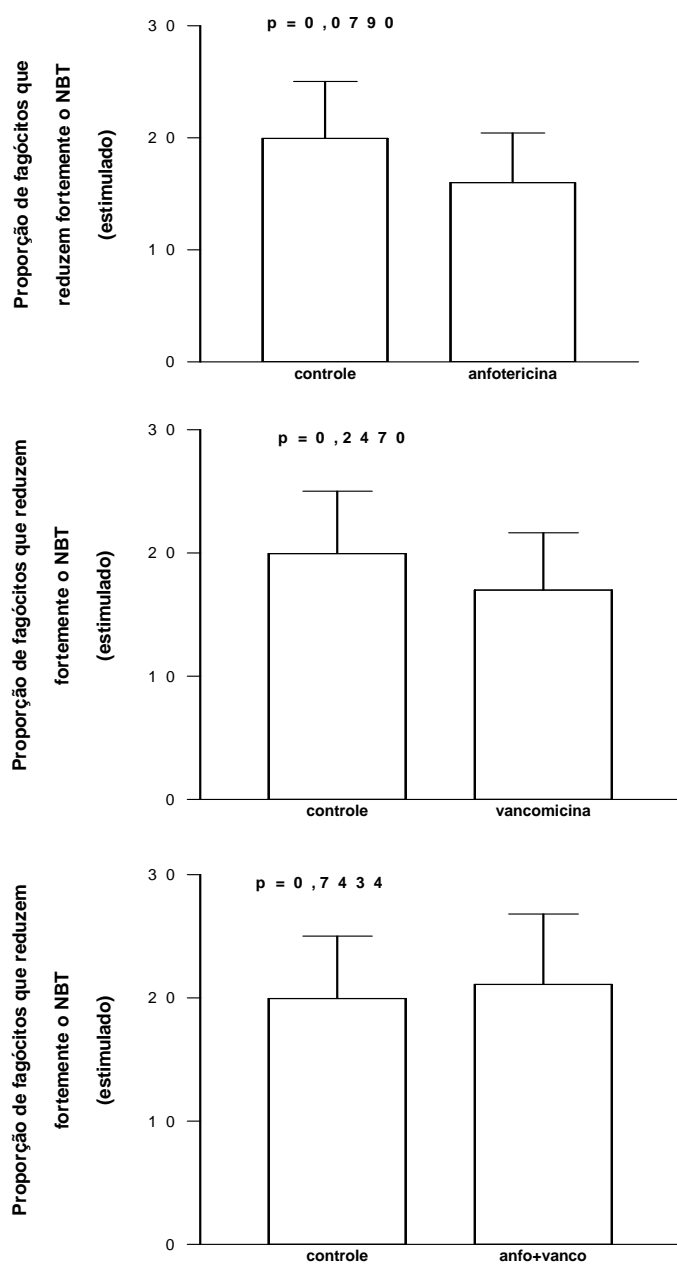


Figura 17: Porcentagem de fagócitos estimulados que reduzem fortemente o NBT dos grupos controle (sem droga), anfotericina-B, vancomicina ou ambas. Em A: Anfotericina-B. Houve diminuição da porcentagem de fagócitos que reduziram fortemente o NBT estimulado pela anfotericina-B ($p=0,079$, teste t pareado). Em B: Vancomicina. ($p= 0,2470$) Em C: Associação de ambas as drogas ($p=0,7434$).

Avaliação da influência do tratamento in vitro de fagócitos de indivíduos normais com anfotericina-B, vancomicina, ou com ambas sobre a redução intermediária do nitro blue tetrazolium estimulado.

Ao avaliarmos a influência dos antimicrobianos isolados ou associados, quanto a redução intermediária do NBT estimulado, ou seja, produção de intermediária intensidade de ânions superóxido, percebemos que não houve diferença estatística entre os grupos estudados **(figura 18)**.

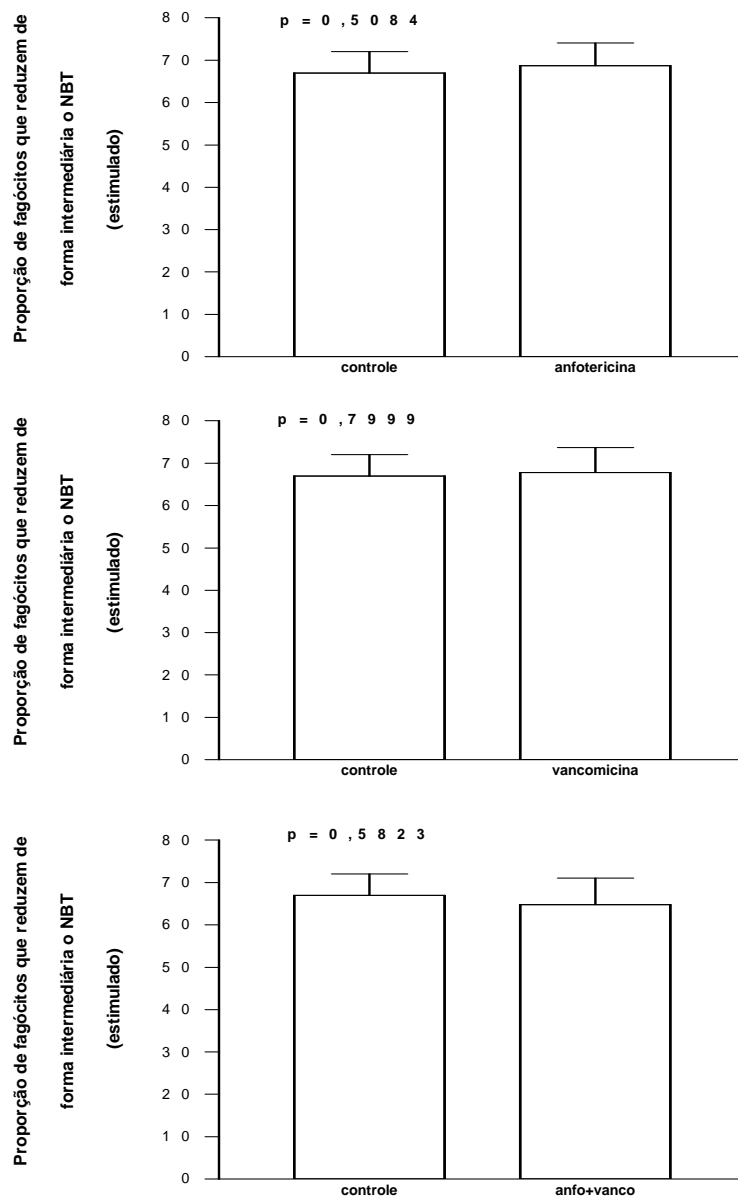


Figura 18: Porcentagem de fagócitos estimulados que reduzem com intensidade intermediária o NBT dos grupos controle (sem droga), anfotericina-B, vancomicina ou ambas. Em todos os três gráficos foi utilizado o teste t pareado e em todos não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Avaliação da influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com anfotericina-B, vancomicina, ou com ambas sobre a redução fraca do *nitro blue tetrazolium* estimulado.

Em estudo comparativo sobre a redução fraca do NBT estimulado entre a anfotericina-B, vancomicina ou ambas em relação ao controle, observamos que a anfotericina-B ($p = 0,3864$, test t pareado), e a vancomicina ($p=0,7529$, test t pareado) não influenciaram, e a associação diminuiu a porcentagem de fagócitos que reduzem fracamente o NBT estimulado ($p=0,0764$, teste de Wilcoxon), **(figura 19)**.

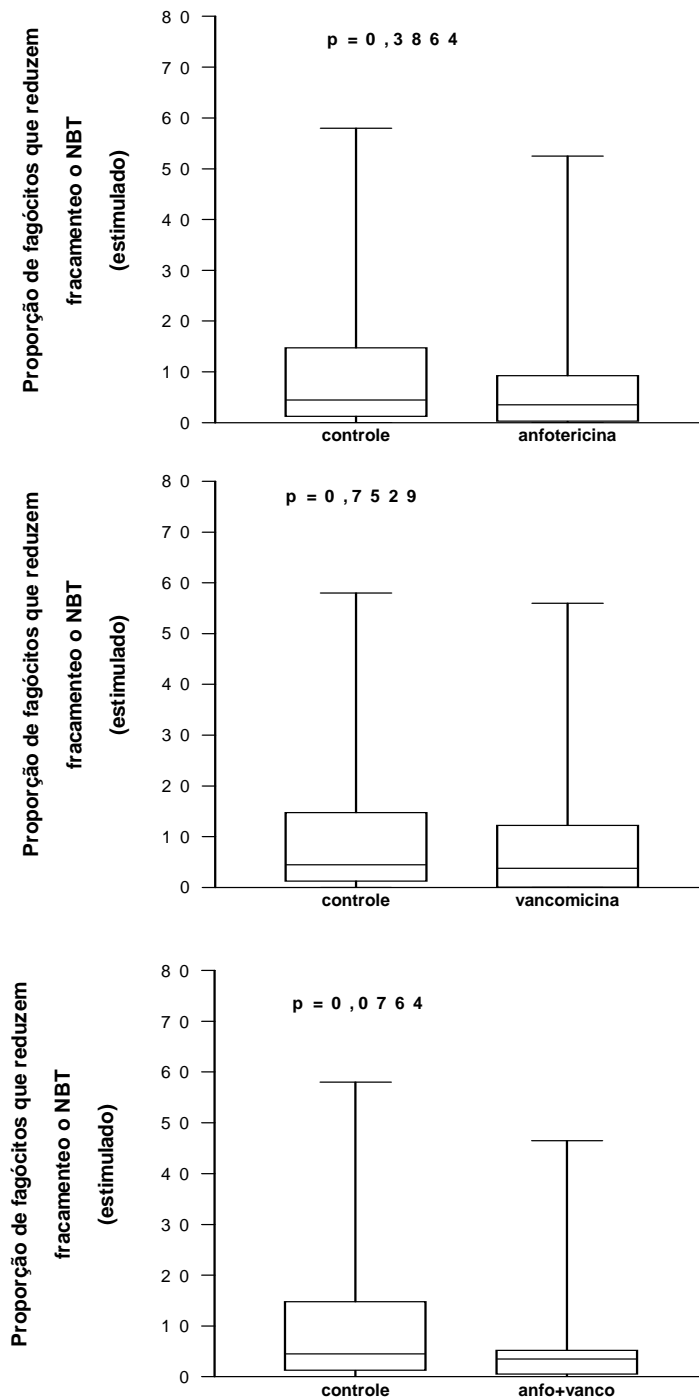


Figura 19: Porcentagem de fagócitos estimulados que reduzem com intensidade fraca o NBT dos grupos controle (sem droga), anfotericina-B, vancomicina ou ambas. Em A: Anfotericina-B. Teste t pareado ($p = 0,3864$). Em B: Vancomicina. Teste t pareado ($p = 0,7529$). Em C: Associação de ambas. Teste de Wilcoxon ($0,0764$).

Influência da anfotericina-B, vancomicina ou a associação de ambas sobre a produção de fator de necrose tumoral- α basal (sem estímulo) e estimulada com LPS, pelas células mononucleares do sangue periférico de indivíduos normais.

