



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

JULIANA FÉLIX DE MELO

**ATIVIDADE OXIDANTE-ANTIOXIDANTE DE MACRÓFAGOS
ALVEOLARES EM RATOS ENDOTOXÊMICOS SUBMETIDOS À
DESNUTRIÇÃO NEONATAL**

RECIFE
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JULIANA FÉLIX DE MELO

**ATIVIDADE OXIDANTE-ANTIOXIDANTE DE MACRÓFAGOS
ALVEOLARES EM RATOS ENDOTOXÊMICOS SUBMETIDOS À
DESNUTRIÇÃO NEONATAL**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Doenças
Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

**RECIFE
2007**

Melo, Juliana Félix de

Atividade oxidante-antioxidante de macrófagos alveolares em ratos endotoxêmicos submetidos à desnutrição neonatal / Juliana Félix de Melo. – Recife: O Autor, 2007.

75 folhas : il., tab., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2007.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Desnutrição neonatal – Atividade oxidante-antioxidante . 2. Endotoxemia - Atividade oxidante-antioxidante . I. Título.

57.085
574.29

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

:

UFPE
CCS2007-28



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL – MESTRADO E DOUTORADO

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

JULIANA FÉLIX DE MELO

No dia 08 de março de 2007, às 14h00, no Auditório do Edif. das Pós-Graduações do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – C.C.S./UFPE, os Professores: **Prof.^a Dr.^a Maria do Amparo Andrade (Depto. de Fisioterapia/UFPE – Membro Externo)**, **Prof.^a Dr.^a Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (Depto. Fisiologia e Farmacologia/UFPE – Membro Interno)**, e o **Prof. Dr. Pedro Israel Cabral de Lira (Depto. de Nutrição/UFPE – Membro Externo)**, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, argüíram a mestranda **Juliana Félix de Melo** sobre a sua Dissertação intitulada “**ATIVIDADE OXIDANTE-ANTIOXIDANTE DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES EM RATOS ENDOTOXÊMICOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NEONATAL**”. Ao final da argüição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof.^a Dr.^a Maria do Amparo Andrade

Aprovada com Distinção

Prof.^a Dr.^a Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Aprovada com Distinção

Prof. Dr. Pedro Israel Cabral de Lira

Aprovada com Distinção

Maria do Amparo Andrade

Prof.^a Dr.^a Maria do Amparo Andrade

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Prof.^a Dr.^a Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Pedro Israel Cabral de Lira

Prof. Dr. Pedro Israel Cabral de Lira



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. José Tadeu Pinheiro

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL**

Prof^a Heloísa Ramos Lacerda de Melo

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA TROPICAL**

Prof^a Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

CORPO DOCENTE

Prof^a Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Prof^a Elizabeth Malagueño de Santana

Prof^a Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Prof^a Geruza Dreyer Vieira

Prof. Joaquim Alves Norões

Prof^a Maria Amélia Vieira Maciel

Prof^a Maria de Fátima Militão de Albuquerque

Prof^a Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Prof. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Prof^a Silvia Maria de Lemos Hinrichsen

Prof^a Vera Magalhães da Silveira

A **DEUS**, cuja presença traz-me sempre a segurança necessária para enfrentar meu caminho e seguir.

Aos meus pais, **Maurílio e Nadja**, por todo o amor, apoio e incentivo a mim dedicados.

À memória de meus avós: **Adauto e Didi**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Célia Castro, orientadora e amiga, por todo incentivo e entusiasmo, pelas críticas sempre tão pertinentes e com quem aprendi a ter ânimo e coragem para seguir minha trajetória na vida acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade de levar adiante minhas pesquisas, e à CAPES, pelo apoio financeiro durante esses quase dois anos em que estive no Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do presente trabalho.

A Walter e Jupira, por terem resolvido todos os problemas burocráticos da minha passagem pelo Mestrado.

A todos os professores, colegas e funcionários do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, que me acolheram e me foram indispensáveis na realização desta dissertação, em especial: Prof^o Raul Manhães-de-Castro, Dr. Edeones França, José Paulino, Wylla Tatiana, Igor e Marco.

Às amigas e estagiárias de Iniciação Científica, Rebecca Peixoto e Érika Michelle, sem as quais teria sido impossível a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer às pessoas que conviveram comigo no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), durante todo o período enquanto estive pesquisando no Setor de Microbiologia, entre elas: Maria de Fátima, Felipe, Ana Valéria, Solange, Rosangela, Flávia, Rodrigo, Marcela, Simone, Bruno, Karla, Jeanine, Maiara, Natália, Alice, Francisco e Douglas.

Ao Marcelo, que não poupou esforços para me auxiliar na análise estatística dos dados e, principalmente, pela sua amizade.

Aos colegas do mestrado e do doutorado, pelo companheirismo nos momentos mais difíceis, especialmente: Rosangela, Joanna Darc, Maria Iraci, Paulo, Fabiana, Araiz e Cristiano.

A todos os professores, alunos e funcionários da Disciplina de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Medicina Tropical-UFPE que me apoiaram durante o Mestrado.

Aos amigos que sempre procuraram me incentivar e acreditaram na minha capacidade: Fernanda, Renata, Ana Luiza, Ivana, Ana Valéria, Kelly e Diogo.

Aos meus familiares (tios, primos) por todo o carinho, em especial, aos meus avós Félix e Carminha sempre muito interessados em meus estudos.

Ao Ricardo e à Augusta, pelo apoio em todos estes anos.

Aos meus pais pela imensidão de tudo, de minha vida.

Às minhas irmãs: Marina, Marcela e Alice, pela grande amizade e por sempre me proporcionarem muitas alegrias na vida.

A todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram generosamente para a concretização desta dissertação.

“Aprender é a única coisa que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo e nunca
se arrepende.”

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	11
	P
1. APRESENTAÇÃO	12
2. ARTIGO I	15
Resposta orgânica na endotoxemia e desnutrição precoce	
Resumo	17
Abstract	17
Introdução	18
Referências	23
3. ARTIGO II	26
Recrutamento celular e atividade oxidante-antioxidante de macrófagos na endotoxemia	
Resumo	28
Introdução	29
Materiais e métodos	30
Resultados	34
Discussão	35
Referências	38

4. ARTIGO III	46
Efeito da desnutrição neonatal sobre recrutamento celular e atividade oxidante--antioxidante de macrófagos na endotoxemia	
Resumo	48
Abstract	49
Introdução	50
Metodologia	51
Resultados	56
Discussão	58
Referências	63
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	71
Conclusões	72
Perspectivas	73
6. ANEXOS	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C: Controle

CLPS: Endotoxêmico

D: Desnutrido

DBR: Dieta Básica Regional

DLPS: Desnutrido Endotoxêmico

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

IL-1: Interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

i.p: Intraperitoneal

LBA: Lavado broncoalveolar

LPS: Lipopolissacarídio

MA: Macrófagos alveolares

N: Nutrido

NLPS: Nutrido Endotoxêmico

O₂⁻: Superóxido

ON: Óxido nítrico

PMA: Acetato miristato de forbol

SOD: Superóxido dismutase

TNF: Fator de necrose tumoral

UI: Unidades internacionais

XOD: Xantina oxidase

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

ARTIGO II

	p.
Tabela 1 Contagem de leucócitos em sangue e lavado broncoalveolar (LBA)	42
Figura 1 Produção de superóxido em sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados com PMA nos tempos de 1h e 2h	43
Figura 2 Produção de óxido nítrico (ON) em plasma e sobrenadante de cultura de macrófagos alveolares (MA)	44
Figura 3 Atividade da superóxido dismutase (SOD) em sobrenadante de cultura de macrófagos nos tempos de 0, 5min, 10min e 15min	45

ARTIGO III

	p.
Tabela 1 Contagem de leucócitos em sangue e lavado broncoalveolar (LBA)	68
Tabela 2 Atividade oxidante (O_2^- e ON) em sobrenadante de cultura de macrófagos e plasma	69
Figura 1 Evolução da curva ponderal durante a desnutrição neonatal (21 dias) e recuperação nutricional (23-89 dias) dos grupos Nutrido (N) e Desnutrido (D)	67
Figura 2 Atividade da superóxido dismutase (SOD) em sobrenadante de cultura de macrófagos nos tempos de 0, 5min, 10min e 15min	70

1 - APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT) do Departamento de Nutrição e no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Setor de Microbiologia, da Universidade Federal de Pernambuco. Contou com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Edital Universal - CNPq n° 4770004/04-0) no âmbito do projeto: “Atividade oxidante-antioxidante em macrófagos alveolares de ratos endotoxêmicos submetidos ou não à desnutrição neonatal”.

Após revisão da literatura, o interesse sobre os mecanismos patogênicos da endotoxemia na desnutrição precoce, seguida de recuperação nutricional, foi despertado por não existir nenhum trabalho utilizando este modelo de desnutrição em casos de endotoxemia. Portanto, optou-se pelo primeiro artigo da dissertação o qual foi intitulado: “Resposta Orgânica na Endotoxemia e Desnutrição Precoce”. Este foi submetido como artigo de revisão na revista: Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco.

Com o desenrolar dos experimentos, decidiu-se investigar o efeito da endotoxemia sobre o recrutamento celular para o pulmão e a atividade oxidante-antioxidante de macrófagos alveolares em ratos adultos saudáveis. Dessa forma, surgiu a idéia de um segundo artigo, intitulado: “Recrutamento celular e atividade oxidante-antioxidante de macrófagos na endotoxemia”. O mesmo será submetido como artigo original ao periódico: European Respiratory Journal.

