

EFEITOS "IN VITRO" DE UM POLÍMERO AGREGADO OBTIDO DE *Aspergillus oryzae* SOBRE AS CAPACIDADES FUNCIONAIS DE CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES NORMAIS HUMANAS**EFFECTS "IN VITRO" OF AN AGGREGATED POLYMER OBTAINED FROM *Aspergillus oryzae* ON THE FUNCTIONAL CAPABILITIES OF HUMAN POLYMORPHONUCLEAR NORMAL CELLS****André Luiz MELO¹, Adriana de MELO²**

1.Engenheiro Agrônomo/Discente de Medicina Veterinária; Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal (UNIPINHAL) – Brasil; E-mail: andre.agronomo@hotmail.com

2.Doutora em Farmacologia; Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Brasil; E-mail: koymelo@yahoo.com.br

RESUMO

Os efeitos do fosfolinoleato-palmitoleato de magnésio e amônio anidrido (MAPA), um polímero agregado protéico isolado de *Aspergillus oryzae*, na fagocitose e morte intracelular de *Candida albicans* e *Candida kefir*, quimiotaxia de neutrófilos e redução de nitroblue-tetrazolium foram estudados em 6 doadores voluntários saudáveis. A fagocitose e a morte intracelular de *Candida albicans* e *Candida kefir* aumentaram significativamente com MAPA. Também observamos um aumento significativo da redução de nitroblue-tetrazolium e quimiotaxia de neutrófilos. Podemos inferir que o efeito do MAPA sobre os neutrófilos pode estar relacionado a um possível mecanismo de regulação das funções nessas células. Estes dados, considerados em conjunto, sugerem que o composto MAPA aumenta a fagocitose induzida por antígeno e a quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares "in vitro". No entanto, é esperado o aumento dessas células no local da infecção após a administração "in vivo" de P-MAPA, mediando a destruição ou inibição do crescimento microbiano.

Palavras-chave: P-MAPA, Atividade Lítica, Quimiotaxia de Neutrófilos, NBT (nitroblue-tetrazolium).

ABSTRACT

The effects of magnesium ammonium phospholinoleate-palmitoleate anhydride (MAPA), a proteic aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*, on the phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* and *Candida kefir*, neutrophil chemotaxis and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils from 6 healthy individuals were studied. Phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* and *Candida kefir* were significantly increased with MAPA. We also observed a significant increase of nitroblue-tetrazolium reduction and neutrophil chemotaxis. We propose that the effect of MAPA on the neutrophils may be related to a possible mechanism for regulation functions in these cells. These data taken together suggest that MAPA compound enhances antigen-induced phagocytosis and chemotaxis of polymorphonuclear leukocyte "in vitro." However, the increase in these cells at the infection site after administration "in vivo" of P-MAPA is expected, mediating destruction or inhibition growth's microbial.

Keywords: MAPA, Lytic function, Phagocytosis, Neutrophil chemotaxis, NBT (nitroblue-tetrazolium).

Recebimento dos originais: 12/02/2021

Aceitação para publicação: 24/02/2021

INTRODUÇÃO

O composto extracelular purificado isolado de *Aspergillus oryzae*, chamado P-MAPA, foi caracterizado como uma forma polimérica agregada de proteína, magnésio, amônio, fosfolinoleato-palmitoleato anidra (PM=316 kDa), tendo atividade antitumoral "in vivo" significativa e nenhuma toxicidade (DURÁN et al., 2009; JUSTO; DURÁN; QUEIROZ, 2003). P-MAPA administrado a camundongos e ratos transplantados com plasmacitoma (SP-2/0/Ag14), tumor Walker 256 e carcinoma mamário espontâneo (SP-1) mediaram efeitos significativos que poderiam ser atribuídos à sua capacidade de aumentar a defesa do hospedeiro, sem afetar diretamente as células tumorais (DURAN; DA-SILVA-NUNES, 1990; JUSTO; DURÁN; QUEIROZ, 2000). Estudos subsequentes do nosso laboratório mostraram que esse composto melhorou a sobrevivência de camundongos portadores de EAT (Tumor ascítico de Ehrlich) e reduziu simultaneamente o crescimento tumoral na cavidade peritoneal (DURAN; DA SILVA NUNES, 1990; JUSTO; DURÁN; QUEIROZ, 2000).