O fator de necrose tumoral- α é uma das citocinas produzida pelos macrófagos, importante na defesa inata contra microorganismos. A produção desta citocina foi determinada no sobrenadante das culturas de células mononucleares de indivíduos normais tratadas ou não com anfotericina-B, vancomicina, ou ambas, pelo teste de ELISA.

Apesar de não haver diferença estatística, observamos aumento na produção de fator de necrose tumoral- α basal pelas células mononucleares do sangue periférico, após o tratamento com a anfotericina-B ($p = 0,0705$, teste t pareado), enquanto a vancomicina ($p = 0,2128$, teste t pareado) e a associação de ambas ($p = 0,3269$, teste t pareado), não demonstraram diferença estatística (figura: 20).

Quando os fagócitos foram submetidos ao estímulo com LPS, a associação dos antimicrobianos causou maior aumento na produção do FNT- α em relação aos demais grupos, ($p = 0,0593$, teste t pareado), **(figura 21)**.

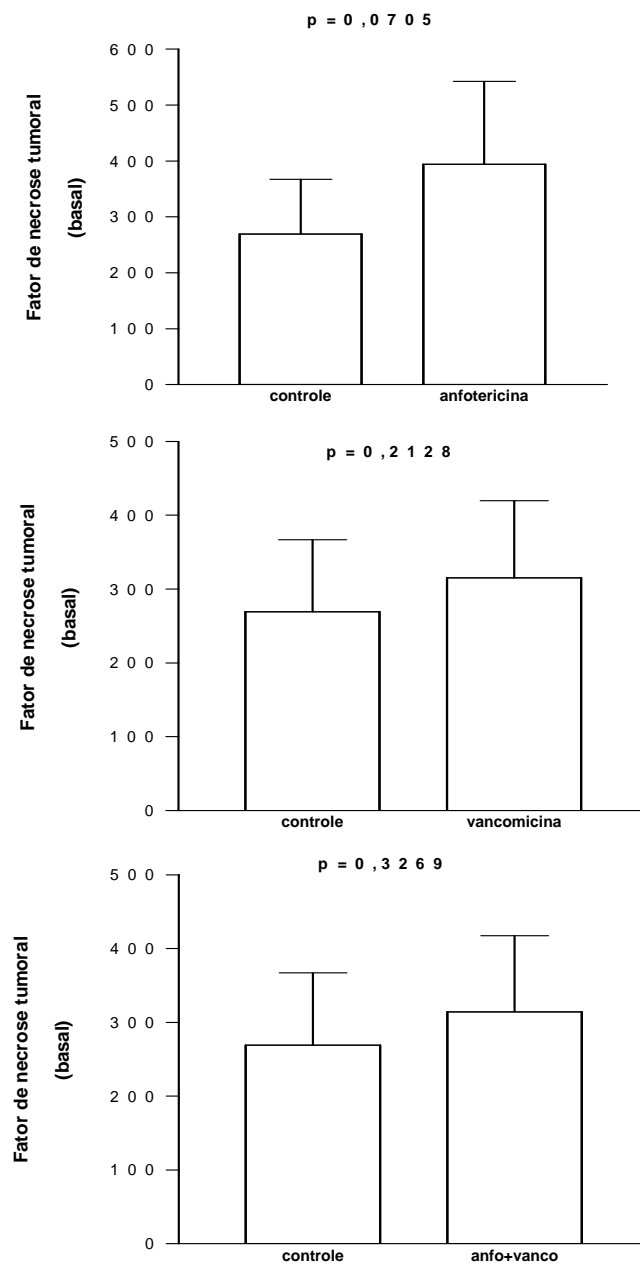


Figura 20: Influência do tratamento in vitro de células mononucleares de 8 indivíduos normais com anfotericina-B, vancomicina, ou ambas sobre a produção de fator de necrose tumoral- α basal. Em A: Anfotericina-B ($p= 0,0705$) Houve maior produção de FNT pelo tratamento in vitro de monócitos pela anfotericina B. Em B: Vancomicina ($p= 0,2128$). Em C: Associação de ambas ($p= 0,3269$).

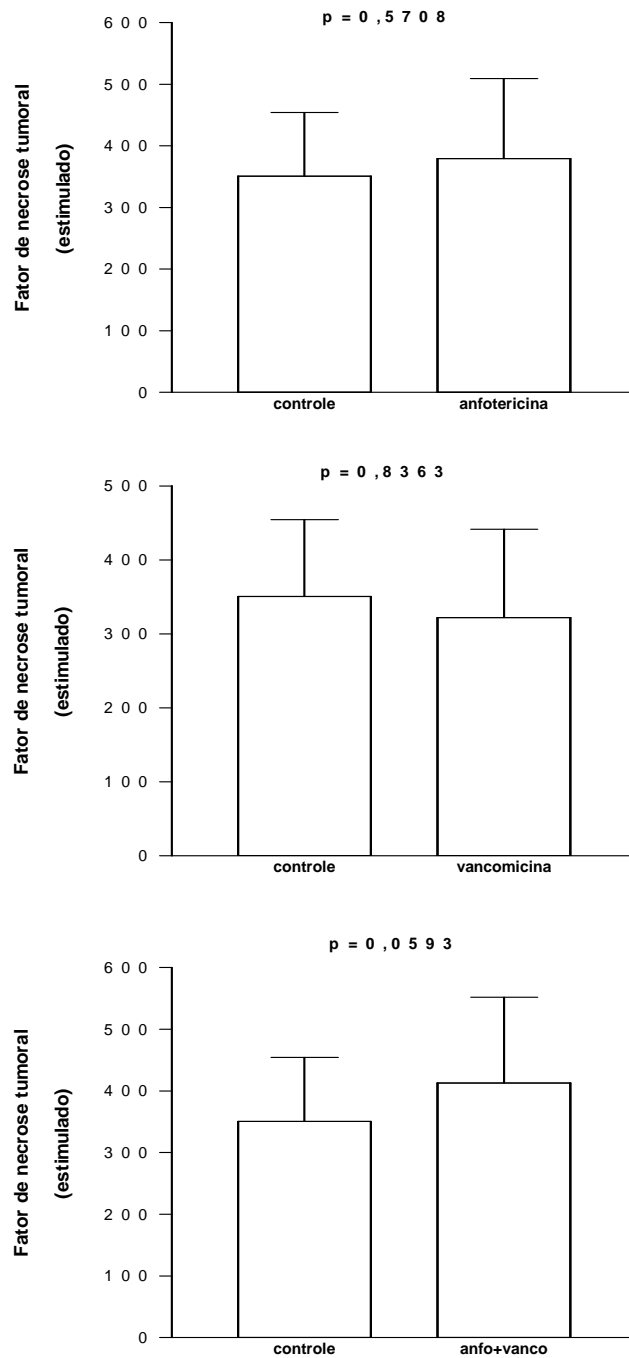


Figura 21: Influência do tratamento in vitro de células mononucleares de 8 indivíduos normais com anfotericina-B, vancomicina, e ambas sobre a produção estimulada de fator de necrose tumoral- α . Em todos foi realizado teste t pareado. Em A: Anfotericina-b ($p=0,5708$). Em B: vancomicina ($p=0,8363$). Em C: a associação ($p=0,0593$), foi o grupo que causou a maior produção de FNT pelo tratamento in vitro de monócitos.

DISCUSSÃO

Tem sido observado que mesmo quando se usa terapia apropriada com antibióticos em pacientes graves, nem sempre ocorre a resposta terapêutica esperada e redução do índice de mortalidade, particularmente em sepsis (Kreger e cols., 1980). Não se encontram ainda esclarecidas quais as causas determinantes de respostas individuais diferentes quando são utilizados antibióticos semelhantemente eficazes e equivalentes. É possível que ocorram diferenças na maneira como cada antimicrobiano influencia a resposta do indivíduo à maior ou menor exposição as endotoxinas, provenientes da lise bacteriana durante o tratamento, e conseqüentemente, a produção de citocinas pró-inflamatórias. Entre as moléculas envolvidas nestas respostas encontram-se o fator de necrose tumoral- α e interleucina-1, que são citocinas pró-inflamatórias, as quais são atribuídas funções de mediadores de muitos eventos fisiopatológicos em infecções severas, incluindo febre, hipotensão e falência múltipla de órgãos (Lynn e Cohen, 1995).

Diante dos efeitos imunomoduladores dos antibióticos que podem influenciar em diferentes graus a resposta local ou sistêmica à infecção, conhecer a capacidade fagocitária e a resposta inflamatória parece ser essencial.

Nesse trabalho foi estudada a influência dos agentes antimicrobianos vancomicina e anfotericina-B desoxicolato, isoladamente ou associados, que são drogas freqüentemente utilizadas em pacientes críticos, com infecções graves, internados em Unidades de Terapia Intensiva, sobre a capacidade fagocitária, produção de radicais de oxigênio e produção de fator de necrose tumoral- α por fagócitos do sangue periférico de indivíduos normais.

Foram utilizados fagócitos de indivíduos normais para avaliar a influência *in vitro* destes agentes antimicrobianos sobre os mecanismos envolvidos na defesa inata com o intuito de evitar as influências da infecção sobre o sistema imunitário.

Os neutrófilos são células fagocíticas especializadas que participam da defesa inata do organismo. A fagocitose é o principal mecanismo de defesa da imunidade inata e inicia pelo englobamento de partículas onde o contato fagócito-partícula é acompanhado de sinalização intracelular desencadeando diversos processos, como rearranjo do citoesqueleto do fagócito, alterações no tráfico de moléculas pela membrana, ativação de mecanismos microbicidas, produção de radicais de oxigênio e produção de citocinas e quimiocinas pró e antiinflamatórias (Bokoch, 1995; Franc e cols, 1999; Underhill e Ozinsky, 2002).

A fagocitose pode ocorrer através dos receptores para padrões moleculares de patógenos presentes na superfície do fagócito e que interagem diretamente com a partícula a ser fagocitada (Thomas e cols, 2000; Fujiwara e cols, 2000), ou pode ser facilitada pela intermediação de opsoninas, como as moléculas de complemento, por meio de receptores específicos na superfície do fagócito, como para a fração C₃ do complemento (Bos e Souza, 2000).

Os receptores para padrões moleculares de patógenos são um grupo complexo de receptores presentes na superfície dos fagócitos que determinam a ativação e sinalização dos fagócitos e entre eles encontram-se os receptores para manose, integrinas, e os receptores de limpeza. Estes receptores determinam a endocitose de várias partículas, bem como estão envolvidos na fagocitose de microorganismos (Haworth e cols, 1997; Gough e Gordon, 2000;

Peiser e cols, 2002) sendo atribuído importante papel destes receptores na resposta inata contra muitos patógenos (Thomas e cols, 2000). Tem sido demonstrado que a ingestão de *Saccharomyces cerevisiae* pelos fagócitos ocorre principalmente pelos receptores de limpeza (Peiser e cols, 2002). Demonstrou-se que a β -glucana e α -manose, presentes na superfície de *Saccharomyces cerevisiae*, são reconhecidos por receptores que reconhecem padrões moleculares, como a dectina-1, os receptores semelhantes ao Toll, o CD14 e outros ainda não caracterizados e que são recrutados para o fagossoma, onde a dectina-1 liga-se à β -glucana (Gantner e cols, 2003). Avaliamos neste trabalho tanto a fagocitose mediada por receptores para padrões moleculares de patógenos, quanto pelos receptores para frações do complemento. O primeiro foi realizado na presença do soro fetal bovino inativado e o segundo na presença de plasma fresco dos indivíduos testados.