Finalmente, o principal objeto de pesquisa desta dissertação, que culminou em seu terceiro artigo, teve como objetivo avaliar se a desnutrição ocorrida no período neonatal compromete o recrutamento celular para o pulmão e a atividade oxidante-antioxidante de macrófagos alveolares em ratos adultos endotoxêmicos. Tal artigo foi intitulado: “Efeito da desnutrição neonatal sobre recrutamento celular e atividade oxidante-antioxidante de macrófagos na endotoxemia”. Este será submetido como artigo original ao periódico: *Brazilian Journal of Nutrition*.

O conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na resposta inflamatória pulmonar, diante de situações como endotoxemia ou desnutrição neonatal, pode contribuir de forma importante não só para a definição de estratégias de tratamento, mas também para a redução das taxas de morbi-mortalidade.

2 – ARTIGO I

ARTIGO DE REVISÃO

RESPOSTA ORGÂNICA NA ENDOTOXEMIA E DESNUTRIÇÃO PRECOCE

Organic response on the endotoxemia and early malnutrition

Juliana Félix de Melo¹
Célia Maria Machado Barbosa de Castro²
Érika Michelle Correia de Macedo³
Rebecca Peixoto Paes Silva³
Wylla Tatiana Ferreira e Silva³
Carlos Teixeira Brandt⁴

Departamento de Medicina Tropical - Universidade Federal de Pernambuco

¹Mestranda em Medicina Tropical - UFPE

²Profa Adjunta do Departamento de Medicina Tropical - UFPE

³Nutricionista - UFPE

⁴Prof. Titular do Departamento de Cirurgia - UFPE

Endereço para correspondência:

Dra.Célia Maria Machado Barbosa de Castro.

Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami(LIKA)-Setor de Microbiologia-UFPE.
Campus Universitário.Recife-PE. CEP: 50670-420. Tel: (81) 21268486 - ramal 27, Fax:
(81) 21268485.

e-mail: ccastro@lika.ufpe.br

RESUMO: A endotoxemia está associada a uma ampla e inespecífica cascata de eventos. Isto resulta na secreção de uma variedade de potentes mediadores pró-inflamatórios e citocinas produzidos primariamente por macrófagos e monócitos ativados. Na desnutrição, a maioria dos mecanismos de defesa do organismo está prejudicada. Assim, a infecção é a maior causa de morbidade e mortalidade em indivíduos severamente desnutridos. O presente trabalho tem por objetivo revisar mecanismos patogênicos da endotoxemia na desnutrição precoce seguida de recuperação nutricional.

UNITERMOS: Endotoxemia; Desnutrição; Sistema imune.

ABSTRACT: The endotoxemia is associated to a wide and inespecific cascade of events. This results in the secretion of a variety of potents pro-inflammatory mediators and cytokines produced primarily by activated macrophages and monocytes. In malnutrition, the majority of defense mechanisms of the organism is damaged. Thus, the infection is the main cause of morbidity and mortality in severely malnourished individuals. This work aims to review patogenic mechanisms of the endotoxemia in early malnutrition followed by nutritional recovered.

KEYWORDS: Endotoxemia; Malnutrition; Immune system.

INTRODUÇÃO

Os mecanismos de resistência do hospedeiro às infecções podem ser divididos em duas vias principais: a resposta imune específica e a resposta imune inespecífica. As defesas inespecíficas incluem a pele, as membranas mucosas, células fagocíticas, muco, epitélio ciliar, sistema complemento, lisozima, interferon e outros fatores humorais. Esses processos inatos, do qual faz parte a reação inflamatória, estão naturalmente presentes e não são influenciados pelo contato prévio com os agentes infecciosos. Eles agem como a primeira linha de proteção e retardam o estabelecimento de manifestações infecciosas¹.

A inflamação é definida clinicamente pela associação dos quatro sinais: tumor, rubor, calor e dor. A nível dos tecidos, esses sinais são consequência de uma vasodilatação, do aumento da permeabilidade vascular e de um afluxo de células fagocitárias². A endotoxemia aguda, caracterizada por altos níveis de endotoxina no sangue, causa reação inflamatória com injúria endotelial, hipotensão, falência múltipla dos órgãos e morte^{3,4}. No foco de injúria tecidual, fatores quimiotáticos atraem células sanguíneas que, por diapedese, atravessam a barreira endotelial. Dentre estas células, os neutrófilos estão em maior número, seguidos dos monócitos que se transformam em macrófagos nos tecidos. Neutrófilos e macrófagos são fagócitos e têm a capacidade de internalizar partículas inertes, células alteradas do indivíduo, microrganismos e parasitas. Dessa forma, a fagocitose constitui um dos principais fenômenos que ocorrem no processo inflamatório.

Os macrófagos pertencem ao sistema dos fagócitos mononucleares e constituem a segunda maior população celular do sistema imune. Após o contato com o agente agressor, agem liberando citocinas que iniciam e amplificam o processo inflamatório⁵.

A ativação dos macrófagos por endotoxinas induz a produção intracelular do ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e outros potentes produtos microbicidas que são responsáveis pela destruição dos microrganismos fagocitados^{6,7}. Essas células ativadas apresentam uma série de diferenças morfológicas, funcionais e metabólicas quando comparadas às células não ativadas. Neste processo, os macrófagos podem apresentar alterações, tais como: aumento de tamanho, de aderência, da velocidade de deslocamento e da atividade fagocítica⁸.

Em linhas gerais, os eventos que decorrem da sepse e do choque séptico são causados por endotoxinas ou lipopolissacarídeos (LPS) produzidos por bacilos Gram negativos. Essas substâncias se localizam na parte externa da membrana bacteriana e são liberadas a partir da sua replicação e/ou morte². O efeito biológico da endotoxina é o de gerar e amplificar resposta inflamatória. A administração parenteral de LPS induz a migração de leucócitos sanguíneos para o sítio inflamatório/infeccioso. Nesse particular, o pulmão é sensível aos efeitos do LPS, seguido do fígado, intestino e rim⁹.

Desnutrição aguda ou crônica leva a alterações de sistemas orgânicos, sendo de especial interesse o sistema pulmonar. Nessas situações de carências ocorre uma diminuição na elasticidade e função dos pulmões, massa muscular respiratória, força e resistência, além de alterações nos mecanismos imunológicos de defesa pulmonar e controle da respiração¹⁰.

A desnutrição protéica é um problema de saúde pública que há tempos acomete grande parcela da população mundial, principalmente nos países em desenvolvimento¹¹⁻¹³. No Brasil, em estados pertencentes às regiões Norte e Nordeste, a prevalência de desnutrição chega a atingir 17% da população com menos de cinco anos de idade¹⁴.

O complexo desnutrição-infecção pode ser visto sob diferentes aspectos: a desnutrição pode induzir alterações nos mecanismos de defesa do indivíduo; a infecção pode agravar o estado nutricional deficiente, previamente instalado; ou ainda, pode haver desenvolvimento de desnutrição em decorrência da própria doença^{15,16}. Assim, além da desnutrição facilitar a invasão do agente, favorecendo a sua proliferação no organismo e/ou produção de toxinas; também pode aumentar as chances de uma infecção secundária ao modificar a evolução e prognóstico de uma determinada doença^{16,17}.

Dados epidemiológicos e clínicos sugerem que deficiências nutricionais alteram a imunocompetência e aumentam o risco de infecções¹. As agressões nutricionais no período crítico de desenvolvimento dos sistemas orgânicos são extremamente graves, pois podem comprometer o sistema imunológico, causando seqüelas na capacidade de defesa do indivíduo adulto¹⁸.

Segundo Chandra (1997), na desnutrição, a maioria dos mecanismos de defesa do organismo está prejudicada¹. A desnutrição calórico-protéica está associada com o enfraquecimento da imunidade mediada por células, na função fagocítica, no sistema de complemento, na concentração de anticorpos e na produção de citocinas¹⁹. Nesta condição muitas funções dos macrófagos encontram-se comprometidas²⁰.

Os sistemas antimicrobicidas dos fagócitos são potencialmente afetados pela desnutrição. Nestes sistemas estão incluídos mecanismos que independem de oxigênio, tais como as enzimas: lactoferrina, lisozima, hidrolases, e os sistemas dependentes de oxigênio que são responsáveis pela explosão respiratória no fagócito²¹. Estudos demonstram que na deficiência protéica há redução da produção do ânion

superóxido^{22,23}. Pesquisadores também relatam déficit na produção de óxido nítrico (ON) na desnutrição²⁴⁻²⁶.

São estudadas com particular atenção, as alterações nos subgrupos de linfócitos envolvidos na defesa específica, na indução de genes produtores de citocinas ou na ativação de linfócitos²⁷. Assim, por exemplo, a relação entre os subgrupos de linfócitos CD4+ e CD8+ é significativamente menor em indivíduos desnutridos^{28,29}. Além disso, experimentos têm mostrado uma redução no número de células produtoras de anticorpos e na quantidade de imunoglobulinas secretadas¹.