Além disso, a avaliação da hematopoiese na medula óssea e no baço de camundongos normais e portadores de EAT revelou que o efeito modulatório do P-MAPA na resposta mielopoética pode estar parcialmente relacionado às suas atividades antitumorais como um possível mecanismo de regulação da produção de granulócito-macrófago e expressão das atividades funcionais (JUSTO; DURÁN; QUEIROZ, 2000). Resultados semelhantes foram obtidos em nosso laboratório, em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* e tratados com P-MAPA, em que a recuperação da mielopoiese da medula óssea parece mediar a resistência à *Listeria* através da rápida restauração do número de fagócitos em locais infectados, migrando, assim, para o curso da infecção (DE SOUZA QUEIROZ, 2001; JUSTO; DURÁN; QUEIROZ, 2000).

Nesse sentido, é bem reconhecido que granulócitos e macrófagos são vitais para a defesa contra microrganismos invasores. Notavelmente, os neutrófilos têm uma ampla gama de atributos físicos e bioquímicos que os distinguem de outras células. A maioria dessas vias são adaptadas com um propósito principal: ingerir e destruir patógenos invasores (LOPEZ CUENCA SONIA, 2006; RUEDA, 2015; WARDOWSKA et al., 2006).

Os neutrófilos, também chamados de leucócitos polimorfonucleares, respondem rapidamente aos estímulos quimiotáticos, iniciando a fagocitose e destruição das partículas estranhas imediatamente. Os neutrófilos podem ser ativados igualmente pelas citocinas produzidas pelos macrófagos e pelas células endoteliais, formando a principal população celular envolvida com a resposta inflamatória acentuada. Além disso, possuem também receptores para anticorpos do tipo IgG (Imunoglobulina G) e proteínas do complemento, migrando para as áreas de ativação do complemento do sistema. Dessa forma, as partículas fagocíticas opsonizadas, trabalham como células ativas da imunidade humoral. Essas células estão constantemente sendo estimuladas por citocinas produzidas pelas células T e partículas opsonizadas durante a fagocitose, contribuindo com funções ativas na resposta imune específica (BORREGAARD, 2010; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; NG; OSTUNI; HIDALGO, 2019).

Nesse sentido, foi investigado se o P-MAPA pode influenciar quimiotaxia "in vitro", capacidades fagocíticas e bactericidas de leucócitos polimorfonucleares normais isolados de 6 indivíduos.

METODOLOGIA

Amostras de sangue

Amostras de sangue venoso de doadores voluntários saudáveis foram coletadas em “vacutainers” da Universidade Estadual de Campinas, banco de sangue Campinas (Hemocentro, Universidade Estadual de Campinas- Campinas, Brazil).

Preparação de células de levedura

Candida albicans e *Candida kefir* (Fundação Tropical André Tozelo) foram cultivadas por 8h a 37°C em Sabouraud glucose-ágar (Biobrás cod:107-3) e foram colhidas, lavadas na solução de sal balanceada de Hanks (HBSS) e contadas. Para opsonizar as células de levedura, 100 µL de agrupamento não inativa no soro AB humano normal foi adicionado a 5 x 10⁶ células de levedura. Após 30 min, o meio TC 199 (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) foi adicionado para dar uma concentração final de 5 x 10⁶ células/mL.

Preparação de P-MAPA

Uma solução de estoque da P-MAPA foi elaborada em HBSS-0,1% DMSO a 0,5 mg/kg e armazenada a 4°C. Foram feitas diluições desejadas para estoques P-MAPA com meio TC 199.