Em nosso trabalho, ao analisarmos a capacidade fagocitária, observamos que o tratamento *in vitro* de neutrófilos com anfotericina-B desoxicolato, vancomicina ou ambos, diminuiu o índice fagocitário, tanto através dos receptores para padrões moleculares de patógenos, quanto através de receptores para complemento. A diminuição da capacidade fagocitária pelos receptores para padrões moleculares de patógenos deveu-se a diminuição da proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose, sem influenciar a média de leveduras fagocitadas. Enquanto que ocorreu o oposto quando avaliamos a fagocitose pelos receptores para o sistema complemento, na qual esta diminuição ocorreu pelo menor número de leveduras fagocitadas por neutrófilo, sem influenciar a proporção de neutrófilos envolvidos na

fagocitose. Isso sugere que estas drogas podem ter causado uma diminuição na movimentação dos neutrófilos, diminuindo o envolvimento destas células na fagocitose, como visto nos testes quando avaliamos a fagocitose utilizando leveduras não sensibilizadas. De fato, tem sido demonstrado que a anfotericina-B desoxicolato inibe a resposta quimiotática, diminui a capacidade fagocitária e a capacidade microbicida de neutrófilos humanos (Bjorksten e cols, 1976; Marmor e cols, 1981). Bjorksten e cols. avaliaram o efeito de várias drogas antifúngicas, como anfotericina-B, fluocitosina, miconazol, griseofulvina e nistatina, sobre a resposta quimiotática de neutrófilos humanos, utilizando filtrado de cultura de *Escherichia coli* como agente quimiotático. Estes autores observaram que a anfotericina-B na concentração de 5 µg/ml não afetou a fagocitose enquanto que na concentração de 20 µg/ml foi inibitória. Como a concentração utilizada por estes autores foi maior do que a encontrada no plasma de pacientes tratados com anfotericina-B é incerta a relevância clínica deste efeito sobre a fagocitose in vivo. Em nosso trabalho utilizamos a concentração de 2 mg/ L de anfotericina-B, que é a concentração farmacológica observada durante o tratamento e a mesma concentração que também demonstrou ter inibido a resposta quimiotática no estudo de Bjorksten. Os autores sugerem que este efeito deveu-se primariamente ao acúmulo da droga no interior da célula, e que esse acúmulo em monócitos não aumentou a queima oxidativa, secreção de IL-1 β , nem expressão de HLA-DR.

A diminuição da capacidade fagocitária de neutrófilos tratados com anfotericina B em nossos dados sugere que isto possa ser devido ao efeito sobre a membrana plasmática desses fagócitos. Pela ligação à membrana

celular, a anfotericina B quebra o equilíbrio fosfolípido-colesterol e altera a fluidez da membrana do fagócito (Blanke e cols. 1977), reduzindo a capacidade das células de englobar partículas. Além dos efeitos tóxicos da anfotericina-B devido a interação com a membrana de esterol, é possível que a ação imunomoduladora sobre macrófagos seja também decorrente dessa interação com os esteróis da membrana (Holz 1974). No entanto, o fato da terapia com anfotericina-B muitas vezes ser pouco eficiente em murinos severamente imunocomprometidos (Dromer e Charreire, 1991) sugere que a ação depressora desta droga sobre as células do sistema imunitário pode participar da falta de efeito deste antimicrobiano contra agentes patogênicos.

Em nosso estudo a vancomicina, assim como a anfotericina-B, diminuíram o índice fagocitário tanto através de receptores para padrões moleculares de patógenos, como através de receptores para o complemento.

Ao contrário de nossas observações, estudo utilizando macrófagos peritoneais de ratos por Barriga e cols. 1996, observou aumento da aderência e da quimiotaxia dos macrófagos quando expostos a vancomicina.

Em estudo comparativo da influência da teicoplanina e da vancomicina sobre a fagocitose de *Staphylococcus aureus* por macrófagos de murinos e neutrófilos humanos, estudados in vivo e in vitro, respectivamente, foi concluído que em todas concentrações a teicoplanina aumentou a fagocitose, mas a vancomicina só apresentou este efeito quando utilizada em altas concentrações (50 mg/L e 100 mg/L) (Pedrera e cols, 1993). As concentrações que foram utilizadas são muito superiores àquelas observadas quando o paciente recebe 1g a cada 12 horas, com a qual observa-se uma concentração

sérica entre 18 µg/ ml a 47 µg/ ml (Sorrel e cols. 1982; Viladrich e cols. 1991; Cafferkey e cols. 1982). Vale ressaltar que em nosso estudo utilizamos a concentração de 40 µg/ ml. Diferentemente de nossos resultados sobre a ação da vancomicina sobre neutrófilos, a utilização da forma lipossomal da vancomicina aumentou a capacidade microbicida de macrófagos humanos (Onyeji e cols, 1994; Labro, 1998), Deve ser considerado que a forma lipossomal da droga exerce seu efeito por um tempo muito mais prolongado do que o ocorrido em nossos experimentos, em que estimulamos os neutrófilos com o cloridrato de vancomicina.

Tem sido demonstrado que 50% dos isolados clínicos de *E. faecium* são resistentes à fagocitose e à morte por células polimorfonucleares; e que a sua superfície bacteriana de carboidrato é a provável responsável por este efeito (Arduino e cols. 1994). Exposição a antibióticos pode alterar as propriedades da superfície bacteriana (Raponi e cols. 1990; Wu e cols. 1995) e potencialmente alterar a resistência à fagocitose, por aumentar o depósito de complemento à superfície do microorganismo (Gemmell e cols. 1981; Milatovic e cols. 1983; Williams P, 1987). A vancomicina liga-se à d-alanina-d-alanina encontrada no peptidoglicano da membrana do microorganismo, impedindo que a forma solúvel do peptidoglicano incorpore-se à parede celular do *Staphylococcus aureus* (De Pedro e Schwarz, 1980), facilitando assim a fagocitose.

Quando analisamos a influência da vancomicina sobre a fagocitose pelos receptores para o sistema complemento, a diminuição da fagocitose deveu-se principalmente à diminuição do número de partículas fagocitadas,

sem influenciar a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose; talvez por não ter sido avaliado a fagocitose sobre bactérias (*E. faecium* ou *S. aureus*), como em trabalhos anteriores, tenhamos obtido resultados discordantes, já que as leveduras não possuem membrana de peptidoglicano.

O fato de termos observado uma diminuição da capacidade fagocitária por neutrófilos tratados com esses antimicrobianos, deve ser interpretado com cuidado, pois estudos *in vitro* nem sempre podem ser transpostos integralmente para a realidade *in vivo*, quando certamente diversos outros fatores podem influenciar os resultados. As drogas utilizadas são seguras e eficientes no tratamento de infecções específicas, apresentando poder microbicida em concentração inibitória mínima (MIC) inferior ao que utilizamos em nossa pesquisa. Porém devemos observar com atenção ao optarmos por esquemas antibióticos que contenham estes produtos isoladamente ou associados, para tratarmos pacientes graves ou imunodeprimidos, já que poderão diminuir a fagocitose agravando ainda mais a infecção. A associação das duas drogas não piorou a fagocitose em relação ao uso isolado de qualquer uma das duas.

Um dos mecanismos microbicidas usado pelos neutrófilos ativados é a conversão catalítica do oxigênio molecular em radicais livres oxalídeos que são agentes oxidantes altamente reativos e destruidores de micróbios. O principal sistema gerador de radicais livres é o sistema oxidase dos fagócitos. A oxidase do fagócito é uma subunidade enzimática que é reunida nos fagócitos ativados na membrana plasmática e na membrana fagolisossômica. A função dessa enzima é reduzir o oxigênio molecular em

intermediários reativos do oxigênio (ROIs), tais como os radicais superóxidos, com a forma reduzida da nicotinamida fosfato de dinucleotídeo adenina (NADPH), usado como co-fator. O superóxido é enzimaticamente dismutado em peróxido de hidrogênio, que é usado pela enzima mieloperoxidase para converter normalmente os íons halídeos não reativos em ácidos hipo-halosos que são tóxicos para as bactérias. O processo pelo qual são produzidos os ROIs é chamado de explosão respiratória. O FNT ou o LPS podem sensibilizar os neutrófilos para produzirem grandes quantidades de ROIs em resposta a outros ativadores, tais como peptídeos bacterianos N-formilmetionil e as quimiocinas (Abbas e cols, 2002).

A ingestão de partículas pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos estimula a produção de intermediários reativos de oxigênio e citocinas (Stahl e Ezekowitz, 1998; Gordon, 2002; Linehan e cols, 2000; Underhill e Ozinsky, 2002; Brown e cols, 2003).

Os mecanismos microbicidas oxidativos são reconhecidos como importantes na lise de micróbios fagocitados (Pearson e cols, 1983). No caso de infecção pela leishmania, por exemplo, durante os estágios iniciais, o superóxido é produzido como parte da explosão respiratória tanto em macrófagos murinos, quanto em humanos, em resposta à fagocitose (Gantt e cols, 2001) e vários estudos têm relacionado a presença ou ausência destes intermediários reativos de oxigênio com a resistência ou suscetibilidade à doença, respectivamente. Alguns parasitas induzem diminuição na atividade da NADPH oxidase e, conseqüentemente, a produção de H_2O_2 e O_2^- facilitando o

escape da resposta de defesa do hospedeiro (Haidaris e Bonventre , 1982; Kumar e cols, 2001; Kumar e cols, 2002).

Observamos que a anfotericina-B desoxicolato diminuiu a proporção de fagócitos que reduziram o nitro blue tetrazolium (NBT), quando avaliado após estímulo dos fagócitos, porém não houve diferença na produção de radicais de oxigênio quando os fagócitos foram avaliados sem estímulo (basal). Em relação à intensidade de redução do NBT, houve diminuição dos fagócitos que reduziram de forma forte o NBT estimulado e de forma fraca o NBT basal. Nossos resultados diferem do que tem sido observado utilizando macrófagos peritoneais de camundongos ou ratos. A anfotericina-B, além de agir ligando-se à membrana de esterol, pode aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, FNT- α , óxido nítrico (NO) e intermediários reativos de oxigênio (Tohyama e cols, 1996; Mozaffarian e cols, 1997; Rogers e cols, 1998; Vonk e cols, 1998; Martin E. e cols., 1994). Tohyama e cols.1996, demonstraram em estudos realizados com camundongos, que a anfotericina- B aumentou a produção de INF- γ por macrófagos peritoneais contra *Cryptococcus neoformans* e produziu marcante aumento na produção de NO mediados pela produção de FNT- α e IL-1.

Diferentemente dos nossos resultados, Wolf e cols. (1990) estudando macrófagos peritoneais de camundongos estimulados com *H. capsulatum* ou zymosan, observaram que a anfotericina-B aumentou a liberação de ânions superóxido e, observaram resposta sinérgica quando a droga foi associada com INF- γ recombinante de camundongo. Na ausência de estímulo específico, nenhuma atividade de queima oxidativa foi observada.