A forte associação entre desnutrição e infecções tem sido estabelecida através de estudos epidemiológicos realizados em vários países³⁰. Os fatores nutricionais podem alterar os mecanismos de defesa influenciando profundamente na resistência à infecção³¹. A desnutrição tem sido associada a uma susceptibilidade aumentada às infecções, devido em parte a uma diminuição na imunidade celular, uma redução na secreção de IgA, uma diminuição na função do macrófago alveolar, e um aumento da colonização bacteriana^{32,33}. De acordo com Rodríguez et al. (2005), várias anormalidades na resposta imune em crianças desnutridas têm sido descritas, podendo contribuir para um aumento na severidade e frequência de infecções³⁰.

Levando-se em consideração os dados apresentados e tendo em mente que o crescimento e o desenvolvimento humanos representam um contínuo com início na concepção, não é de se surpreender que a nutrição neonatal tenha impacto em parâmetros fisiológicos em fases posteriores da vida³⁴. Estudos indicam que a dieta materna durante a gestação, bem como a nutrição perinatal inadequada, podem afetar a organogênese e, conseqüentemente, a função orgânica na maturidade. Essas alterações

levariam o adulto a apresentar problemas como hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, problemas renais, podendo repercutir nas defesas orgânicas^{34,35}.

Em humanos, eventos importantes para a imunocompetência são iniciados ainda no embrião e continuam na primeira semana de vida. Em ratos, a competência imunológica também é adquirida gradualmente após o nascimento³⁶. Em estudos experimentais com animais, algumas alterações produzidas pela desnutrição são mais evidentes, tais como a redução do peso corporal e determinadas alterações no desenvolvimento³⁷⁻³⁹.

Conclui-se assim que a endotoxemia produz ativação exagerada e generalizada de fagócitos, em especial macrófagos, com intensa liberação de mediadores solúveis pró-inflamatórios tais como O_2^- e H_2O_2 . Uma vez que a competência imunológica é adquirida em fase precoce do desenvolvimento, acredita-se que a desnutrição neste período, mesmo seguida de recuperação nutricional, poderá determinar seqüelas duradouras com conseqüentes complicações dos mecanismos patogênicos da endotoxemia na vida adulta.

REFERÊNCIAS

- 1.Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr* 1997; 66(2):460-463.
- 2.De Castro CMMB, De Castro RM, Andrade AD, Brandt CT. LPS bacteriano: um mediador de inflamação. *An Fac Med Univ Fed Pernamb* 1997; 42(2):78-83.
- 3.Hewett JA, Roth RM. Hepatic and extrahepatic pathobiology of bacterial lipopolysaccharide. *Pharmacol Rev* 1993; 45:382-411.
4. Sunil VR, Connor AJ, Zhou P, Gordon MK, Laskin JD, Laskin DL. Activation of adherent vascular neutrophils in the lung during acute endotoxemia. *Respir Res* 2002; 3(1):21.
- 5.Márton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in a apical periodontitis. *Oral Microbiol Imunol* 2000;15:139-150.
- 6.Meyer J, Hinder F, Stothert J Jr, Traber LD, Herndon DN, Flynn JT, Traber DL. Increased organ blood flow in chronic endotoxemia is reversed by nitric oxide synthase inhibition. *J Appl Physiol* 1994; 76:2785-2793.
- 7.Amersfoort ESV, Berkel TJC, Kuiper J. Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(3):379-414.
- 8.O'Keefe RJ, Teot LA, Singh D, Puzas JE, Rosier RN, Hicks DG. Osteoclasts constitutively express regulators of bone resorption: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Lab Invest* 1997; 76(4):457-465.
- 9.Welbourn CRB, Young Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *Br J Surg* 1992; 79:998-1003.
10. Fernandes AC, Bezerra OMPA. Terapia nutricional na doença pulmonar obstrutiva crônica e suas complicações nutricionais. *J Bras Pneumol* 2006; 32(5):461-471.
- 11.Torun B, Chew F. Protein energy malnutrition. In: Shils M, Olson JA, Shike M, editors. *Modern nutrition in health and disease*. Philadelphia: Lea e Febiger 1994; 950-976.
- 12.Uvin P. The state of world hunger. *Nutr Res* 1994; 52: 151-161.
- 13.Dâmaso A. *Nutrição e exercício na prevenção de doenças*. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

14. Rogatto GP, Oliveira CAM, Santos JW, Manchado FB, Nakamura FY, Moraes C, Zagatto AM, Faria MC, Afonso M, Mello MAR. Influência da ingestão de espirulina sobre o metabolismo de ratos exercitados. *Rev Bras Med Esporte* 2004;10(4):281-284.
15. Scrimshaw NS. Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection. *J Nutr* 2003; 133:316-321.
16. Borelli P, Blatt SL, Rogero MM, Fock RA. Haematological alterations in protein malnutrition. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2004; 26:49-56.
17. Brundtland GH. Nutrition and infection: malnutrition and mortality in public health. *Nutr Rev* 2000; 58:1-4.
18. Cunningham-Rundles S, McNeeley DF, Moon A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 1119-1128.
19. Chandra RK. Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr* 2002; 3:73-76.
20. Borelli P, Souza IP, Borojevic R, Dagli MLZ, Kang HC. Protein Malnutrition: Some Aspects of the in vitro adhesion of peritoneal mouse macrophages. *Ann Nutr Metab* 1998; 42: 367-373.
21. Kawakami K, Kadota J, Lida K, Shirai R, Abe K, Kohno S. Reduced immune function and malnutrition in the elderly. *Tohoku J Exp Med* 1999; 187(2):157-171.
22. Redmond HP, Leon P, Lieberman MD, Hofmann K, Shou J, Reynolds JV, Goldfine J, Johnston RB Jr, Daly JM. Impaired macrophage function in severe protein-energy malnutrition. *Arch Surg* 1991; 126(2):192-196.
23. Cederholm T, Gyllenhammar H. Impaired granulocyte formylpeptide-induced superoxide generation in chronically ill, malnourished, elderly patients. *J Intern Med* 1999; 245: 475-482.
24. Chan J, Tian Y, Tanaka KE, Tsang MS, Kyu P, Salgame D, Carroll Y, Kress R, Teitelbaum BR, Bloom. Effects of protein calorie malnutrition on tuberculosis in mice. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93:14857-14861.
25. Dong W, Selgrade MK, Gilmour IM, Lange RW, Park P, Luster MI, Kari FW. Altered alveolar macrophage function in calorie-restricted rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19:462-469.
26. Anstead GM, Chandrasekar B, Zhao W, Yang J, Perez LE, Melby PC. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun* 2001; 69:4709-4718.
27. Allende LM, Corell A, Manzanares J, Madruga D, Marcos A, Madrono A, Lopez-Goyanes A, Garcia-Perez MA, Moreno JM, Rodrigo M, Sanz F, Arnaiz-Villena A.

Immunodeficiency associated with anorexia nervosa is secondary and improves after refeeding. *J Photobiol B* 1998; 44(2):117-123.

28. Leke L, Saygili A, Vural M, Risbourg B. Malnutrition et deficit immunitaire chez l'enfant. *Arch Pediatr* 1996; 3:705-713.

29. Chandra RK. Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again. *Proceedings of the Nutrition Society* 1999; 58:681-683.

30. Rodríguez L, González C, Flores L, Jiménez-Zamudio L, Graniel J, Ortiz R. Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12(4): 502-507.

31. Keusch GT. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. *J Nutr* 2003; 133: 336-340.

32. Lewis MI. Nutrition and chronic obstructive disease: a clinical overview. In: Bach JR, editor. *Pulmonary rehabilitation: the obstructive and paralytic condition*. Philadelphia, P.A.: Henley & Belfus/Mosby, 1996; 157-171.

33. Ferreira IM. Chronic obstructive pulmonary disease and malnutrition: why are we not winning this battle? *J Pneumologia* 2003; 29(2):107-115.

34. Camelo Jr JS, Martinez FE. Dilemas nutricionais no pré-termo extremo e repercussões na infância, adolescência e vida adulta. *J Pediatr* 2005; 81(1).

35. Ingelfinger JR, Woods LL. Perinatal programming, renal development, and adult renal function. *Am J Hypertens* 2002;15:46-49.

36. Göbel H, Dworschak M, Kropp P, Heinze A, Heuss D. Die exteroceptive Suppression der Aktivität des M.temporalis in der Analyse von Schmerzmechanismen. *Der Schmerz* 1996; 10:121-129.

37. Dobbing J. *Early nutrition and later achievement*. London: Academic Press; 1987.

38. Lima JG, Oliveira LM, Almeida SS. Effects of early concurrent protein malnutrition and environment stimulation on the central nervous system and behavior. *Nutr Neurosci* 1999; 1:439-448.

39. Silva VC, Almeida SS. Desnutrição protéica no início da vida prejudica memória social em ratos adultos. *Rev Nutr* 2006;19(2).

3 – ARTIGO II

Recrutamento celular e atividade oxidante-antioxidante de macrófagos alveolares na endotoxemia

Juliana Félix de Melo¹; Érika Michelle Correia de Macedo¹; Rebecca Peixoto Paes Silva¹; Marcelo Tavares Viana²; Wylla Tatiana Ferreira e Silva²; Célia Maria Machado Barbosa de Castro¹

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, UFPE, Setor de Microbiologia, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brazil.

²Laboratório de Fisiologia do Departamento de Nutrição, UFPE, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

Correspondência:

Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro.

Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami(LIKA)-Setor de Microbiologia-UFPE. Campus Universitário. Recife-PE. CEP: 50670-420. Tel: (81) 21268486 - ramal 27, Fax: (81) 21268485.

e-mail: ccastro@lika.ufpe.br

Short title: Resposta inflamatória na endotoxemia.

Este estudo recebeu apoio financeiro do CNPq.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar o efeito da endotoxemia sobre recrutamento celular para o pulmão e atividade oxidante-antioxidante de macrófagos alveolares em ratos. Foram utilizados ratos machos Wistar (n=24), com idade entre 90 e 120 dias, divididos em dois grupos: controle e endotoxêmico. O grupo endotoxêmico foi submetido à injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo na dose de 1mg/kg de peso corporal.

Após 24 h, coletou-se sangue para contagem total e diferencial de leucócitos e dosagem de óxido nítrico. Além do sangue, coletou-se lavado broncoalveolar para contagem total e diferencial dos leucócitos e, a partir de macrófagos isolados deste lavado, realizaram-se as seguintes dosagens: superóxido, óxido nítrico e superóxido dismutase.

A endotoxemia aumentou a contagem total de leucócitos e o número de neutrófilos em sangue periférico e lavado broncoalveolar. Ainda, aumentou a produção de superóxido sem modificar a liberação de óxido nítrico e superóxido dismutase.

Esses resultados sugerem que a endotoxemia induz uma resposta inflamatória no pulmão. Contudo, não altera a atividade antioxidante em ratos adultos. Tal fato potencializa a resposta contra agentes infecciosos pelo hospedeiro, mas também pode contribuir na patogênese de injúria pulmonar.

DESCRITORES: Atividade antioxidante; Atividade oxidante; Endotoxemia; Recrutamento celular.

INTRODUÇÃO

Em linhas gerais, os eventos que decorrem da sepse e do choque séptico são causados por endotoxinas ou lipopolissacarídeos (LPS) produzidos por bacilos Gram negativos. Essas substâncias se localizam na parte externa da parede celular bacteriana e são liberadas a partir da sua replicação e/ou morte[1]. A endotoxemia aguda, caracterizada por altos níveis de endotoxina no sangue, causa reação inflamatória com injúria endotelial, hipotensão, falência múltipla dos órgãos e morte[2,3].

Dentre os órgãos envolvidos no choque séptico, o pulmão é um dos mais sensíveis aos efeitos das endotoxinas e o primeiro a ser atingido[4]. Durante a endotoxemia, as complicações pulmonares, incluindo edema pulmonar e falência respiratória, são as maiores causas de morbi-mortalidade em pacientes sépticos[5].

A ativação dos macrófagos por endotoxinas induz a produção intracelular do ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e outros potentes produtos microbicidas que são responsáveis pela destruição dos microrganismos fagocitados[6,7]. Alguns dos eventos mais importantes associados à resposta inflamatória são a produção e liberação de citocinas, como Interleucinas (IL-1 e IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF)[8].

Em contrapartida, os compostos antioxidantes protegem os sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de reações das espécies reativas de oxigênio com diversos alvos celulares[9].

A administração parenteral de LPS mimetiza a reação generalizada de defesa do organismo às infecções, como febre, anorexia e indução das proteínas de fase aguda no fígado[10,11]. Ademais, induz a migração de leucócitos sanguíneos para o sítio inflamatório/infeccioso. Assim, o LPS funciona como um adequado modelo para o

estudo da manifestação de alterações fisiológicas durante infecções bacterianas, já que reproduz muitos dos sintomas clínicos observados em pacientes com septicemia por bactérias gram-negativas[12].

Considerando que o pulmão é o primeiro órgão a ser atingido na endotoxemia, torna-se de extrema importância a realização de trabalhos experimentais no intuito de investigar as funções dos macrófagos alveolares nesta condição. No presente estudo, pretende-se avaliar o efeito da endotoxemia sobre o recrutamento de células inflamatórias para o pulmão e a atividade oxidante-antioxidante de macrófagos alveolares em ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e administração de LPS

Foram utilizados 24 ratos machos Wistar com idade entre 90 e 120 dias. Os animais foram mantidos em biotério com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo claro-escuro de 12:12h e livre acesso à água e ração (Labina - Purina do Brasil). Os animais foram divididos em dois grupos: Controle (C) e Endotoxêmico (CLPS). O grupo CLPS foi submetido à injeção intraperitoneal (i.p.) de LPS (sorotipo de *Escherichia coli*; 055:B5, Sigma) na dose de 1mg/kg de peso corporal, preparado com NaCl a 0,9%. O grupo C recebeu, pela mesma via, NaCl a 0,9% em igual proporção. Vinte e quatro horas após a administração do LPS, coletou-se sangue e lavado broncoalveolar (LBA) de cada animal para estudo.

Análise das células do sangue periférico

Coletaram-se alíquotas de sangue (0,5 mL) da cauda dos animais para a contagem das células. Utilizou-se a solução de TURK para a contagem total. Os

leucócitos foram contados em Câmara de Neubauer com auxílio do microscópio óptico (sob lente 40x de aumento). Para a contagem diferencial utilizou-se a técnica do estiramento sanguíneo, e as lâminas foram coradas com o kit Panótico Rápido, LB-Laborclin Ltda. Após preparação, foram examinadas ao microscópio óptico com objetiva de 100x sob imersão. Os diferentes elementos foram contabilizados pelo contador eletrônico da marca Kacil com teclas correspondentes a cada tipo de célula. A partir dos dados obtidos foram calculados os valores absolutos e relativos para cada tipo de célula.

Lavado broncoalveolar (LBA)

O lavado broncoalveolar foi obtido de acordo com a técnica desenvolvida por De Castro *et al.*[13]. Os animais foram anestesiados com uretana 12.5% na proporção de 8 mL/kg i.p. O LBA foi coletado com a injeção de salina a 0,9% através de uma cânula plástica inserida na traquéia. Várias alíquotas de 3 mL foram injetadas e coletadas em tubos cônicos de polipropileno de 50 mL (Falcon, Sigma). Recuperou-se aproximadamente 30 mL de LBA para cada animal.

Análise das células do lavado broncoalveolar

A contagem total das células foi realizada a partir de uma amostra do LBA, diluição de 1:10, em corante azul trypan. A contagem diferencial foi realizada a partir de lâminas citocentrifugadas a 800rpm/10min (CytoproTM-Cytocentrifuge Wescor), coradas com o kit Panótico Rápido e lidas ao microscópio óptico com objetiva de 100x sob imersão. A partir dos dados obtidos foram calculados os valores absolutos e relativos para cada tipo de célula.

Cultura de macrófagos alveolares (MA)

Centrifugou-se o LBA recolhido a 1500rpm durante 15min. O precipitado que corresponde às células foi ressuspendido em um meio de cultura (RPMI 1640, Gibco-Invitrogen Corporation) contendo soro fetal bovino (3%, Gibco-Invitrogen Corporation) e antibióticos (penicilina 100U/mL e estreptomicina 100µg/mL). As células foram transferidas para placas de cultura de 35 mm de diâmetro (6 poços, Falcon), onde foram dispensados 2 mL da suspensão em uma proporção de 10^6 células/mL de RPMI 1640 em cada poço. Após 1h na incubadora a 37°C e 5% CO₂, desprezou-se o sobrenadante com as células não aderentes e adicionou-se 2 mL de meio RPMI, deixando-se as placas por mais 1h em incubadora para estabilização das células.

Análise da produção de superóxido (O₂⁻)

O₂⁻ foi induzido pela adição de acetato miristato de forbol (PMA, Sigma) em solução de Hanks (HBSS, Gibco-Invitrogen Corporation), na concentração de 2µg/mL. Foram preparados 2 sistemas de análise descontínua com avaliação a cada 1 hora, por 2 horas. A especificidade do ensaio foi garantida pela adição de superóxido dismutase (SOD) de eritrócitos bovinos (Sigma - contendo 3000U/mg de proteína em solução final de 3mg/mL em água destilada). Para o preparo destes sistemas foram utilizados macrófagos em cultura (2×10^6 células por 2mL de RPMI 1640), com ou sem a presença de SOD. Os sistemas foram mantidos em incubadora a 37°C, atmosfera úmida, 5% de CO₂, por 10min (ativação da SOD). O ferrocitocromo c tipo IV de mitocôndria de coração de cavalo, (30mg/mL em HBSS, 2.4×10^{-3} M, Sigma) foi adicionado às células para quantificar a formação de O₂⁻ através da redução do ferrocitocromo c. Amostras de 700µl foram retiradas de cada sistema. A 1ª alíquota recolhida correspondia ao tempo "zero" de cada sistema e as amostras subseqüentes foram coletadas em intervalos

regulares de tempo. Medidas espectrofotométricas foram realizadas a 550nm para determinar o grau de redução do ferrocitocromo c dos sobrenadantes. A curva de O_2^- foi obtida pela conversão dos valores de absorvância para nanomoles de O_2^- /min usando-se a fórmula: $[O] = 205,49 \times \text{valor da absorvância} \times \text{volume da amostra coletada}$ [14].

Liberação de óxido nítrico (ON)

A produção de ON foi determinada a partir de plasma e de sobrenadante de macrófagos em cultura segundo o método descrito por Feder e Laskin[15]. A concentração de nitrito/nitrato, medida indireta da síntese de ON, foi calculada através de curva padrão de $NaNO_2$ e os dados foram expressos em $\mu M/mL$ de nitrito/nitrato.

Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo preparo de 4 sistemas com avaliação nos tempos de 0, 5, 10 e 15min. Para o preparo destes sistemas, foram utilizados macrófagos em cultura (2×10^6 células por 2mL de RPMI 1640), solução tampão fosfato (50mM pH 7,8), citocromo c (Sigma - 0,3mM - 4 μ cg/mL em solução tampão), xantina oxidase (XOD) (Sigma – 25U - 56mU/mL em solução tampão) e SOD (Sigma – 3000U/mg de proteína em solução final de 3mg/mL em água destilada). Aos 4 sistemas foram adicionados solução tampão fosfato, citocromo c e hipoxantina. Ao 2º sistema, além desses reagentes, também foi adicionada a XOD. Os sistemas 3 e 4 foram acrescidos de todos os reagentes, sendo que a SOD em quantidades diferentes (sistema 3 – SOD 1,5mg/mL; sistema 4 – SOD 3mg/mL). Amostras de 700 μ l foram retiradas de cada sistema nos tempos determinados (à temperatura de 25°C), sendo efetuadas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro a 550nm. Para os resultados finais, as proteínas foram determinadas pelo método de Lowry[16] e os dados expressos em UI de SOD por mg de proteína.

Análise estatística

Na comparação entre os grupos, utilizou-se o teste t de Student para os dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para os dados não paramétricos. Os resultados foram representados em média \pm erro-padrão. A significância foi definida para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Contagens total e diferencial de leucócitos sanguíneos

Os dados da contagem de leucócitos no sangue periférico (Tabela 1) indicam que a endotoxemia aumentou ($p < 0,05$) o número de leucócitos totais e neutrófilos e reduziu ($p < 0,05$) os valores de linfócitos. Não houve diferença nos valores de monócitos e eosinófilos após endotoxemia.

Contagens total e diferencial de leucócitos do LBA

A endotoxemia aumentou ($p < 0,05$) o número de leucócitos totais e neutrófilos no LBA. Em contrapartida, houve redução ($p < 0,05$) nos valores de macrófagos e linfócitos. Não houve diferença entre os grupos quanto ao número de eosinófilos (Tabela 1).

Liberação de superóxido por macrófagos

No grupo endotoxêmico, houve aumento ($p < 0,05$) na produção de O_2^- em sobrenadante de cultura de macrófagos após 1h e 2h de estímulo com PMA (Figura 1).

Produção de óxido nítrico

A produção média de ON (Figura 2) em plasma não diferiu entre os grupos. Também não houve diferença na liberação de ON em sobrenadante de cultura de macrófagos após 24h de estímulo com LPS.

Atividade da SOD

A atividade da SOD não diferiu entre os grupos nos tempos de 0, 5min, 10min e 15min (Figura 3).

DISCUSSÃO

A presença da resposta inflamatória, localizada principalmente nos pulmões, foi demonstrada pela primeira vez por Massoudy *et al.*[17]. O influxo leucocitário é descrito em diversas condições clínicas pulmonares inflamatórias[18]. Neste estudo, o número de leucócitos totais e neutrófilos em sangue periférico e LBA aumentou após administração sistêmica de LPS.

Friedman *et al.*[19] referem que a leucocitose não é marcador específico ou sensível de infecção, bem como, o valor limitado do desvio à esquerda, que reflete a formação de formas jovens pela medula óssea. Contudo, assim como mudanças na temperatura corporal, esses parâmetros são facilmente mensuráveis e continuam fundamentais na monitorização da sepse[19,20].

Estudos recentes sugerem que células fagocíticas, incluindo macrófagos e neutrófilos, contribuem na fisiopatologia de injúria pulmonar induzida por endotoxina[3,21]. Uma vez que os macrófagos estão normalmente presentes nos tecidos, a maioria dos neutrófilos em resposta à endotoxina migra do sangue para o pulmão[3]. Os resultados do presente estudo estão de acordo com Bowler *et al.*[22], que demonstraram aumento de neutrófilos em LBA tanto em valores absolutos quanto relativos. Estudo realizado por Sunil *et al.*[3] demonstrou que o número de neutrófilos aderentes à vasculatura pulmonar aumentou na endotoxemia aguda em ratos. Outros estudos[23,24] realizados em coelhos também comprovam esses achados.

Neste trabalho, as contagens total e diferencial dos leucócitos em sangue periférico e LBA foram efetivas para demonstrar de forma indireta a migração destas células para o sítio inflamatório/infeccioso.

Além de induzir o recrutamento de neutrófilos para o pulmão, a endotoxemia aumentou a atividade oxidante de MA através da produção do microbicida O_2^- . A produção desse agente oxidante é importante para a destruição dos microrganismos, porém sua produção excessiva pode causar danos às células do hospedeiro contribuindo na patogênese da injúria pulmonar. Vale ressaltar que, no presente estudo, não houve diferença significativa entre os grupos em relação às dosagens de ON no plasma e em sobrenadante de cultura de macrófagos. No entanto, houve uma tendência a níveis mais elevados de ON na endotoxemia.

Evans *et al.*, em 1993, encontraram aumento nos níveis de nitrato em pacientes sépticos comparados a pacientes normais[20,25]. Tagan *et al.*, em 1998, relataram um valor preditivo de 100% para a origem séptica do choque quando o nível de ON foi superior a 100mmol/L[20,26].

A avaliação da síntese de substâncias oxidantes é uma forma sensível e conveniente de se monitorar a função dos macrófagos[27]. Estudo demonstrou aumento na produção de O_2^- e ON em artéria pulmonar de ratos endotoxêmicos[28]. Ainda, alguns trabalhos revelam aumento na produção de O_2^- [29] e ON[30,31] em macrófagos no pulmão de ratos endotoxêmicos.

A atividade da enzima antioxidante SOD, nesta pesquisa, não diferiu entre os grupos. Contudo, assim como observado na produção de ON, também houve uma tendência a valores mais elevados após administração de LPS. Tal fato é de extrema importância uma vez que estudos prévios sugerem que a SOD atenua a injúria pulmonar

em vários modelos experimentais[22]. De acordo com alguns autores[22,32], a SOD pode modular a inflamação atenuando a liberação de citocinas pró-inflamatórias por MA, que recrutam os neutrófilos para o pulmão.

Apesar da indução de resposta inflamatória pulmonar, o presente trabalho diferentemente de outros[22,33] não demonstrou deficiência na atividade da SOD relacionada a este processo inflamatório. Esses resultados sugerem que neste sítio inflamatório/infeccioso, o pulmão, a SOD não modula a inflamação mesmo sem apresentar atividade reduzida.

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na resposta inflamatória pulmonar deve ser o primeiro passo para a definição de estratégias adequadas de redução de morbi-mortalidade.

Nesse estudo, utilizou-se um modelo de endotoxemia com todas as avaliações realizadas após 24 h da administração sistêmica de LPS. Assim, das análises realizadas nos animais endotoxêmicos pode-se constatar que houve recrutamento de neutrófilos para o pulmão e aumento na produção de O_2^- pelos MA. Este trabalho também demonstrou que a endotoxemia não alterou de forma significativa a produção de ON e de SOD em ratos.

Em conclusão, a endotoxemia induz uma resposta inflamatória no pulmão representada por recrutamento de neutrófilos para este órgão e um aumento na atividade oxidante dos MA. Porém, não altera a atividade antioxidante em ratos adultos. Tal fato potencializa a resposta contra agentes infecciosos pelo hospedeiro, mas também pode contribuir na patogênese de injúria pulmonar.

REFERÊNCIAS

1. De Castro CMMB, De Castro RM, Andrade AD, Brandt CT. LPS bacteriano: um mediador de inflamação. *An Fac Med Univ Fed Pernamb* 1997; 42:78-83.
2. Hewett JA, Roth RM. Hepatic and extrahepatic pathobiology of bacterial lipopolysaccharide. *Pharmacol Rev* 1993; 45:382-411.
3. Sunil VR, Connor AJ, Zhou P, Gordon MK, Laskin JD, Laskin DL. Activation of adherent vascular neutrophils in the lung during acute endotoxemia. *Respir Res* 2002; 3:21.
4. D'acampora AJ, Tramonte R, Carvalho ROM, Ortellado DK, Serafim JDM. Pulmão e Peritônio após Sepsis Experimental de Origem Abdominal em Ratos Wistar. *Rev Col Bras Cir* 2001; 28:276.
5. Wang CZ, Herndon DN, Traber LD, Yang SF, Cox RA, Nakazawa H, Barrow RE, Traber DL. Pulmonary inflammatory cell response to sustained endotoxin administration. *J Appl Physiol* 1994; 76:516-522.
6. Meyer J, Hinder F, Stothert J Jr, Traber LD, Herndon DN, Flynn JT, Traber DL. Increased organ blood flow in chronic endotoxemia is reversed by nitric oxide synthase inhibition. *J Appl Physiol* 1994; 76:2785-2793.
7. Amersfoort ESV, Berkel TJC, Kuiper J. Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16:379-414.
8. Garófolo A. Diretrizes para terapia nutricional em crianças com câncer em situação crítica. *Rev Nutr* 2005; 18:513-527.
9. Mafra D, Abdalla DSP, Cozzolino SMF. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. *Rev Nutr* 1999; 12:205-212.