Isolamento das células polimorfonucleares e estudo de suas funções fagocíticas e líticas

O sangue obtido pela venipuntura foi imediatamente colocado em um escorregador de vidro limpo, das quais as bordas foram seladas. Nenhum anticoagulante foi usado. Após 2h de incubação em uma câmara úmida a 37°C, o coágulo sanguíneo foi removido, e a lâmina foi lavada com meio TC 199. As células polimorfonucleares (PMN) aderindo às lâminas de vidro foram incubadas por 30 min a 37°C com 1 mL de 25, 50 ou 75 µg/mL de P-MAPA. Após o tempo de incubação, as células PMN foram então incubadas com 1 mL da suspensão de 5 x 10⁶ células/mL de células de levedura opsonizadas. Após a incubação de 30 minutos, as células de levedura restantes em suspensão foram removidas lavando suavemente as lâminas três vezes com meio TC 199. As lâminas foram, então, secas ao ar e coradas com Giemsa antes de avaliar a fagocitose de *Candida albicans* e *Candia kefir* e lise pelas células aderentes. As células de levedura vivas foram distinguidas das células mortas de levedura por sua coloração azul com Giemsa, enquanto as últimas células permaneceram não coradas e apareceram como imagens "fantasma" dentro do fagocite. A atividade fagocítica foi expressa como o número de antígenos fagocitados por 100 células PMN. A atividade lítica foi expressa como a porcentagem de imagens "fantasmas" (células mortas de levedura) do número total de células das *Candidas* fagocitadas.

Redução denitroblue -tetrazolium por neutrófilos

Um teste de tetrazolium nitroazium estimulado modificado foi realizado como descrito anteriormente (CLARK; NAUSEEF, 1996; GÓMEZ-OCHOA et al., 2010; HYUNG et al., 2006; PARQUE; FIKRIG; SMITHWICK, 1968; RAO, 1973). Resumidamente, 0,1 mL de sangue periférico coletado em EDTA foi incubado por 15 ou 30 min a 37°C em um micro slide côncavo com 25, 50 ou 75 µg/mL de P-MAPA. Após a incubação, foi misturado com um volume igual de solução de tetrazolium nitroblue (Sigma, 0,1% tetrazolium nitroblue na PBS) mais 0,05 mL de solução de endotoxina (1 mg/mL de

lipopolissacarídeo B da *Escherichia coli* 0127:B8-Sigma na PBS). Esta mistura foi incubada a 37°C por 15 min e depois centrifugada a 1500 rpm por 10 min e o sobrenadante descartado. As células foram suavemente ressuspensas em um pequeno volume de soro fetal bovino e a coloração feita com cuidado especial para evitar danos às células brancas. As manchas eram de secas ao ar e coradas com Leishman. Utilizando a objetiva de imersão em óleo 100x, 100 neutrófilos foram contados, e apenas aqueles com grandes depósitos azuis no citoplasma foram pontuados como positivos.

Isolamento de Leucócitos e Quimiotaxis Neutrófilos

A partir de 5 mL de sangue venoso coletado em heparina de 20 U/mL, separou-se cerca de 0,8 mL de plasma após centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O sedimento celular foi ressuspenso em meio TC 199, com 1 mL de 6% de dextran (peso molecular 153.000 Sigma), e incubado a 37°C por 25 min. O sobrenadante rico em leucócitos foi, então, coletado e lavado três vezes com meio TC 199. As células foram ressuspensas em 1 mL de meio TC 199, e a concentração final ajustada para 2×10^6 células/mL.

Quimiotaxia de Neutrófilos

A quimiotaxia de neutrófilos foi medida pelo método líder em câmaras de migração modificadas de Boyden usando membranas millipore com diâmetro de poros de 3 μm . O fator quimiotático foi preparado adicionando 0,1 mL de solução de endotoxina (2,5 mg/ml de lipopólissacarídeo B da *Escherichia coli* 0127:B8-Sigma) em soro fisiológico tamponado (pH 7,5) com 0,5 mL de plasma autólogo e 4,4 mL de meio TC 199. Para avaliar a migração não estimulada, o fator quimiotático foi substituído pelo meio TC 199. As câmaras foram mantidas a 37°C em 30 minutos em uma atmosfera úmida, e as membranas então lavadas, coradas com hematoxilina de Harry, limpas em álcool isopropílico e xilol, e montadas com bálsamo do Canadá. Para medir as distâncias migradas por polimorfos, a membrana foi examinada em um microscópio equipado com micrômetro no ajuste fino. Usando a objetiva de imersão na ampliação de 100x, focamos na parte superior da membrana e, em seguida, desfocou-se a membrana até que apenas três células estivessem à vista. Os valores relatados são a média de cinco campos diferentes. Os resultados foram expressos como a diferença entre a migração de neutrófilos com e sem endotoxina. O composto P-MAPA foi acrescido à câmara em 25, 50, ou 75 μL .