A anfotericina-B também interfere com a produção do ânion superóxido, provavelmente por competir com o citocromo C para redução (Wilson e cols. 1991). Macrófagos têm uma baixa capacidade constitutiva para produção de ânion superóxido (Johnston e cols. 1978), mas em trabalho realizado por Wilson e cols.(1991), a exposição à anfotericina-B resultou em aumento de três vezes na produção de superóxidos por macrófagos cultivados durante 48 horas na presença de diferentes concentrações de anfotericina B. O efeito da droga sobre a produção do ânion superóxido foi bifásica com o aumento nas concentrações baixa e alta, porém não na concentração intermediária (Wilson e cols. 1991). Esse fenômeno pode ter sido devido ao fato que o peróxido de hidrogênio pode inibir a produção de superóxido (Oosting e cols. 1990). Assim, já que a anfotericina-B pode induzir a liberação de superóxido e peróxido de hidrogênio, a medida final da produção de superóxido pode ter sido determinada por influências estimulantes e inibitórias (Wilson e cols., 1991).

Tem sido sugerido que a formação de complexos de anfotericina-B - esterol induz alterações na organização da membrana, com conseqüentes mudanças nas funções catalíticas e de receptores (Chapman e cols. 1978). A anfotericina-B pode se ligar à membrana e causar alterações conformacionais que permitem grande exposição da membrana a enzimas, como a NADPH oxidase, desse modo potencializando a explosão respiratória após estímulo por acetato de forbol miristato. Alternativamente, a droga pode aumentar a síntese protéica, de modo que mais enzimas relacionadas à explosão respiratória estejam disponíveis (Wilson e cols. 1991). Sokol-Anderson e cols. (1986)

sugeriram que a anfotericina- B desencadeia reações de oxidação em cascata e mata os fungos por um processo de auto-oxidação.

A vancomicina não influenciou a produção basal ou estimulada dos radicais de oxigênio em nosso estudo. Ao ser avaliado quanto a intensidade, a associação da anfotericina-B com a vancomicina diminuiu a proporção de fagócitos que reduziram de maneira fraca o NBT basal e estimulado provavelmente devido à influência da anfotericina-B.

Estes radicais de oxigênio formados são fundamentais na defesa antimicrobiana do organismo, mas são também altamente tóxicos e podem causar lesão química no DNA, proteínas e lipídeos insaturados (Klebanoff, 1992). Metabólitos tóxicos de O_2 são gerados normalmente pela célula fagocítica e sua produção é significativamente aumentada em condições patológicas (Kerr e cols, 1996; Peiser e Gordon, 2001). Portanto, o nosso trabalho permite concluir que em condições *in vitro* e utilizando sangue de indivíduos saudáveis, a anfotericina-B desoxicolato isoladamente foi capaz de diminuir a produção de radicais de oxigênio por neutrófilos estimulados. Aparentemente, a vancomicina não interferiu nos mecanismos oxidativos dos neutrófilos e a associação de ambas não piorou a produção de radicais de oxigênio em relação a qualquer uma das duas isoladamente.

Pelos nossos dados os antimicrobianos aqui testados diminuíram a produção de radicais de oxigênio, o que pode ter interpretações opostas quanto as suas conseqüências. Por um lado pode representar uma vantagem no tratamento de infecções graves, que por si só estimulam forte produção de radicais livres possíveis de causar lesão tecidual A anfotericina-B diminuindo a

produção de radicais livres pode diminuir o risco de causar lesão química ao tecido próprio dependente destes radicais. No entanto, em condições infecciosas graves os mecanismos microbicidas dependentes de radicais livres são muito importantes para eliminação do patógeno fagocitado e sua diminuição pode comprometer os mecanismos de defesa se ocorrer em um indivíduo já com deficiência do sistema de fagócitos. Portanto, sua utilização deve ser cautelosa em pacientes que apresentem algum comprometimento primário ou secundário do sistema de fagócitos, como por exemplo, em diabéticos e grandes queimados entre outras situações clínicas.

O FNT- α é uma citocina que ativa uma cascata de mediadores inflamatórios secundários que podem, eventualmente, levar a lesão celular endotelial, assim como a uma instabilidade hemodinâmica e metabólica (Bone, 1991). É reconhecido como mediador principal do choque séptico bacteriano causado tanto por bactérias Gram-negativas como Gram-positivas (Tracey e cols, 1988). Contudo, o FNT- α tem importante papel protetor, como foi descrito em experimentos com camundongos infectados por patógenos como *Listeria monocytogenes* e em estudos de animais infectados por *Staphylococcus aureus*, nos quais o gene para o FNT foi nocauteado (Pfeffer e cols, 1993; Vadaux e cols, 1992). Por outro lado, muitos autores têm mostrado que FNT- α pode aumentar a capacidade dos macrófagos e leucócitos polimorfonucleares fagocitar e matar *Cândida albicans* (Ghezzi e cols, 1994) e melhorar a sobrevivência de camundongos infectados. Além disso, a secreção autócrina do FNT- α tem mostrado contribuir para produção do óxido nítrico e morte de

parasitas intra-celulares, como a *Leishmania major* (Green e cols. 1990), de modo mais eficiente do que associação da anfotericina-B e IFN- γ .

Nossos resultados mostraram aumento da produção do FNT- α pelos monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis, quando tratados pela anfotericina-B, sem que houvesse estímulo por lipopolissacarídeos. Este aumento não foi evidenciado quando os monócitos foram estimulados com o LPS. Assim como os nossos resultados, o aumento da produção do FNT- α (Chia e Pollack, 1992; Tokuda e cols, 1993; Rogers e cols, 1998;), interleucina 1 (Chia e McManus, 1990; Cleary e cols, 1992; Matsumoto e cols, 1993; Rogers e cols, 1998), interleucina 6 (Ghezzi e cols, 1994; Louie e cols, 1995) e fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) (Fujita e cols, 1995) têm também sido demonstrados em estudos com macrófagos tratados com anfotericina-B, assim como aumento de prostaglandinas E-2 (Gigliotti e cols, 1987). Recentemente, foi mostrado que anfotericina-B ativa os genes para IL-1, FNT- α , IL-1Ra, proteína inflamatória do macrófago (MIP-1), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), IL-8 e molécula de adesão intercelular (ICAM-1) em linhagens de células monocíticas humanas THP-1. A ativação destes genes está correlacionada com o aumento da produção dos respectivos produtos (Rogers e cols, 1998; Rogers e cols, 2000; Cleary e cols, 2001; Rogers e cols, 1999).

O FNT- α é produzido por monócitos/macrófagos em resposta ao estímulo de produtos bacterianos (Beutler e Cerami, 1988; Mohler e cols, 1994). Em caso de sepse bacteriana por bactérias Gram negativas, o lipopolissacarídeos (LPS) da membrana destas bactérias induzem a

liberação de grande quantidade de FNT- α , o que ocorre também quando a sepse é mista, por bactérias Gram positivas e Gram negativas. Os fragmentos da parede celular de bactérias Gram positivas, ácido teicóico e peptídeoglicano, são capazes de induzir a liberação de FNT- α e IL-6 por monócitos (Mattsson e cols, 1993; Heumann e cols, 1994). O nível sérico elevado de FNT- α em pacientes sépticos está relacionado com desfecho fatal (Debets e cols, 1989). Tratamentos com antibióticos podem causar liberação de FNT- α devido à intensa morte de bactérias e exposição dos macrófagos ao aumento de produtos bacterianos em circulação, o que já tem sido observado em muitos experimentos com modelos animais e estudos *in vitro* (Hurley , 1992). A liberação de endotoxinas depende do mecanismo de ação de antibióticos e esse efeito tem sido observado durante o tratamento com ceftriaxona, imipenem-cilastatine, ampicilina, cefotaxima, ciprofloxacina e piperacilina (Hurley, 1992; Crosby e cols, 1994)

Enquanto alguns pesquisadores têm descrito o aumento da produção de citocinas, por meio do estímulo de células mononucleares *in vitro* com anfotericina-B (Tokuda e cols, 1993; Cleary e cols, 1992; Louie e cols, 1994; Louie e cols, 1995), outros não têm sido capazes de demonstrar tal efeito (Martin e cols, 1994; Raponi e cols, 1993; Ghezzi e cols, 1994). Tal discrepância pode dever-se à diferentes aspectos metodológicos entre os diferentes estudos. Como também a utilização de células diferentes, em que em alguns foram utilizadas células mononucleares humanas de sangue periférico, enquanto em outros foram utilizados macrófagos de murinos (Chia e

Pollack, 1992; Tokuda e cols, 1993; Cleary e cols. 1992 e 2001, Louie e cols, 1994; 1995).

Os nossos dados mostraram que a vancomicina na concentração de 40 µg/ml não influenciou a produção de FNT-α nem quando os fagócitos foram estimulados por LPS. Nossos achados foram diferentes dos de Siedlar e cols, (1997) que mostraram que a vancomicina na concentração de 10 – 1000 µg/ml, diminuiu a produção do FNT-α por monócitos estimulados por LPS *in vitro*, também retirados de indivíduos saudáveis. No entanto, foi observado em endocardite bacteriana experimental, pico sérico de FNT- α, após administração de vancomicina (Mohler e cols., 1994)

Seria interessante conhecer a influência da vancomicina sobre a produção de FNT-α em pacientes em tratamento para sepse por bactérias Gram positivas (sepse estafilocócica em queimados), já que muitas vezes esta droga é a terapia de escolha isolada ou em associação com outros esquemas; uma vez que diminuir a produção do FNT-α poderia ser um dos importantes efeitos benéficos dessa droga, reduzindo o risco de complicações da sepse.

Nossos dados mostraram que o tratamento de monócitos, *in vitro*, estimulados com LPS, com a associação de anfotericina-B desoxicolato e vancomicina aumentou a produção de FNT-α.

Os efeitos diretos dos antibióticos sobre as funções do sistema imunitário devem ser interpretados cuidadosamente e concernente às condições experimentais. Para sabermos o potencial imunomodulador de

agentes antimicrobianos, procedimentos com diferentes culturas celulares e estudos *in vivo* também deverão ser realizados.

Nossa pesquisa sugere que a importância do uso racional de antimicrobianos não se pautará em futuro próximo, somente sobre a ação microbicida em si, ou interações farmacológicas, mas também sobre um novo espectro que vem se descortinando nos últimos anos, que é o potencial imunomodulador inerente aos fármacos.

Atualmente, infecções fúngicas e por outros microrganismos intracelulares têm se tornado um problema crescente devido a doenças e terapias imunossupressoras, a elucidação do modo de ação de drogas disponíveis e a complexa relação entre esses antibióticos, fagócitos e microrganismos tem se tornado cada vez mais importante.