10. Dinarello CA. Biological basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87:2065-2147.
11. Plata-Salamán CR. Anorexia during acute and chronic disease. *Nutrition* 1996; 12:69-78.
12. Luchi M, Morrison DC. Comparable Endotoxic Properties of Lipopolysaccharides Are Manifest in Diverse Clinical Isolates of Gram-Negative Bacteria. *Infect Immun* 2000; 68:1899-1904.
13. De Castro CMMB, Bureau MF, Nahori MA, Dumarey CH, Vargaftig BB, Bachelet M. Modulation by dexamethasone of phospholipase A₂ activities in endotoxemic guinea pigs. *J Appl Physiol* 1995; 79:1271-1277.
14. Johnston Jr RB. Measurement of O₂⁻ secreted by monocytes and macrophages. *Methods Enzymol* 1984; 105:365-369.
15. Feder LS, Laskin DL. Regulation of hepatic endothelial cell and macrophage proliferation and nitric oxide production by GM-CSF, M-CSF and IL-1 b following acute endotoxemia. *J Leukoc Biol* 1994; 55:507-513.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
17. Massoudy P, Zahler S, Becker BF, Braun SL, Barankay A, Meisner H. Evidence for inflammatory responses of the lungs during coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Chest* 2001; 119:31-36.
18. Boutten A, Dehoux MS, Seta N, Ostinelli J, Venembre P, Crestani B, Dombret MC, Durand G, Aubier M. Compartmentalized IL-8 and elastase release within the human lung in unilateral pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:336-342.

19. Friedman G, Lobo S, Rigato O. Consenso Brasileiro de Sepse. Diagnóstico, monitorização da resposta inflamatória. s.d.
20. Kreimer F, Aguiar JLA, Castro CMMB, Lacerda CM, Reis T, Júnior FL. Resposta terapêutica e inflamatória de ratos com peritonite secundária submetidos ao uso tópico de ampicilina/sulbactam. *Acta Cir Bras* 2005; 20:63-71.
21. Williams JH Jr, Patel SK, Hatakeyama D, Arian R, Guo K, Hickey TJ, Liao SY, Ulich TR. Activated pulmonary vascular neutrophils as early mediators of endotoxin-induced lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8:134-144.
22. Bowler RP, Nicks M, Tran K, Tanner G, Chang LY, Young SK, Worthen GS. Extracellular Superoxide Dismutase Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Neutrophilic Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31:432-439.
23. Haslett C, Worthen GS, Giclas PC, Morrison DC, Henson JE, Henson PM. The pulmonary vascular sequestration of neutrophils in endotoxemia is initiated by an effect of endotoxin on the neutrophil in the rabbit. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:9-18.
24. Keubler WM, Borges J, Sckell A, Kuhnle GE, Bergh K, Messmer K, Goetz AE. Role of L-selectin in leukocyte sequestration in lung capillaries in a rabbit model of endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:36-43.
25. Evans T, Carpenter A, Kinderman H, Cohen J. Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. *Circ Shock* 1993; 41: 77-81.
26. Tagan D, Eckert P, Markert M, Feihl F, Schaller MD. Blood nitrate levels in septic and cardiogenic shock. *Clin Int Care* 1998; 9:71-76.
27. Mayo LA, Curnutte JT. Kinetic microplate assay for SP by neutrophils and other phagocytic cells. *Methods Enzymol* 1990; 186:567-575.

28. Brovkovich V, Dobrucki LW, Brovkovich S, Dobrucki I, Kalinowski L, Kiechle F, Malinski T. Nitric Oxide Measurements during Endotoxemia. *Clin Chem* 2001; 47:1068-1074.
29. Wizemann TM, Laskin DL. Enhanced phagocytosis, chemotaxis, and production of reactive oxygen intermediates by interstitial lung macrophages following acute endotoxemia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11:358-365.
30. Fujii Y, Goldberg P, Hussain SNA. Contribution of Macrophages to Pulmonary Nitric Oxide Production in Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1645-1651.
31. Wizemann TM, Gardner CR, Laskin JD, Quinones S, Durham SK, Goller NL, Ohnishi ST, Laskin DL. Production of nitric oxide and peroxynitrite in the lung during acute endotoxemia. *J Leukoc Biol* 1994; 56:759-768.
32. Cox G, Crossley J, Xing Z. Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation *in vivo*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12:232-237.
33. Bowler RP, Arcaroli J, Abraham E, Patel M, Chang LY, Crapo JD. Evidence for extracellular superoxide dismutase as a mediator of hemorrhage-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284:680-687.

Tabela 1- Contagem de leucócitos em sangue e lavado broncoalveolar (LBA).

Os resultados são representados em média \pm erro-padrão para 12 animais.

Grupos	Contagem de células x 10 ³ /mL de sangue ou LBA			
	C		CLPS	
	Sangue	LBA	Sangue	LBA
Leucócitos totais	13,99 \pm 0,66	483,33 \pm 29,72	19,77 \pm 1,58*	683,33 \pm 82,41*
Monócitos/ Macrófagos	0,83 \pm 0,08 6,46 \pm 0,56%	458,16 \pm 29,35 94,64 \pm 0,82%	1,05 \pm 0,18 4,92 \pm 0,48%	551,25 \pm 70,30 80,68 \pm 2,67%*
Linfócitos	9,67 \pm 0,59 69,46 \pm 2,17%	13 \pm 2,36 2,92 \pm 0,51%	9,30 \pm 1,45 45,07 \pm 4,89%*	12,16 \pm 3,52 1,25 \pm 0,26%*
Eosinófilos	0,51 \pm 0,06 3,92 \pm 0,47%	2,91 \pm 1,58 0,57 \pm 0,27%	0,49 \pm 0,09 2,61 \pm 0,59%	5,25 \pm 2,64 0,62 \pm 0,23%
Neutrófilos	2,89 \pm 0,26 20 \pm 1,91%	9,25 \pm 2,21 1,85 \pm 0,41%	8,75 \pm 1,14* 47,38 \pm 4,93%*	114,66 \pm 18,92* 17,43 \pm 2,70%*

* p<0,05

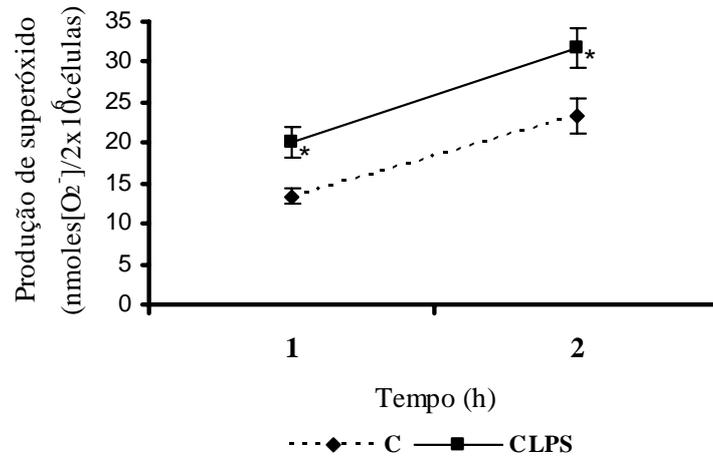


Figura 1- Produção de superóxido em sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados com PMA nos tempos de 1h e 2h. Os resultados são representados em média \pm erro-padrão para 12 animais. * $p < 0,05$.

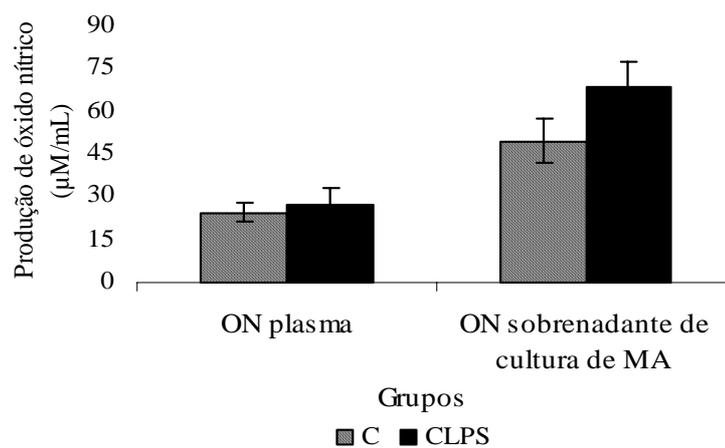


Figura 2- Produção de óxido nítrico (ON) em plasma e sobrenadante de cultura de macrófagos alveolares (MA). Os resultados são representados em média \pm erro-padrão para 12 animais. $p > 0,05$.

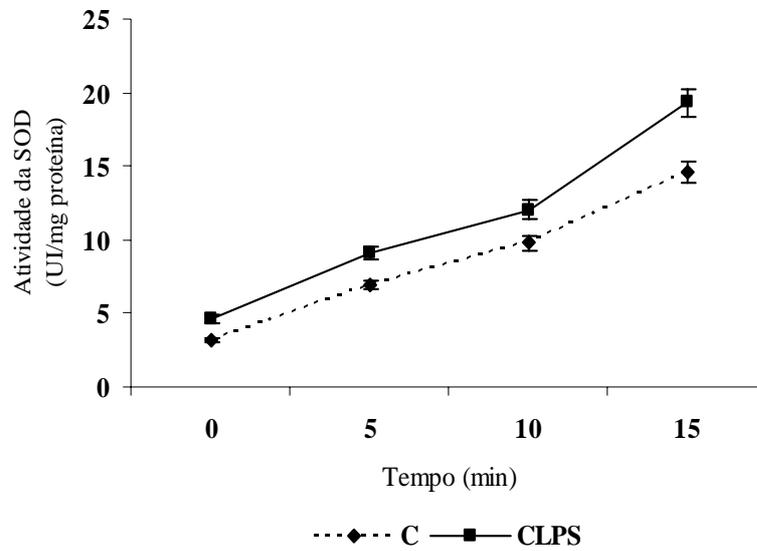


Figura 3- Atividade da superóxido dismutase (SOD) em sobrenadante de cultura de macrófagos nos tempos de 0, 5min, 10min e 15min. Os resultados são representados em média \pm erro-padrão para 12 animais. $p > 0,05$.