Análise Estatística

Todos os dados representam desvio padrão médio \pm (SD) de seis experimentos executados em quadruplicata. As comparações de dados entre todos os grupos foram realizadas por análise de variância seguida do teste de Tukey. Todos os valores *P* representam o teste de significância estatística. A significância estatística foi atribuída quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito do MAPA sobre a fagocitose e a morte intracelular de *C. albicans* e *C. kefyr* por neutrófilos é apresentado em Fig. 1-4. Os resultados demonstram que o P-MAPA incubado com PMN mais *C. albicans* aumentou significativamente ($P < 0,05$) suas atividades fagocíticas e líticas de forma dose-dependente quando comparadas às do controle PMN (Fig. 1 e 2). Quando *C. kefyr* foi usado

como antígeno, essas duas funções de neutrófilo foram aumentadas ($P < 0,05$) apenas com P-MAPA a 50 e 75 $\mu\text{g/ml}$ (Fig 3 e 4).

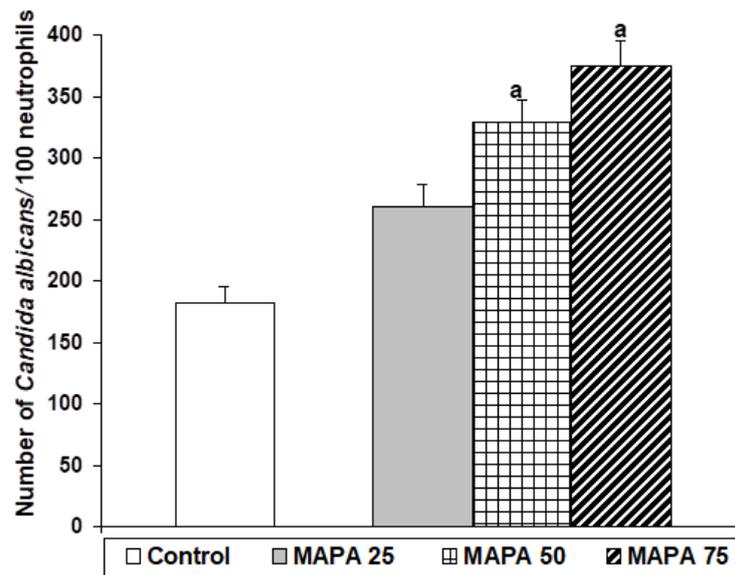


Figure 1. Fagocitose de *C. albicans* por neutrófilos incubados com 25, 50e 75 $\mu\text{g/mL}$ de MAPA (n = 6). Os valores são apresentados como \pm S.D. Média. $P < 0,05$, em comparação com o controle.

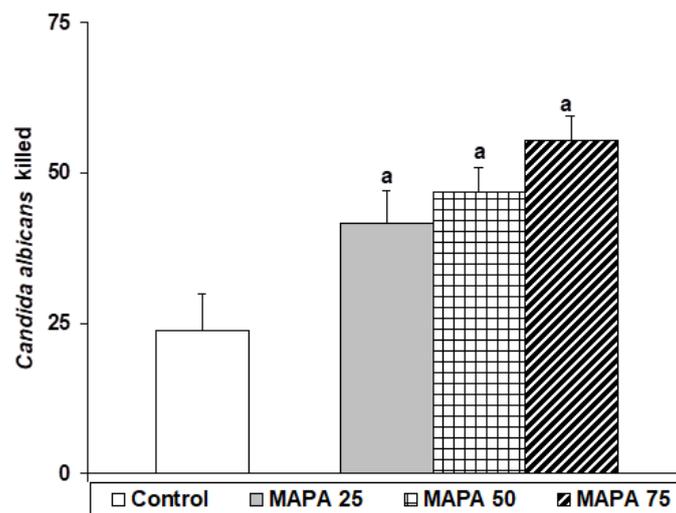


Figura 2. O killing de *C. albicans* por neutrófilos incubados com 25, 50e 75 $\mu\text{g/mL}$ de MAPA (n = 6). Os valores são apresentados como \pm S.D média, $P < 0,05$, em comparação com o controle.