Nossos dados mostraram pela primeira vez a ação combinada da anfotericina-B e da vancomicina sobre as funções dos fagócitos, que são as células envolvidas na primeira linha de defesa do organismo contra muitas infecções bacterianas e fúngicas e drogas frequentemente utilizadas associadas no tratamento de pacientes graves. Nossos dados mostraram que isoladamente tanto a anfotericina-B quanto a vancomicina podem deprimir a capacidade fagocitária dos neutrófilos, entretanto a associação de ambos não aumentou a depressão da função fagocitária dos neutrófilos. Em relação aos mecanismos microbicidas dependentes dos radicais de oxigênio, isoladamente a anfotericina-B deprimiu a proporção de fagócitos que reduziram fracamente o NBT, entretanto a associação desta droga com a vancomicina não agravou esta depressão da produção de radicais livres de modo significante. A

associação destas duas drogas foi capaz de aumentar a produção de FNT, enquanto o tratamento das células *in vitro* isoladamente com ambas as drogas não influenciou a produção desta citocina.

Nossos dados sugerem que esta depressão sobre as funções fagocitárias deve ser considerada ao prescrever estas drogas para pacientes que já apresentam alteração das funções dos fagócitos, para não prejudicar as defesas antimicrobianas. Pacientes em uso destas duas drogas devem ter observação estrita de sua evolução e as possíveis influências sobre as funções dos fagócitos devem ser consideradas na associação de outras drogas freqüentemente utilizadas em pacientes graves.

CONCLUSÕES

A anfotericina-B desoxicolato diminuiu o índice fagocitário dos neutrófilos de indivíduos normais pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, *in vitro*, devido à diminuição da proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose, já que não influenciou a média de leveduras fagocitadas. Esta droga também causou diminuição do índice fagocitário quando avaliada pelos receptores para o sistema complemento. Entretanto, de modo diferente, pois o tratamento com a anfotericina-B causou uma diminuição da média de leveduras fagocitadas e não influenciou a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose. Este fato sugere que a anfotericina B diminuiu a expressão de receptores para o sistema do complemento nos neutrófilos, não influenciando a expressão dos receptores para padrões moleculares de patógenos.

A vancomicina também diminuiu o índice fagocitário dos neutrófilos de modo semelhante à anfotericina-B; ou seja, diminuiu o índice fagocitário pelos receptores para padrões moleculares para patógenos às custas da diminuição da proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose e diminuiu o índice fagocitário avaliado pelos receptores para complemento às custas da diminuição do número de leveduras fagocitadas.

A associação de anfotericina-B desoxicolato e vancomicina também mostrou o mesmo padrão de resposta, diminuindo o índice fagocitário às custas da diminuição da proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose, sem influenciar a média de leveduras fagocitadas quando avaliada pelos receptores para padrões moleculares de patógenos; e diminuiu o índice fagocitário às custas da diminuição de leveduras fagocitadas, sem influenciar a

proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose quando avaliada pelos receptores para componentes do sistema do complemento.

A anfotericina-B desoxicolato diminuiu a produção de radicais de oxigênio quando avaliada pela redução do *nitro blue tetrazolium* estimulado. Essa diminuição deveu-se a diminuição daqueles fagócitos que reduzem fracamente o *nitroblue tetrazolim* basal. A vancomicina não influenciou a produção de radicais de oxigênio.

A associação da anfotericina-B com a vancomicina diminuiu a proporção de fagócitos que reduzem fracamente o NBT basal e estimulado.

A anfotericina-B desoxicolato aumentou a produção basal do FNT- α .

A vancomicina não influenciou a produção de FNT- α .

A associação da anfotericina-B com a vancomicina aumentou a produção do FNT- α por monócitos estimulados por LPS.

Nossos dados mostraram que a associação da anfotericina-B e vancomicina não piora a capacidade fagocitária dos neutrófilos, e produção de radicais de oxigênio em relação ao que ocorre com a utilização isolada de cada antimicrobiano, entretanto, a associação das duas drogas aumenta a produção de fator de necrose tumoral- α .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A. K., Lichtman A. H., Pober J. S. Imunidade Inata. *Imunologia Celular e Molecular* 4^a ed. Copyright © 2002; p.270-90.

Arduino R C & Murray B E (1993). Enterococcus: antimicrobial resistance. In *Principal and Practice of Infectious Diseases*, update to 3rd edn (Mandell, G., Douglas, R. G. & Bennett, J., Eds.) Churchill Livingstone, New York, NY.

Arduino R C, Jacques-Palaz K, Murray B E & Rakita R M. Resistance of *Enterococci faecium* to neutrophil-mediated phagocytosis. *Infect Immun.* 1994; **62**: 5587-94.

Arthur M & Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; **37**: 1563-71.

Atkinson AJ and Bennett JE. Amphotericin B pharmacokinetics in humans. *Antimicrob Agents Chemother.* 1978; **13**: 271-276.

Barriga C, Pedrera I, Rodrigues AB. Comparative study of the effect of teicoplanin and vancomycin upon the phagocytosis process of peritoneal macrophages. *Rev Esp Fisiol.* 1996; **52**: 215-222.

Beutler B, Cerami A. tumour necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu. Rev Biochem* 1988; **57**: 505-518.

Bjorksten B, Ray C & Quie PG. Inhibition of human neutrophil chemotaxis and chemiluminescence by amphotericin B. *Infect Immun.*1976; **14**: 315-317.

Blanke T J., Little J R, S F Shirley J R and Lynch R G. Augmentation of murine immune responses by amphotericin B. *Cell Immunol.* 1977; **33**:180-190.

Bokoch GM. Regulation of the phagocyte respiratory burst by small gtp – binding proteins. *Trend Cell Biol* 1995; **05**: 109-113.

Bone R. The pathogenesis of sepsis. *Ann. Intern. Med.* 1991; **115**: 457-469.

Bos H and Souza W. Phagocytosis of yeast: a method for concurrent quantification of binding and internalization using differential interference contrast microscopy. *J Immunol Methods* 2000; **238**: 29-43.

Brajtburg J, Elberg S, Kobayashi G S and Medoff G. Toxicity and induction of resistance to *Listeria monocytogenes* infection by amphotericin B in inbred strains of mice. *Infect Immun.*1986; **54**: 303-307.

Brandi MCAC. Padronização de um método de obtenção de fagócitos do sangue periférico para avaliação funcional. Tese de mestrado. Brasília – DF. Universidade de Brasília ; 1993.

Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. *J Exp Med* 2003; **197**: 1119-1124.

Cafferkey MT, Hone R, Keane CT. Severe staphylococcal infections treated with vancomycin. *J Antimicrob Chemother.* 1982; **9**: 69-74.

Campbell DE, Douglas SD. Phagocytic cells functions. I. Oxidation and chemotaxis. In Rose NR, Macario EC, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM (eds). *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. American Society of Microbiology Press. Washington, 1997; 320-328.

Cantú T G, Yamaka- Yuen N A, Lietman P S. Serum vancomycin concentrations: reappraisal of their clinical value. *Clin Infect Dis.* 1994, **19**: 1180-2

CDC.<http://www.cdc.gov/ncidod/hip/Aresist/mrsa.htm>, 2005.

Chapman H A., Jr. and Hibbs J B Jr. Modulation of macrophage tumoricidal capability by polyene antibiotics: support for membrane lipid as a regulatory determinant of macrophage function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978; **75**:4349-4353.

Chia J K S & McManus E J. In-vitro tumour necrosis factor induction assay for analysis of febrile toxicity associated with amphotericin B preparations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; **34**: 906-8.

Chia J K S & Pollack M. Amphotericin B induces tumour necrosis factor production by murine macrophages. *J Infect Dis.* 1992; **159**: 113-6.

Christiansen K J, Bernard E M, Gold J W M and Armstrong D A. Distribution and activity of amphotericin B in humans. *J Infect Dis* 1985; **152**: 1037-1043.

Clark N C, Cooksey R C, Hill B C, Swenson J M & Tenover F C. Characterization of glycopeptide resistant enterococci from U.S. Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; **37**: 2311-17.

Cleary J D, Chapman S & Nolan R L. Pharmacology modulation of interleukin-1 expression by amphotericin B-stimulated human mononuclear cell. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; **36**: 977-81.

Cleary JD, Rogers PD & Chapman SW. Differential transcription factor expression in human mononuclear cells in response to amphotericin B: identification with complementary DNA microarray technology. *Pharmacotherapy* 2001; **21**: 1046-1054.

Collette N, Van Der Auwera P, Pascual Lopez A, Heymans C and Meunier F. Tissue concentration and bioactivity of amphotericin-B in cancer patients treated with amphotericin-B deoxycolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33(3): 362-8.

Cooper GL, Given DB. Vancomycin. a comprehensive review of 30 years of clinical experience. *Eli Lilly* 1986; 39-69.

Craven PC, Ludden T M, Drutz DJ, Rogers W, Haegele K A and Skrdlant H B. Excretion pathways of amphotericin B. *J Infect Dis*, 1979; **140**: 329-341.

Crosby HA, Bion JF, Penn CW, Elliott TS. Antibiotic-induced release of endotoxin from bacteria in vitro. *J Med Microbiol* 1994; **40**: 23-30.

Dalhoff A., Shalit I. Immunomodulatory effects of quinolones. *Lancet infect Dis.* 2003; **3**:359-371.

Daum R S., Gupta S., Sabbash R., Milewski W M. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates with decreased susceptibility to vancomycin and teicoplanin. *J Infect Dis.* 1992; **166**:1066-72.

De Pedro M A and Schwarz U. Affinity chromatography of murein precursors on vancomycin-sepharose. *FEMS Microbiol. Lett.* 1980; **9**: 215-217.

Debets JMH, Kampmeijer R, Van der Linden MPH, Burman WA, Van der Linden CJ. Plasma tumour necrosis factor and mortality in critically ill septic patients. *Crit Care Med* 1989; **17**: 489-493.

Dromer F and J Charreire. Improved amphotericin B activity by a monoclonal anti-Cryptococcus neoformans antibody: study during murine cryptococcosis and mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother.* 1981; **163**: 1114-1120.

Endtz H P., van den Braak N, Verbrugh H A., van Belkum A. Vancomycin resistance: status quo and quo vadis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999; **18 (10)**: 683-90.

Franc NC, White K, Alan R, Ezekowitz A. Phagocytosis and development: back to the future. *Curr Opin Immunol* 1999; **11**: 47-52.

Fujita H, Masuda H, Nakajima T, Yada K, Watanabe M and Kagi-tani Y. Protective effect of human macrophage colony-stimulating factor on fungal infection (2). In vitro effect of human macrophage colony-stimulating factor on systemic aspergillosis and in vitro effect on the activities of macrophage. *Kansenshogaku Zasshi* 1995; **69**: 582-589.

Fujiwara SN, Hirayama H, Ogata Y, Ikeda H, Ikebuchi K. Phagocytosis *in vitro* of polyethylene glycol modified liposome encapsulated hemoglobin by human

peripheral blood monocytes plus macrophages through scavenger receptors. *Life Sciences* 2000; **70**: 291-300.

Gallis H A, Drew R H and Pickard W W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Reviews of Infectious Diseases* 1990; **12**: 308-329.

Gantner B N, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 2003; **197**: 1107-1117.

Gantt KRG, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jerônimo SMB, Nascimento ET, Britigan BE, Wilson ME. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J Immunol* 2001; **167**: 893-901.

Gemmell C G, Peterson P K, Schmeling D, Kim Y, Mathews J, Wannamaker L. Potentiation of opsonization and phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* following growth in the presence of clindamycin. *J Clin Invest.* 1981; **67**: 1249-56.