4 – ARTIGO III

Efeito da desnutrição neonatal sobre recrutamento celular e atividade oxidante-antioxidante de macrófagos na endotoxemia

Effect of neonatal malnutrition in cellular recruitment and oxidant-antioxidant activity by macrophages on the endotoxemia

Juliana Félix de Melo¹; Érika Michelle Correia de Macedo¹; Rebecca Peixoto Paes Silva¹; Marcelo Tavares Viana²; Wylla Tatiana Ferreira e Silva²; Célia Maria Machado Barbosa de Castro¹

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, UFPE, Setor de Microbiologia, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brasil.

²Laboratório de Fisiologia do Departamento de Nutrição, UFPE, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

Endereço para correspondência:

Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro.

Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami(LIKA)-Setor de Microbiologia-UFPE. Campus Universitário. Recife-PE. CEP: 50670-420. Tel: (81) 21268486 - ramal 27, Fax: (81) 21268485.

e-mail: ccastro@lika.ufpe.br

Título abreviado: Desnutrição neonatal e endotoxemia em ratos

Short title: Neonatal malnutrition and endotoxemia in rats

Trabalho financiado pelo CNPq (4770004/04-0).

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar se a desnutrição no período neonatal produz prejuízos no recrutamento celular para o pulmão e na atividade oxidante-antioxidante de macrófagos alveolares em ratos adultos endotoxêmicos. **MÉTODOS:** Ratos machos Wistar (n=48) foram amamentados por mães cuja dieta durante a lactação continha 23% de proteína no grupo nutrido ou 8% no grupo desnutrido. Após o desmame, todos foram recuperados com dieta normoprotéica. Entre 90 e 120 dias, metade de cada grupo foi submetida à endotoxemia. Nos animais endotoxêmicos foi administrado, via intraperitoneal, lipopolissacarídeo na dose de 1mg/kg de peso corporal. 24 h após esse procedimento, coletou-se sangue para contagem total e diferencial de leucócitos e dosagem de óxido nítrico. Além do sangue, coletou-se lavado broncoalveolar para contagem total e diferencial dos leucócitos e, a partir de macrófagos isolados deste lavado, foram realizadas as seguintes dosagens: superóxido, óxido nítrico e superóxido dismutase. **RESULTADOS:** A desnutrição acarretou déficit ponderal que persistiu até a idade adulta, reduziu a contagem total de leucócitos sanguíneos e o número de neutrófilos após estímulo com lipopolissacarídeo, reduziu a produção de superóxido, óxido nítrico e superóxido dismutase antes e após endotoxemia. **CONCLUSÕES:** Esses resultados sugerem que a desnutrição neonatal, mesmo após recuperação nutricional, compromete o recrutamento celular para o pulmão e a atividade oxidante-antioxidante dos macrófagos alveolares em ratos adultos. A endotoxemia contribuiu para evidenciar essas seqüelas da resposta do hospedeiro frente a este modelo de desnutrição.

Termos de indexação: desnutrição; endotoxemia; migração e rolagem de leucócitos; superóxidos; espécies reativas de nitrogênio; superóxido dismutase.

ABSTRACT

OBJECTIVE: The objective of the present study was to investigate the effects of neonatal malnutrition on the cellular recruitment to lung and oxidant-antioxidant activity by alveolar macrophages in endotoxemic adult rats. **METHODS:** Male Wistar rats (n=48) were suckled by dams that received experimental diet during lactation, containing 23% of protein for nourished group and 8% of protein for undernourished group. After weaning, all animals were recovered with normoproteic diet. At 90 to 120 days of age, half of each group was submitted to endotoxemia. In the endotoxemic animals was administrated, intraperitoneally, lipopolysaccharide in the dose of 1mg/kg of body weight. 24 h after this procedure, was collected blood for total and differential leukocytes counting and nitric oxide dosage. In addition, was collected bronchoalveolar lavage for total and differential leukocytes counting and, from this lavage macrophages were isolated for the following dosages: superoxide, nitric oxide and superoxide dismutase. **RESULTS:** The malnutrition caused weight deficit that persisted until the adult age, it reduced the total counting of blood leukocytes and the number of neutrophils after stimulus with lipopolysaccharide, reduced the production of superoxide, nitric oxide and superoxide dismutase before and after endotoxemia. **CONCLUSIONS:** These results suggest that neonatal malnutrition, even after nutritional recovery, compromise the cellular recruitment to lung and the oxidant-antioxidant activity by alveolar macrophages in adult rats. The endotoxemia contribute to evidence these sequelae of host response front to this model of malnutrition.

Indexing terms: malnutrition; endotoxemia; leukocyte rolling; superoxides; reactive nitrogen species; superoxide dismutase.

INTRODUÇÃO

Atuando no período crítico de desenvolvimento dos sistemas orgânicos, a deficiência nutricional é capaz de interferir na formação de processos essenciais para a defesa do hospedeiro¹. Nessa etapa da vida, agressões nutricionais poderão ocasionar comprometimento do sistema imunológico, com seqüelas na capacidade de defesa do indivíduo adulto¹. Dependendo da intensidade e da duração das alterações nutricionais, as conseqüências terão impacto maior ou menor sobre todo o organismo no futuro².

Na desnutrição, a maioria dos mecanismos de defesa do organismo está prejudicada³. Além disso, a infecção é a maior causa de morbidade e mortalidade em indivíduos severamente desnutridos⁴.

A desnutrição calórico-protéica está associada com o enfraquecimento da imunidade mediada por células, da função fagocítica, do sistema de complemento, da concentração de anticorpos e da produção de citocinas⁵. Nesta condição várias funções dos macrófagos encontram-se comprometidas⁶. Estas células são de importância fundamental no controle e resolução dos processos infecciosos e na regulação da homeostase por serem iniciadoras da resposta inflamatória, por participarem do processo de reparação tecidual e por estarem envolvidas na resposta imune tanto inata quanto adaptativa.

A administração parenteral de endotoxina proveniente de bactérias gram negativas, como o lipopolissacarídeo (LPS), induz a migração de leucócitos sanguíneos para o sítio inflamatório/infeccioso. Nesse particular, o pulmão é sensível aos efeitos do LPS, seguido do fígado, intestino e rim⁷.

No foco de injúria tecidual, fatores quimiotáticos atraem células sanguíneas que, por diapedese, atravessam a barreira endotelial. Dentre estas células, os neutrófilos estão

em maior número, seguidos dos monócitos que se transformam em macrófagos nos tecidos.

A ativação dos macrófagos por endotoxinas induz a produção intracelular do ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e outros potentes produtos microbicidas que são responsáveis pela destruição dos microrganismos fagocitados^{8,9}. O conjunto de substâncias, como a enzima superóxido dismutase (SOD), que neutraliza os efeitos danosos dos radicais livres de oxigênio constitui o sistema de defesa antioxidante¹⁰.

Em função da alta prevalência de desnutrição nos países em desenvolvimento é importante a realização de trabalhos experimentais a fim de avaliar suas conseqüências nos diversos sistemas orgânicos. Assim, torna-se de extrema importância o estudo de eventuais relações entre a desnutrição neonatal seguida de recuperação nutricional e a resposta inflamatória, durante o curso de uma infecção no organismo adulto. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da desnutrição neonatal, seguida de recuperação nutricional, sobre recrutamento celular para o pulmão e atividade oxidante e antioxidante de macrófagos alveolares após endotoxemia em ratos adultos.

METODOLOGIA

Animais e dietas

Foram utilizados 48 ratos machos Wistar (90-120 dias), provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. Os animais foram mantidos em biotério com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ C$), ciclo claro-escuro de 12:12h e livre acesso à água e ração. Um dia após o nascimento, a ninhada foi padronizada em 6 filhotes machos por mãe. Neste mesmo dia, adotado

como primeiro dia de vida do animal, as ninhadas foram divididas em 2 grupos: Nutrido (N) – constituído por 24 filhotes amamentados por mães submetidas à dieta contendo 23% de proteína (Labina-Purina do Brasil); Desnutrido (D) - constituído por 24 filhotes amamentados por mães submetidas à dieta contendo 8% de proteína (Dieta Básica Regional –DBR-)¹¹ durante os primeiros 21 dias após o nascimento. Nesse período, foram registrados diariamente os pesos corporais em balança eletrônica digital (Marte, modelo S-4000) a fim de monitorar o peso durante a manipulação nutricional. A partir do 22º dia de vida até o final do experimento, a pesagem era realizada em dias alternados, objetivando acompanhar a recuperação nutricional dos animais. Após o desmame (22º dia), os animais foram separados de suas mães e passaram a receber dieta contendo 23% de proteína (Labina-Purina do Brasil) até o final do experimento.