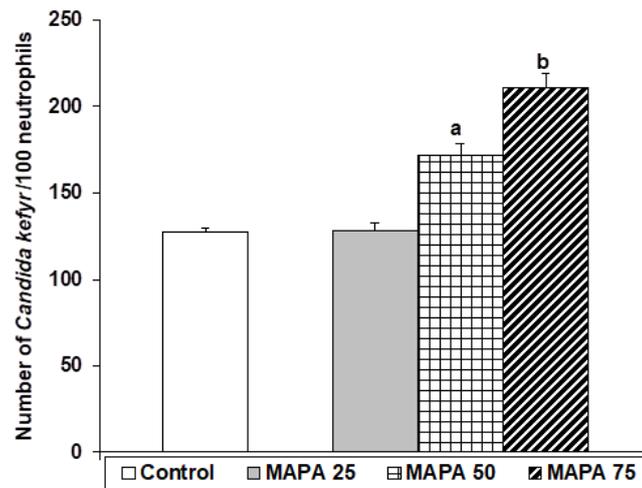


Figura 3. Fagocitose de *C. albicans* por neutrófilos incubados com 25, 50 e 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MAPA ($n = 6$). Os valores são apresentados como \pm S.D. média. $P < 0,05$, em comparação com o controle; b $P < 0,05$, em comparação com o controle, 25 e 50.

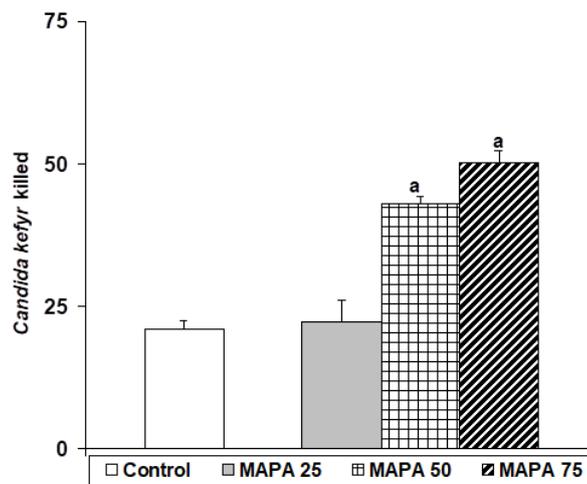


Figura 4. O killing de *C. kefyr* por neutrófilos incubado com 25, 50 e 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MAPA ($n = 6$). Os valores são apresentados como \pm S.D. média. $P < 0,05$, em comparação com o controle.

A Figura 5 compara os resultados obtidos nos quais os neutrófilos positivos para nitroblue-tetrazolium foram medidos. A redução do corante de tetrazolium nitroblue foi semelhante na presença do MAPA em 50 e 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em ambos os tempos de incubação ($P < 0,05$). O aumento da redução do nitroblue-tetrazolium com 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MAPA só foi observado após um período de incubação mais prolongado ($P < 0,05$).

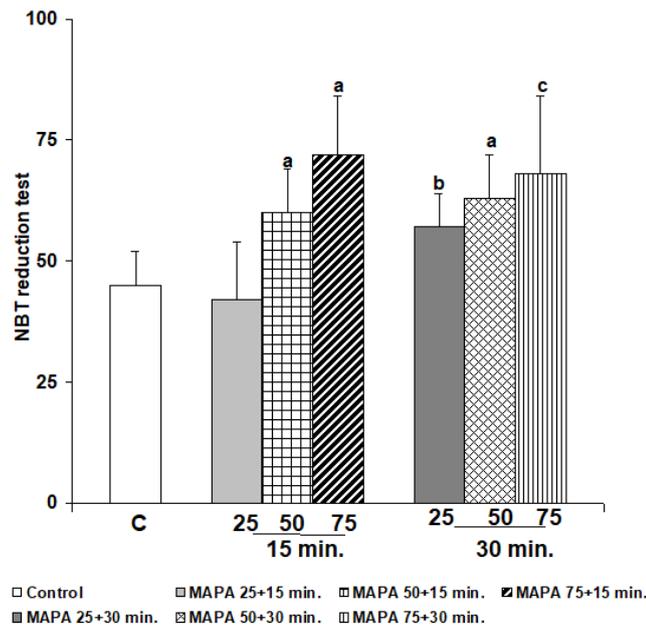


Figura 5. Teste de redução de NBT por neutrófilos incubados com 25, 50 e 75 µg/mL de MAPA (n = 6) por 15 ou 30 minutos. Os valores são apresentados como S. ±D. a $P < 0,05$, em comparação com o controle; b $P < 0,05$, em comparação com o controle e 25 por 15 minutos; c $P < 0,05$, em comparação com o controle e 50 por 15 minutos.