Ghezzi M C, Raponi G, Filadoro F & Mancini C. The release of TNF- α and Il-6 from human monocytes stimulated by filtrates of *Candida albicans* after treatment with amphotericin B. *J Antimicrob Chemother* 1994; **33**: 1039-43.

Gigliotti F, Shenep J L, Lott L and Thornton D. Induction of prostaglandin synthesis as the mechanism responsible for the chills and fever produced by infusing amphotericin B. *J Infect Dis.*1987; **156**: 784-789.

Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 2002; **111**: 927-930.

Gough PJ and Gordon S. The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microb Infect* 2000; **2**: 305-311.

Green S J, Crawford R M, Hockmeyer J T, Meltzer M S and Nacy C A. Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumour necrosis factor-alpha. *J Immunol.* 1990; **145**: 4290-4297.

Haidaris CG, Bonventre PF. A role for oxygen-dependent mechanisms in killing of *Leishmania donovani* tissue forms by activated macrophages. *J Immunol* 1982; **129**: 850-855.

Haworth BR, Plattt N, Keshav S, Hughes D. The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. *J Exp Med* 1997; **186**: 1431-1439.

Heumann D, Barras C, Severin A, Glauser MP, Tomasz A. Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun* 1994; **62**: 2715-2721.

Hisaeda H, Sakai T, Nagasawa H, Yasutomo K, Mae-Kawa Y and Himeno K. Contribution of extrathymic gamma delta T cells to the expression of heat-shock protein and to protective immunity in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Immunology* 1996; **88**: 551-557.

Hoepric PD. Clinical use of amphotericin B and derivatives: lore, mystique and fact. *Clin Infect Dis* 1992; **14** (Suppl. 1): 114-119.

Holz, R W. The Effects of the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B on thin lipid membranes. *Ann N Y Acad Sci.* 1974; **35**: 469-479.

Horvath A E and Zierdt C H. The effect of amphotericin B on *Trypanosoma cruzi* in vitro and in vivo. *J Trop Med Hyg.* 1974; **77**: 144-149.

Hurley JC. Antibiotic-induced release of endotoxin: a reappraisal. *Clin Infect Dis* 1992; **15**: 840-854.

Johnston R J., Godzik C A and Cohn Z A. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J Exp Med.* 1978; **148**:115-127.

Kerr E M, Bender C M and Monti E J. An introduction to oxygen free radicals. *Heart Lung* 1996; **25**: 200-211.

Klebanoff S J. Oxygen metabolites from phagocytes. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, editors. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. 2^a ed. New York: Raven press 1992; 541-588.

Kreger B E, Craven, and McCabe W. R. Gram-negative bacteremia IV. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients. *Am. J. Med.* 1980. **68**:344-355.

Kumar P, Pai K, Pandey H P, Sundar S. NADH-oxidase, NADPH-oxidase and myeloperoxidase activity of visceral leishmaniasis patients. *J Med Microbiol* 2002; **51**: 832-836.

Kumar P, Pai K, Sundar S. Reactive oxygen intermediates, nitrite and IFN- γ in Indian visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 2001; **124**: 262-265.

Labro M T. Interference of Antibacterial Agents with Phagocyte Functions: Immunomodulation or "Immuno-Fairy Tales"? *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 615-650.

Labro M T. Antibacterial agents-phagocytes: new concepts for old in immunomodulation. *Internat J Antimicrob Agents* 1998; **10**: 11-21.

Lachman P J, Hobart M J. Complement technology. In: Weir D M (Ed) Handbook of Experimental Immunology, volume 1. Immunochemistry. Blackwell, Oxford 1978; 1-5A.

Latge, I .P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol Rev.* 1999; **12**:310-50.

Linehan A S, Martínez-Pomares L, Gordon S. Macrophage lectins in host defence. *Microbes Infect* 2000; **2**: 279-288.

Louie A, Baltch A L, Franke M A, Smith R P & Gordon M A. Comparative capacity of four antifungal agents to stimulate murine macrophages to produce tumour necrosis factor alpha: an effect that is attenuated by pentoxifylline, liposomal vesicles, and dexamethasone. *J Antimicrob Chemother.* 1994; **34**: 975-87.

Louie A, Baltch A L, Smith R P, Frankie M A, Ritz W J, Singh J K et al. Fluconazole and amphotericin B antifungal therapies do not negate the protective effect of endogenous tumour necrosis factor in a murine model of fatal disseminated candidiasis. *J Infect Dis.* 1995; **171**: 406-15.

Lyman C A & Walsh T J. systemically administered antifungal agents. A review of their clinical pharmacology and therapeutic applications. *Drugs* 1992; **44**:9-35.

Lynn W A & Cohen J. Adjunctive therapy for septic shock: a review of experimental approaches. *Clin Infect Dis*. 1995; **20**: 143-58.

Marmer D J, Fields B T, France G L & Steele R W. Ketoconazole, amphotericin B, and amphotericin B methyl ester: comparative *in vitro* toxicological effects on neutrophil function. *J Antimicrob Chemother*. 1981; **20**: 660-665.

Martin E, Stuben A, Gorz A, Weller U & Bhakdi S. Novel aspect of amphotericin B action: accumulation in human monocytes potentiates killing of phagocytosed *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; **38**: 13-22.

Matsumoto T, Kaku M, Furuya N, Usui T, Kohno S, Tomono K, Tateda K, Hirakata Y and Yamaguchi K. Amphotericin-B induced resistance to *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *J. of Antibiotic (Tokyo)* 1993; **46**: 777-784.

Mattson E, Verhage L, Roloff J, Fleer A, Verhoef J, Van Dijk H. Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulate human monocytes to release tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interleukin-6. *FEMS Immunol. Med Microbiol* 1993; **7**: 281-287.

Medoff G, Kwan C N, Schlessinger D and Kobayashi G S. Permeability control in animal cells by polyenes: a possibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 1973; **3**: 441-443.

Millatovic D, Braveny I & Verhoef J. Clindamycin enhances opsonization of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983; **24**: 413-7.

Moellering R C Jr., Courvalin P, Ronald N. J, Levine D P., Rybak M J., Stevens L D and Sakoulas G. CME Article: Predicting and Defining Vancomycin Efficacy. *Clin Infect Dis.* 2006; **42 (Suppl 1)**.

Mohler J, Fantin B, Mainardi J L, Carbon C. Influence of antimicrobial therapy on kinetics of tumour necrosis factor level in experimental endocarditis caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; **38**: 1017-1022.

Mozaffarian N, Berman J W and Casadevall A. Enhancement of nitric oxide synthesis by macrophages represents an additional mechanism of action for amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; **41**: 1825-1829.

Muniz-Junqueira M I, Peçanha L M F, Silva-Filho V L, Cardoso M C A, Tosta C E. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes. *Clin Diag Lab Immuno* 2003; **10**: 1096-1102;

Murray B E. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol Rev.* 1990; **3**:46-65.

Murray HW. Interferon-gamma, the activated macrophage and host defense against microbial challenge. *Ann Inter Med.* 1988; **108**: 595-608.

Murray H W. Treatment of visceral leishmaniasis (Kala-azar): A decade of progress and future approaches. *Int. J Infect Dis.* 2000; **4**: 158-177.

Nosanchuk J D, Cleare W, Franzot S P, Casadevall A. Amphotericin B and fluconazole affect cellular charge, macrophage phagocytosis, and cellular morphology of *Cryptococcus neoformans* at subinhibitory concentrations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; **43**: 233-239.

Nydegger E U, Anner R N, Gerebtzoff A, Lambert P H, Miescher P A. Polymorphonuclear stimulation by immune complexes. Assessment by nitroblue tetrazolium dye reduction. *Eur. J Immunol.* 1973; **3**: 465-470.

Olds G R, Stewart S J and Ellner J J. Amphotericin- B induced resistance to *Schistosoma mansoni*. *J Immunol.* 1981; **126**: 1667-1670.

Onyeji C O, Nightingale C H, Marangos M N. Enhanced killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human macrophages by liposome-entrapped vancomycin and teicoplanin. *Infection* 1994; **22**: 338-342

Oostling R S, van Bre L, van Iwaarden J F, van Golde L M G and Verhoef J. Impairment of phagocytic functions of alveolar macrophages by hydrogen peroxide. *Am J Physiol*. 1990; **259**: L87-L94.

Pearson R D, Harcus J L, Roberts D, Donowitz G R. Differential survival of *Lishmania donovani* amastigotes in human monocytes. *J Immunol* 1983; **131**: 1994-1999.

Pedreira M I, Perez F, Rodrigues A B, Barriga C. Stimulation of phagocytosis against *Staphylococcus aureus* by teicoplanin and vancomycin. *Rev Esp Fisiol*. 1993; **49**: 231-234.

Peiser L, Gordon S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microb Infect* 2001; **3**: 149-159.

Peiser L, Mukhopadhyay S. and Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002; **14**: 123-128.

Perfect J R, Granger D L & Durack D T. Effects of antifungal agents and gamma interferon on macrophage cytotoxicity for fungi and tumor cells. *J Infect Dis*. 1987; **156**: 316-23.

Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig T, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi P, Kronke M and Mak T. Mice deficient for the 55kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 1993; **73**: 457-467.

Raponi G, Ghezzi M C, Mancini C & Filadoro F. Preincubation of *Candida albicans* strains with amphotericin B reduces tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 release by human monocytes. *Antimicrob Agents Chemother.*1993; **37**: 1958-61.

Raponi G, Keller N, Overbeek B P, Rozenberg-Arska M, van Kessel K P M & Verhoef J. Enhanced phagocytosis of encapsulated *Escherichia coli* strains after exposure to sub-MICs of antibiotics is correlated to changes of the bacterial cell surface. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; **34**: 332-6.

Richardson, M. D, Kokki M H. Diagnosis and prevention of fungal infection in the immunocompromized patient. *Blood Rev.* 1998-a; **12**:241-54.

Richardson, M.D., Kokki M H. Antifungal therapy in 'bone marrow failure.' *Br J Haematol* 1996; **100**:619-28

Rogers P D, Jenkins J K, Chapman S W, Ndebele K, Chapman B A and Cleary J D. Amphotericin B activation of human genes encoding for cytokines. *J Infect Dis.* 1998; **178**: 1726-1733.

Rogers PD, Kramer, RE Chapman SW & Cleary JD. Amphotericin B-induced interleukin-1 expression in human monocytic cells is calcium and calmodulin dependent. *J Infect Dis* 1999; **180**: 1259-1266.

Rogers PD, Stiles JK, Chapman SW & Cleary JD. Amphotericin b induces expression of genes encoding chemokines and cell adhesion molecules in the human monocytic cell line THP-1. *J Infect Dis* 2000; **182**: 1280-1283.

Segarra-Newnham M, Tagoff SS. Probable vancomycin-induced neutropenia. *Ann Pharmacother*. 2004; **38**: 1855-1859.

Sheagren JN. Staphylococcal infections. Em: Wyngaarden JB e Smith LH (Editores) Cecil Textbook of Medicine, Saunders, Philadelphia, 1988; 18ª edição, 1596-1604.