Não foram observadas diferenças estatísticas na quimiotaxia de neutrófilos após incubação com MAPA de 25 e 50 µg/ml (Fig. 6). No entanto, a migração de neutrófilos aumentou significativamente ($P < 0,05$) com MAPA a 75 µg/ml em comparação com o controle PMN.

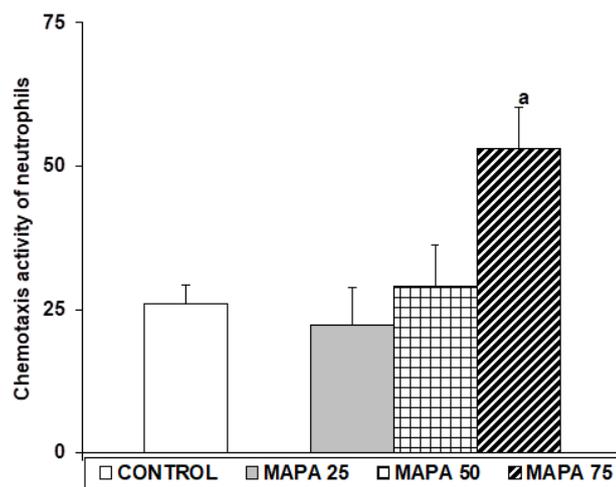


Figura 6. Atividade de quimiotaxia por neutrófilos incubados com 25, 50 e 75 µg/mL de MAPA (n = 6). Os valores são apresentados como ±S.D. média. $P < 0,05$, em comparação com o controle.

Nas últimas décadas nota-se um interesse crescente nos efeitos do magnésio na resposta imunológica. Por essa razão, várias indicações na literatura são possíveis de considerar a presença de íons de magnésio como principal componente do composto MAPA (DE SOUZA QUEIROZ, 2001; DURÁN et al., 2009). O magnésio desempenha um papel essencial como cofator em muitas reações bioquímicas (DURÁN et al., 1998), levando à especulação sobre seu papel na resposta imunológica em humanos. Além disso, vários desses trabalhos demonstraram que o P-MAPA tem induzido a proliferação e diferenciação das células progenitoras de granulócito-macrófago da medula óssea (DE SOUZA QUEIROZ, 2001). Além disso, este composto tem mostrado modular a resposta mielopoética de camundongos portadores de tumor, levando a um aumento significativo na sobrevivência e inibição do crescimento tumoral (DE ALMEIDA CHUFFA et al., 2018; DURÁN et al., 2009; JUSTO; DURÁN; QUEIROZ, 2003).

Neste estudo, demonstramos que a fagocitose e a lise de ambas as espécies de *Candida* foram significativamente aumentados na presença de P-MAPA (25, 50, e 75 µg/ml para *C. albicans*; 50 e 75 µg/ml para *C. kefyr*). Sabe-se que a geração de superóxido por neutrófilos exerce um papel essencial no sistema de defesa do hospedeiro contra a infecção microbiana (DAHLGREN; KARLSSON, 1999; HAYASHI; SIGNIFICA; LUSTER, 2003; JANKOWSKI; SCOTT; GRINSTEIN, 2002; REMIJSSEN et al., 2011). A enzima responsável por gerar ânion superóxido (O_2^-), chamada NADPH oxidase, está adormecida em células em repouso e torna-se ativa após a ativação celular (DAHLGREN; KARLSSON, 1999; TORRES; DANGL, 2005; WARDOWSKA et al., 2006). O magnésio tem sido, geralmente, usado na ativação livre de células de NADPH oxidase. O magnésio é necessário para a atividade máxima no sistema livre das células. No entanto, Durán et al. (1998) mencionaram que o magnésio não é necessário na reconstituição de um sistema simples.