Siedlar M, Szczepanik A, Wieckiewicz J, Pituch-Noworolska A and Zembala M. Vancomycin down-regulates lipopolysaccharide-induced tumour factor alpha (TNF α) production and TNF α -mRNA accumulation in human blood monocytes. *Immunopharmacology* . 1997; **35**:265-275.

Smith J W. Synergism of amphotericin B with other antimicrobial agents. *Ann Inter Med*. 1973; **78(3)**:450.

Sokol-Anderson M L., Brajtberg J and Medoff G. Amphotericin-B induced oxidative damage and killing of *C. Albicans*. *J Infect Dis*. 1986; **154**: 76-83.

Sorrell T C, Packham D R, Shanker S. Foldes M. Munro R. Vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med*. 1982; **97**: 344-50.

Spera R V e Farber B F. Multiplay resistant *Enterococcus faecium*: The nosocomial pathogen of the 1990s. *J. Am. Med. Association* -1992; **268**:2563-4.

Stahl PD, Ezekowitz AB. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol* 1998; **10**: 50-55.

Tavares, W. Antimicobianos e o mecanismo imune de defesa. Em Tavares W. (editor) 2001. Manual de antibióticos e quimioterápicos antinfeciosos. 3ªed, 181-190

Thakur C P, Narain S, Kumar N, Hassan S M, Jha D K and Kumar A. Amphotericin-B is superior to sodium antimony gluconate in the treatment of Indian post-Kala-azar dermal leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*. 1997; **91**: 611-61

Thomas C A, Li Y, Kodama T, Suzuki H, Silverstein S C, Khoury J E. Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *J Exp Med*. 2000; **191**:147-155.

Thomas M Z, Medoff G and Kobayashi G S. Changes in murine resistance to *Listeria monocytogenes* infection induced by amphotericin B. *J Infect Dis.* 1973; **127**: 373-377.

Tohyama M, Kawakami K and Saito A. Anticryptococcal effect of amphotericin B is mediated through macrophage production of nitric oxide. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; **40**: 1919-1923.

Tokuda Y, Tsuji M, Yamazaki M, Kimura S, Abe S & Yamaguchi H. Augmentation of murine tumour necrosis factor production by amphotericin B *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; **37**: 2228-30.

Tracey K, Lowry S and Cerami A. Cachectin: a hormone that triggers acute shock and chronic cachexia. *J Infect Dis.* 1988; **157**: 413-420.

Underhill D M, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Ann Rev Immunol* 2002; **20**: 825-852.

Vadaux P, Grau G, Huggler E, Schumacher-Perdreau F, Fiedler F, Waldvogel F and Lew D. Contribution of tumor necrosis factor to host defense against staphylococci in a guinea pig model of foreign body infections. *J Infect Dis.* 1992; **166**: 58-64.

Van Vlem B, Vanholder R, De Paepe P, Vogelaers D, Ringoir S. Immunomodulating effects of antibiotics: literature review. *Infection* 1996; **24**: 275-201.

Viladrich P F, Gudiol F, Liñares J et al. Evaluation of vancomycin for therapy of adult pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; **35**: 2467-72.

Vonk A G, Netea M G, Denecker N E, Verschueren I C, van der Meer J W and Kullberg B J. Modulation of the pro and anti-inflammatory cytokine balance by amphotericin B. *J Antimicrob Chemother.* 1998; **42**: 469-474.

Williams P. Sub-MICs of cefuroxime and ciprofloxacin influence interaction of complement and immunoglobulins with *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987; **31**: 758-62.

Wilson E L, Thorson and Speert D P. Enhancement of macrophage superoxide anion production by amphotericin B. 1991; *Antimicrob Agents Chemother.* **35**:796-800.

Wolf, J.E. and Massof S E. In vivo activation of macrophage oxidative burst activity by cytokine and amphotericin B. *Infect Immun.* 1990, **58**: 1296-1300.

Wu Q, Wang Q, Taylor K G & Doyle R J. Subinhibitory concentrations of antibiotics affect cell surface properties of *Streptococcus sobrinus*. *Journal of Bacteriology* 1995; **177**: 1399-401.

ANEXOS

ANEXO 1

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA / FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA CELULAR

PROJETO DE PESQUISA

Influência da vancomicina e da anfotericina B sobre a função fagocitária, produção de radicais livres e citocinas por monócitos e neutrófilos do sangue periférico de indivíduos normais

RESPONSÁVEIS

Prof^a. Dr^a. Maria Imaculada Muniz Barbosa Junqueira,
Dr. Orlando Magno Fernandes Carvalho Pinto

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,.....,anos, abaixo assinado, declaro ter lido ou ouvido o presente documento, e compreendido o seu significado, que informa o seguinte:

1. Estou participando de minha livre vontade, de uma pesquisa que usa células do meu sangue para estudar como elas reagem ao tratamento com dois remédios muito importantes para tratar infecções em pacientes muito doentes, chamadas vancomicina e anfotericina-B.
2. Fui esclarecido(a) que eu não tomarei tais remédios e que as células do meu sangue serão tratadas apenas em um tubo com estes remédios.
3. Concordo que seja retirado de 5 a 10ml de sangue de uma veia de meu braço, utilizando material estéril e descartável, para obtenção das células que serão estudadas.
4. Posteriormente, se eu desejar, poderei ser informado(a) sobre o resultado do exame que foi feito no meu sangue.
5. Fui esclarecido que o meu nome não será divulgado.

Brasília,.....de.....de.....

Nome

Assinatura, voluntário.

.....

Pesquisador

.....

Testemunha

Com cópia para o voluntário

ANEXO 2

FICHA CLÍNICA DOS INDIVÍDUOS SELECIONADOS PARA A PESQUISA

(Influência da vancomicina e da anfotericina B sobre a função fagocitária, produção de radicais livres e citocinas por monócitos e neutrófilos do sangue periférico de indivíduos normais) :

NOME: _____

SEXO : Masc. Fem. (anticoncepcional: sim não)

IDADE:_____

RAÇA: Branca Negra Parda Outras

NATURAL: _____ PROCEDÊNCIA:_____

ALTURA: _____m.

PÊSO: _____kg.

IMC (Índice de massa corporal): **peso (kg) / (altura em metros) ao quadrado**

- **GRAU 0 : < 25**
- **GRAU 1 : 25 – 29,9**
- **GRAU 2 : 30 – 40**
- **GRAU 3 : > 40**

EXAME FÍSICO:

ANEXO 3

Processo n.º
Fls. n.º
Rubrica



Universidade de Brasília – Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-FM/UnB
Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-900 – Brasília, DF
Telefone: (61) 307-2520

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do projeto: CEP-FM 046/2005

Título: "Influência da vancomicina e da anfotericina B sobre a função fagocitária, produção de radicais livres e citocinas por monócitos e neutrófilos do sangue periférico de indivíduos normais"

Pesquisador responsável: Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo(s) do pesquisador(es)

Data de entrada: 15/06/2005

Proposição do(a) Relator(a):

- Aprovação**
 Aprovação com pendências
 Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: 29/06/2005

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: 07/07/2005

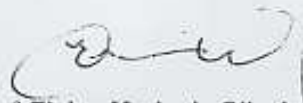
PARECER

Com base na Resolução CNS/MS n.º 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, a Coordenação do CEP-FM decidiu **APROVAR "ad referendum"**, de acordo com o parecer do(a) Relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

Observação:

- 1 - Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves.
- 2 - O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília-DF, 19 de julho de 2005.


Dr.ª Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do CEP-FM/UnB

ANEXO 4

TABELA 1

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B desoxicolato sobre a capacidade fagocitária, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação), na presença de soro fetal bovino.

Índice fagocitário			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	30	17
Anfotericina	20	18	13

P=0,042, teste t pareado

TABELA 2

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B desoxicolato sobre a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose para *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação), na presença de soro fetal bovino.

Proporção			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	14	8,0
Anfotericina	20	6,0	4,0

P=0,0002, teste t pareado

TABELA 3

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B desoxicolato sobre a média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação), na presença de soro fetal bovino.

Média de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ingeridas/ aderidas			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	1,71	0,7
Anfotericina	20	1,6	0,8

P=0,319, teste t pareado

TABELA 4

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com vancomicina sobre a capacidade fagocitária para *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação), na presença de soro fetal bovino.

Índice fagocitário			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	27	18
Vancomicina	20	18	16

P=0,155, teste t pareado

TABELA 5

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com vancomicina sobre a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose para *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação), na presença de soro fetal bovino.

Proporção			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	14	8,0
Vancomicina	20	9,0	6,0

P=0,119, teste t pareado

TABELA 6

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com vancomicina sobre a média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10$ por escavação), na presença de soro fetal bovino.

Média de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ingeridas/ aderidas			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	1,8	0,5
Vancomicina	20	1,8	0,6

P=0,736, teste t pareado

TABELA 7

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B e vancomicina sobre a capacidade fagocitária para *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação), na presença de soro fetal bovino.

Índice fagocitário			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	27	18
Anfo + Vanco	20	16	13

P=0,0514, teste t pareado

TABELA 8

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B e vancomicina sobre a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose para *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação) na presença de soro fetal bovino.

Proporção			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	14	8,0
Anfo + Vanco	20	8,0	6,0

P=0,038, teste t pareado

TABELA 9

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B e vancomicina sobre a média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação), na presença de soro fetal bovino.

Média de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ingeridas/ aderidas			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	1,8	0,6
Anfo + Vanco	20	2,0	0,7

P=0,416, teste t pareado

TABELA 10

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B sobre a capacidade fagocitária para *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação), na presença de soro humano.

Índice fagocitário			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	300	111
Anfo + Vanco	20	256	85

P=0,0195, teste t pareado

TABELA 11

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B sobre a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose para *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação), na presença de soro humano.

Proporção			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	87	12,9
Anfo + Vanco	20	88	11

P=0,686, teste t pareado

TABELA 12

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B sobre a média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação), na presença de soro humano.

Média de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ingeridas/ aderidas			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	3,3	0,9
Anfo + Vanco	20	2,9	0,8

P=0,024, teste t pareado

TABELA 13

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com vancomicina sobre a capacidade fagocitária para *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação), na presença de soro humano.

Índice fagocitário			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	324	90
Vancomicina	20	251	81

P = 0,044, teste t pareado

TABELA 14

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com vancomicina sobre a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose para *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação), na presença de soro humano.

Proporção			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	87	13
Vancomicina	20	86	15

P = 0,7271, teste t pareado

TABELA 15

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com vancomicina sobre a média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação), na presença de soro humano.

Média de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ingeridas/ aderidas			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	3,5	0,7
Vancomicina	20	2,9	0,8

P = 0,095, teste t pareado

TABELA 16

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B e vancomicina sobre a capacidade fagocitária para *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação), na presença de soro humano.

Índice fagocitário			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	324	90
Anfo+Vanco	20	279	96

P = 0,146, teste t pareado

TABELA 17

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B e vancomicina sobre a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose para *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação), na presença de soro humano.

Proporção			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	87	13
Anfo+Vanco	20	89	10

P = 0,143, teste t pareado

TABELA 18

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B e vancomicina sobre a média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação), na presença de soro humano.

Média de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ingeridas/ aderidas			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	3,5	0,7
Anfo+Vanco	20	3,0	0,8

P = 0,0673, teste t pareado

TABELA 19

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B, vancomicina e ambas sobre a capacidade fagocitária por neutrófilo em testes não sensibilizados utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação).

Índice fagocitário basal			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	26	19
Anfotericina-b	20	22	28
Vancomicina	20	31	46
Anfo+vanco	20	25	30

$p= 0,8587$, teste t pareado

TABELA 20

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B, vancomicina e ambas sobre o índice fagocitário por neutrófilo em testes sensibilizados utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação).

Índice fagocitário estimulado			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	301	111
Anfotericina-b	20	268	97
Vancomicina	20	273	102
Anfo+vanco	20	279	96

$P= 0,7477$, teste t pareado

TABELA 21

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B, vancomicina e ambas sobre a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose em testes não sensibilizados, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação).

Proporção de neutrófilos da fagocitose basal			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	13	8,5
Anfotericina-b	20	11	12
Vancomicina	20	13	15
Anfo+vanco	20	12	13

P= 0,9498, teste t pareado.

TABELA 22

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B, vancomicina e ambas sobre a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose em testes sensibilizados utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação).

Proporção de neutrófilos da fagocitose estimulada			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	87	12
Anfotericina-b	20	88	11
Vancomicina	20	86	15
Anfo+vanco	20	90	10

P= 0,8878, teste t pareado.

TABELA 23

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B, vancomicina e ambas sobre a média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilos envolvidos na fagocitose em testes não sensibilizados, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação).

Média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilos			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	1,7	0,7
Anfotericina	20	1,5	0,8
Vancomicina	20	1,8	0,8
Anfo+vanco	20	1,8	0,8

$p = 0,5481$, teste t pareado.

TABELA 24

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com anfotericina-B, vancomicina e ambas sobre a média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilos envolvidos na fagocitose em testes sensibilizados, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ($2,5 \times 10^5$ por escavação).

Média de leveduras ingeridas/ aderidas por neutrófilos			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	3,2	0,9
Anfotericina	20	2,9	0,8
Vancomicina	20	3,0	1,0
Anfo+vanco	20	3,0	0,8

$P = 0,5867$, teste t pareado.

TABELA 25

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com anfotericina-B sobre redução do NBT basal.

Porcentagem de redução do NBT basal			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	94	09
Anfotericina	20	92	12

P = 0,2157, teste t pareado.

TABELA 26

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com vancomicina sobre redução do NBT basal.

Porcentagem de redução do NBT basal			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	94	9,0
Vancomicina	20	93	9,3

P = 0,4397, teste t pareado.

TABELA 27

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com anfotericina-B e vancomicina sobre redução do NBT basal.

Porcentagem de redução do NBT basal			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	94	9,0
Anfo+Vanco	20	90	13

P = 0,1828, teste t pareado.

TABELA 28

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos estimulados de indivíduos normais com anfotericina-b sobre redução do NBT.

Porcentagem de redução do NBT estimulado				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	100	98 - 100	72,5 - 100
Anfotericina	20	99,25	95,25- 100	55,5 - 100

P = 0,0059, teste Wilcoxon.

TABELA 29

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos estimulados de indivíduos normais com vancomicina sobre redução do NBT.

Porcentagem de redução do NBT estimulado				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	100	98 - 100	72,5 - 100
Vancomicina	20	100	97 - 100	50 - 100

P = 0,4258, teste Wilcoxon.

TABELA 30

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos estimulados de indivíduos normais com anfotericina-b e vancomicina sobre redução do NBT.

Porcentagem de redução do NBT estimulado				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	100	98 - 100	72,5 - 100
Anfo+Vanco	20	100	96,5 - 100	70,5 - 100

P = 0,4961, teste Wilcoxon.

TABELA 31

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com anfotericina-B, vancomicina e ambas sobre a redução do NBT basal.

Porcentagem de redução do NBT basal				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	97,2	93 – 100	63 – 100
Anfotericina-b	20	98,2	90,7 – 100	49- 100
Vancomicina	20	95	90,5 - 100	61 - 100
Anfo+vanco	20	96,7	87,7 – 100	51,5 - 100

P= 0,7533, teste ANOVA

TABELA 32

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos estimulados de indivíduos normais com anfotericina-B, vancomicina e ambas sobre a redução do NBT.

Porcentagem de redução do NBT estimulado				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	100	98 – 100	72,5 – 100
Anfotericina-b	20	99,25	95,2 – 100	55,5 - 100
Vancomicina	20	100	97 - 100	50 - 100
Anfo+vanco	20	100	96,5 – 100	70,5 - 100

P= 0,8547, teste Kruskal-Wallis

TABELA 33

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com anfotericina-B sobre a redução forte do NBT basal.

Porcentagem de redução forte do NBT basal				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	3,25	0,25 – 8,0	0 - 40
Anfotericina	20	2,0	0,25 – 6,75	0 - 43

P = 0,6661, teste Wilcoxon.

TABELA 34

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com vancomicina sobre a redução forte do NBT basal.

Porcentagem de redução forte do NBT basal				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	3,25	0,25 – 8,0	0 - 40
Vancomicina	20	2,75	0 – 13,25	0 - 44

P = 0,7197, teste Wilcoxon .

TABELA 35

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com anfotericina-B e vancomicina sobre a redução forte do NBT basal.

Porcentagem de redução forte do NBT basal				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	3,25	0,25 – 8,0	0 – 40
Anfo+Vanco	20	1,75	0,25 - 12	0 – 49,5

P = 0,4850, teste Wilcoxon.

TABELA 36

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com anfotericina-B sobre a redução intermediária do NBT basal.

Porcentagem de redução intermediária do NBT basal			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	77,2	21,75
Anfotericina	20	80	20,40

P = 0,2739, teste t pareado

TABELA 37

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com vancomicina sobre a redução intermediária do NBT basal.

Porcentagem de redução intermediária do NBT basal			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	77,2	21,75
Vancomicina	20	76,5	20,8

P = 0,7038, teste t pareado

TABELA 38

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com anfotericina-B e vancomicina sobre a redução intermediária do NBT basal.

Porcentagem de redução intermediária do NBT basal			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	77	21,7
Anfo+Vanco	20	75,3	22,7

P = 0,7245, teste t pareado

TABELA 39

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com anfotericina-B sobre a redução fraca do NBT basal.

Porcentagem de redução fraca do NBT basal			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	9,6	14,5
Anfotericina	20	6,6	10,1

P = 0,0542, teste t pareado

TABELA 40

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com vancomicina sobre a redução fraca do NBT basal.

Porcentagem de redução fraca do NBT basal			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	9,6	14,5
Vancomicina	20	8,1	12,1

P = 0,3284, teste t pareado.

TABELA 41

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com anfotericina-B e vancomicina sobre a redução fraca do NBT basal.

Porcentagem de redução fraca do NBT basal				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	4,5	1 – 10,5	0 – 55,5
Anfo+Vanco	20	1,25	0 - 8	0 – 30

P = 0,0137, teste Wilcoxon.

TABELA 42

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos estimulados de indivíduos normais com anfotericina-B sobre a redução forte do NBT.

Porcentagem de redução forte do NBT estimulado			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	20	22,7
Anfotericina	20	16	19,8

P = 0,079, teste t pareado.

TABELA 43

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos estimulados de indivíduos normais com vancomicina sobre a redução forte do NBT.

Porcentagem de redução forte do NBT estimulado			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	20	22,7
Vancomicina	20	17	20,8

P = 0,2470, teste t pareado.

TABELA 44

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos estimulados de indivíduos normais com anfotericina-B e vancomicina sobre a redução forte do NBT.

Porcentagem de redução forte do NBT estimulado			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	20	22,7
Anfo+Vanco	20	21,1	25,6

P = 0,7434, teste t pareado.

TABELA 45

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos estimulados de indivíduos normais com anfotericina-B sobre a redução intermediária do NBT.

Porcentagem de redução intermediária do NBT estimulado			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	67	22,4
Anfotericina	20	68,7	23,9

P = 0,5084, teste t pareado.

TABELA 46

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos estimulados de indivíduos normais com vancomicina sobre a redução intermediária do NBT.

Porcentagem de redução intermediária do NBT estimulado			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	67	22,4
Vancomicina	20	67,8	26,6

P = 0,7999, teste t pareado.

TABELA 47

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos estimulados de indivíduos normais com anfotericina-B e vancomicina, sobre a redução intermediária do NBT.

Porcentagem de redução intermediária do NBT estimulado			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	67	22,4
Anfo+Vanco	20	64,8	27,8

P = 0,5823, teste t pareado.

TABELA 48

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos estimulados de indivíduos normais com anfotericina-B sobre a redução fraca do NBT.

Porcentagem de redução fraca do NBT estimulado			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	11	15,6
Anfotericina	20	7,5	12,7

P = 0,3864, teste t pareado.

TABELA 49

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos estimulados de indivíduos normais com vancomicina sobre a redução fraca do NBT.

Porcentagem de redução fraca do NBT estimulado			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	11	15,6
Vancomicina	20	11,8	18,3

P = 0,7529, teste t pareado.

TABELA 50

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos estimulados de indivíduos normais com anfotericina-B e vancomicina sobre a redução fraca do NBT.

Porcentagem de redução fraca do NBT estimulado				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	4,5	1,2 – 14,7	0 – 58
Anfo+Vanco	20	3,5	0,5 – 5,2	0 – 46,5

P = 0,0764, teste Wilcoxon.

TABELA 51

Influência do tratamento in vitro de células mononucleares de 8 indivíduos normais com anfotericina-B sobre a produção basal de fator de necrose tumoral- α .

FNT- α			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	269	276,8
Anfotericina	20	394	417,8

P = 0,0705, teste t pareado.

TABELA 52

Influência do tratamento in vitro de células mononucleares de 8 indivíduos normais com vancomicina sobre a sobre a produção basal de fator de necrose tumoral- α .

FNT- α			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	269	276,8
Vancomicina	20	315	296

P = 0,2128, teste t pareado.

TABELA 53

Influência do tratamento in vitro de células mononucleares de 8 indivíduos normais com anfotericina-b e vancomicina sobre a sobre a produção basal de fator de necrose tumoral- α .

FNT- α			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	269	276,8
Anfo+Vanco	20	314,3	292

P = 0,3269, teste t pareado.

TABELA 54

Influência do tratamento in vitro de células mononucleares de 8 indivíduos normais com anfotericina-B sobre a produção de fator de necrose tumoral- α , estimulado com LPS.

FNT- α			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	350	293
Anfotericina	20	379	368

P = 0,5708, teste t pareado.

TABELA 55

Influência do tratamento in vitro de células mononucleares de 8 indivíduos normais com vancomicina sobre a sobre a produção de fator de necrose tumoral- α , estimulado com LPS.

FNT- α			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	350	293
Vancomicina	20	321	316

P = 0,8363, teste t pareado.

TABELA 56

Influência do tratamento in vitro de células mononucleares de 8 indivíduos normais com anfotericina-B e vancomicina sobre a sobre a produção de fator de necrose tumoral- α , estimulado com LPS.

FNT- α			
Grupos	n	média	desvio padrão
Controle	20	350	293
Anfo+Vanco	20	412	369

P = 0,0593, teste t pareado.