Nesse sentido, também observamos neste trabalho, um aumento da quimotaxia dos polimorfonucleares e a redução do corante de nitroblue-tetrazolium em células isoladas de 6 indivíduos saudáveis quando incubados com composto P-MAPA. A redução do corante de nitroblue-tetrazolium pode ocorrer em neutrófilos após a fagocitose anterior do corante. De acordo com pesquisadores (HAYASHI; MEANS; LUSTER, 2003; HYUNG et al., 2006; JANKOWSKI; SCOTT; GRINSTEIN, 2002), o aumento da taxa de produtos de ânions de superóxido microscópico pode ser explicado em termos pela capacidade oxidativa microscópica aumentada secundária à indução citocromática P-450, quando o sistema opera com cofatores endógenos (NADPH e O_2) na ausência de substratos exógenos. Nestas condições, a formação H_2O_2 também é provável que ocorra por desproporção de ânion de superóxido por superóxido dismutase (SOD), ou acoplado à atividade aprimorada da oxidase Mg^{2+} -NADPH pelo composto P-MAPA. Além disso, o Mg^{2+} estabilizou a NADPH oxidase em um sistema de células brutas e sugeriu que o efeito é causado pela estabilização da porção F-actina (BABIOR, 2004; BABIOR; LAMBETH; NAUSEEF, 2002; BEDARD; KRAUSE, 2007; CLARK; NAUSEEF, 1996). Uma das descobertas mais importantes é que o Mg^{2+} evita em grande parte o efeito ATP. Com base nesses trabalhos, concluímos que o Mg^{2+} estabiliza a oxidase prevenindo a despolimerização F-actin (DE ALMEIDA CHUFFA et al., 2018; DURAN; DASILVANUNES, 1990; JUSTO; DURÁN; QUEIROZ, 2000; MELO et al., 2014).

Além disso, o composto P-MAPA pode alterar a homeostase de cálcio (aumentando a mobilização Ca^{2+} e sua concentração intracelular), sugerindo que a presença de Mg^{2+} no P-MAPA pode ser responsável por esse efeito. Acredita-se que fatores envolvidos nesse ciclo estejam

associados à ativação da produção de ânion de superóxido por células fagocíticas (DE SOUZA QUEIROZ, 2001; DURÁN et al., 2009).

Sabe-se bem que a geração aprimorada de ânion superóxido e provavelmente outras espécies de O_2 podem induzir o processo lipídico do peróxido ativo em hepatócitos, bem como leucócitos polimorfonucleares (DE ALMEIDA CHUFFA et al., 2018; DURÁN et al., 2009; JUSTO; DURÁN; QUEIROZ, 2003). Esses dados juntos sugerem que o composto P-MAPA aumenta a fagocitose induzida pelo antígeno e a quimiotaxia dos leucócitos polimorfonucleares "in vitro". No entanto, espera-se o aumento dessas células no local da infecção após a administração "in vivo" do P-MAPA, mediando a destruição ou o crescimento da inibição.

CONCLUSÕES

Este estudo sobre as alterações imunológicas nas células polimorfonucleares de indivíduos saudáveis, cujas células foram incubadas com P-MAPA, permite concluir que:

- 1- A capacidade fagocitária de neutrófilos apresentou-se aumentada frente à *Candida albicans* nas concentrações de 25, 50, 75 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ quando incubadas com o composto P-MAPA, enquanto frente à *Candida kefyr* o aumento ocorreu nas concentrações de 50, 75 ou 1000 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, a atividade lítica frente ao antígeno *C. albicans* apresentou-se aumentada nas concentrações de 25, 50 ou 75 $\mu\text{g/mL}$ incubadas com o composto P-MAPA e nas concentrações de 50, 75 ou 1000 $\mu\text{g/mL}$ com a *C. kefyr*. Estes resultados sugerem uma interferência positiva do composto estudado na aderência dos fagócitos, bem como no processo de degranulação de neutrófilos.
- 2- A capacidade dos neutrófilos reduzirem o corante nitroblue-tetrazolium apresentou-se aumentada nas concentrações testadas (50 e 75 $\mu\text{g/mL}$) do composto, sugerindo uma alteração na produção de óxido nítrico (NO).
- 3- A capacidade quimiotática também foi alterada quando as células foram incubadas com o composto P-MAPA na concentração de 75 $\mu\text{g/mL}$, apontando uma ação importante no sistema complemento.

REFERÊNCIAS

- BABIOR, B. M. NADPH oxidase Current Opinion in Immunology, 2004.
- BABIOR, B. M.; LAMBETH, J. D.; NAUSEEF, W. The neutrophil NADPH oxidase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2002.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology Physiological Reviews, 2007.
- BORREGAARD, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes Immunity, 2010.
- CLARK, R. A.; NAUSEEF, W. M. Isolation and Functional Analysis of Neutrophils. Current Protocols in Immunology, 1996.
- DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. Journal of Immunological Methods, 1999.
- DE ALMEIDA CHUFFA, L. G. et al. P-MAPA immunotherapy potentiates the effect of cisplatin on serous ovarian carcinoma through targeting TLR4 signaling. Journal of Ovarian Research, v. 11, n. 1, 17 jan. 2018.
- DE SOUZA QUEIROZ, M. L. Stimulation of myelopoiesis in Listeria monocytogenes-infected mice by an aggregated polymer isolated from Aspergillus oryzae. Human and Experimental Toxicology, 2001.
- DURÁN, N. et al. O magnésio e o sistema biológico. Rev. ciênc. farm, v. 19, n. 1, p. 9–36, 1998.
- DURÁN, N. et al. A biotechnological product and its potential as a new immunomodulator for treatment of animal phlebovirus infection: Punta Toro virus. Antiviral Research, v. 83, p. 143–147, 2009.
- DURAN, N.; DA-SILVA-NUNES, O. Characterization of an aggregated polymer from Penicillium SP. (PB-73 strain).

- Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 1990.
- DURAN, N.; DA-SILVA-NUNES, O. CHARACTERIZATION OF AN AGGREGATED POLYMER FROM PENICILLIUM SP (PB-73 STRAIN). Web of Science, 1990.
- GÓMEZ-OCHOA, P. et al. The nitroblue tetrazolium reduction test in canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 2010.
- HAYASHI, F.; MEANS, T. K.; LUSTER, A. D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*, 2003.
- HYUNG, S. C. et al. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 2006.
- JANKOWSKI, A.; SCOTT, C. C.; GRINSTEIN, S. Determinants of the phagosomal pH in neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 2002.
- JUSTO, G. Z.; DURÁN, N.; QUEIROZ, M. L. S. Myelopoietic response in tumour-bearing mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. *European Journal of Pharmacology*, 2000.
- JUSTO, G. Z.; DURÁN, N.; QUEIROZ, M. L. S. Natural killer cell activity, lymphocyte proliferation, and cytokine profile in tumor-bearing mice treated with MAPA, a magnesium aggregated polymer from *Aspergillus oryzae*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2003.
- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation *Nature Reviews Immunology*, 2013.
- LOPEZ CUENCA SONIA, S. M. M. J. Leucocitosis. *Guias Clínicas*, 2006.
- MELO, L. M. et al. Effects of P-MAPA immunomodulator on Toll-like receptor 2, ROS, nitric oxide, MAPKp38 and IKK in PBMC and macrophages from dogs with visceral leishmaniasis. *International Immunopharmacology*, 2014.
- NG, L. G.; OSTUNI, R.; HIDALGO, A. Heterogeneity of neutrophils. *Nature Reviews Immunology*, 2019.
- PARK, B. H.; FIKRIG, S. M.; SMITHWICK, E. M. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils. A diagnostic acid. *Lancet*, 1968.
- RAO, K. V. Nitroblue tetrazolium (NBT) reduction by neutrophils. *American Family Physician*, 1973.
- REMIJSEN, Q. et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Research*, 2011.
- RUEDA, C. C. Leucocitos. *hematologia*, 2015.
- RODGAARD-HANSEN, S.; KRONBORG, K. Prediction of survival by the soluble mannose receptor in pneumococcal bacteremia. *Infection, Supplement*, 2013.
- TORRES, M. A.; DANGL, J. L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development *Current Opinion in Plant Biology*, 2005.
- WARDOWSKA, A. et al. The biological activity of new tuftsin derivatives--induction of phagocytosis. *Acta poloniae pharmaceutica*, 2006.