Administração de LPS

No período dos experimentos (90-120 dias), o grupo Nutrido (N) foi dividido em dois grupos: Nutrido (N) e Nutrido Endotoxêmico (NLPS). Da mesma forma, o grupo Desnutrido (D) foi dividido em dois grupos: Desnutrido (D) e Desnutrido Endotoxêmico (DLPS). Para obtenção dos grupos endotoxêmicos (NLPS e DLPS), os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de LPS (sorotipo de *Escherichia coli*; 055:B5, Sigma) na dose de 1mg/kg de peso corporal, preparado com NaCl a 0,9%. Os grupos N e D receberam, pela mesma via, NaCl a 0,9% em igual proporção. Vinte e quatro horas após a administração do LPS, coletaram-se sangue e lavado broncoalveolar (LBA) de cada animal para estudo.

Análise das células do sangue periférico

Coletou-se alíquota de sangue (0,5 mL) da cauda dos animais para a contagem das células. Utilizou-se a solução de TURK para a contagem total. Os leucócitos foram

contados em Câmara de Neubauer com auxílio do microscópio óptico (sob lente 40x de aumento). Para a contagem diferencial utilizou-se a técnica do estiraço sanguíneo, e as lâminas foram coradas com o kit Panótico Rápido, LB-Laborclin Ltda. Após preparação, foram examinadas ao microscópio óptico com objetiva de 100x sob imersão. Os diferentes elementos foram contabilizados pelo contador eletrônico da marca Kacil com teclas correspondentes a cada tipo de célula. A partir dos dados obtidos foram calculados os valores absolutos e relativos para cada tipo de célula.

Lavado broncoalveolar (LBA)

O lavado broncoalveolar foi obtido de acordo com a técnica utilizada por De Castro *et al.*¹². Os animais foram anestesiados com uretana 12.5% na proporção de 8 mL/kg i.p. O LBA foi coletado com a injeção de salina a 0,9% através de uma cânula plástica inserida na traquéia. Várias alíquotas de 3 mL foram injetadas e coletadas em tubos cônicos de polipropileno de 50 mL (Falcon, Sigma). Recuperou-se aproximadamente 30 mL de LBA para cada animal.

Análise das células do lavado broncoalveolar

A contagem total das células foi realizada a partir de uma amostra do LBA, diluição de 1:10, em corante azul trypan. A contagem diferencial foi realizada a partir de lâminas citocentrifugadas a 800rpm/10min (CytoproTM-Cytocentrifuge Wescor), coradas com o kit Panótico Rápido e lidas ao microscópio óptico com objetiva de 100x sob imersão. A partir dos dados obtidos foram calculados os valores absolutos e relativos para cada tipo de célula.

Cultura de macrófagos alveolares (MA)

Centrifugou-se o LBA recolhido a 1500rpm durante 15min. O precipitado que corresponde às células foi ressuspensionado em meio de cultura (RPMI 1640, Gibco-

Invitrogen Corporation) contendo soro fetal bovino (3%, Gibco-Invitrogen Corporation) e antibióticos (penicilina 100U/mL e estreptomicina 100µg/mL). As células foram transferidas para placas de cultura de 35 mm de diâmetro (6 poços, Falcon), onde foram dispensados 2 mL da suspensão em uma proporção de 10^6 células/mL de RPMI 1640 em cada poço. Após 1h na incubadora a 37°C e 5% CO₂, desprezou-se o sobrenadante com as células não aderentes e adicionou-se 2 mL de meio RPMI, deixando-se as placas por mais 1h em incubadora para estabilização das células.

Análise da produção de superóxido (O₂⁻)

O₂⁻ foi induzido pela adição de acetato miristato de forbol (PMA, Sigma) em solução de Hanks (HBSS, Gibco-Invitrogen Corporation), na concentração de 2µg/mL. Foram preparados 2 sistemas de análise descontínua com avaliação a cada 1 hora, por 2 horas. A especificidade do ensaio foi garantida pela adição de superóxido dismutase (SOD) de eritrócitos bovinos (Sigma - contendo 3000U/mg de proteína em solução final de 3mg/mL em água destilada). Para o preparo destes sistemas foram utilizados macrófagos em cultura (2×10^6 células por 2mL de RPMI 1640), com ou sem a presença de SOD. Os sistemas foram mantidos em incubadora a 37°C, atmosfera úmida, 5% de CO₂, por 10min (ativação da SOD). O ferrocitocromo c tipo IV de mitocôndria de coração de cavalo, (30mg/mL em HBSS, 2.4×10^{-3} M, Sigma) foi adicionado às células para quantificar a formação de O₂⁻ através da redução do ferrocitocromo c. Amostras de 700µl foram retiradas de cada sistema. A 1ª alíquota recolhida correspondia ao tempo "zero" de cada sistema e as amostras subseqüentes foram coletadas em intervalos regulares de tempo. Medidas espectrofotométricas foram realizadas a 550nm para determinar o grau de redução do ferrocitocromo c dos sobrenadantes. A curva de O₂⁻ foi

obtida pela conversão dos valores de absorvância para nanomoles de O_2^- /min usando-se a fórmula: $[O] = 205,49 \times \text{valor da absorvância} \times \text{volume da amostra coletada}^{13}$.

Liberação de óxido nítrico (ON)

A produção de ON foi determinada a partir de plasma e de macrófagos em cultura segundo o método descrito por Feder & Laskin¹⁴. Após 24h de estímulo *in vitro* com LPS (10 $\mu\text{g/mL}$), os macrófagos estimulados e os não estimulados com LPS foram avaliados quanto à liberação de ON. A concentração de nitrito/nitrato, medida indireta da síntese de ON, foi calculada pela média de uma curva padrão de NaNO_2 e os dados foram expressos em $\mu\text{M/mL}$ de nitrito/nitrato.

Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo preparo de 4 sistemas com avaliação nos tempos de 0, 5, 10 e 15min. Para o preparo destes sistemas, foram utilizados macrófagos em cultura (2×10^6 células por 2mL de RPMI 1640), solução tampão fosfato (50mM pH 7,8), citocromo c (Sigma - 0,3mM - 4 $\mu\text{cg/mL}$ em solução tampão), xantina oxidase (XOD) (Sigma - 25U - 56mU/mL em solução tampão) e SOD (Sigma - 3000U/mg de proteína em solução final de 3mg/mL em água destilada). Aos 4 sistemas foram adicionados solução tampão fosfato, citocromo c e hipoxantina. Ao 2º sistema, além desses reagentes, também foi adicionada a XOD. Os sistemas 3 e 4 foram acrescidos de todos os reagentes, sendo que a SOD em quantidades diferentes (sistema 3 - SOD 1,5mg/mL; sistema 4 - SOD 3mg/mL). Amostras de 700 μl foram retiradas de cada sistema nos tempos determinados (à temperatura de 25°C), sendo efetuadas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro a 550nm. Para os resultados finais, as proteínas foram determinadas pelo método de Lowry¹⁶ e os dados expressos em UI de SOD por mg de proteína.

Análise estatística

Na comparação entre os grupos, utilizou-se o teste t de Student para os dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para os dados não paramétricos. Os resultados foram representados em média \pm erro-padrão. A significância foi definida para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Peso corporal na desnutrição e recuperação nutricional

Nos primeiros dias de vida, os pesos (g) corporais dos grupos nutrido (N) e desnutrido (D) foram semelhantes até o 3º dia. A partir do 4º dia até o 21º dia pós-natal, os valores dos pesos corporais dos animais desnutridos foram menores ($p < 0,05$) em relação aos animais nutridos. Entre o 23º e o 89º dia de vida (recuperação nutricional), os valores dos pesos do grupo desnutrido permaneceram menores ($p < 0,05$) quando comparados aos do grupo nutrido (Figura 1).

Contagens total e diferencial de leucócitos sanguíneos

Os dados da contagem de leucócitos no sangue periférico (Tabela 1) indicam que a desnutrição neonatal não alterou o número de leucócitos totais e neutrófilos quando comparados os grupos nutrido (N) e desnutrido (D). No entanto, animais desnutridos mostraram uma redução ($p < 0,05$) nos valores de monócitos e eosinófilos com um aumento ($p < 0,05$) no número de linfócitos quando comparados aos animais nutridos. Na presença de estímulo com LPS, houve redução ($p < 0,05$) nos valores de leucócitos totais, monócitos, eosinófilos e neutrófilos no grupo desnutrido endotoxêmico (DLPS) em relação ao grupo nutrido endotoxêmico (NLPS). Não houve diferença entre NLPS e DLPS quanto ao número de linfócitos.

Contagens total e diferencial de leucócitos do LBA

Os dados da contagem de leucócitos no LBA (Tabela 1) indicam que a dieta deficiente ocasionou redução ($p < 0,05$) nos valores de macrófagos alveolares em animais desnutridos quando comparados aos nutridos. Nesse caso, não foram observadas diferenças quanto ao número de leucócitos totais, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos. Na endotoxemia, houve redução ($p < 0,05$) de neutrófilos com aumento ($p < 0,05$) de macrófagos no grupo de animais desnutridos endotoxêmicos (DLPS) quando comparado ao grupo de animais nutridos endotoxêmicos (NLPS). Não houve diferença entre os grupos NLPS e DLPS quanto ao número de leucócitos totais, linfócitos e eosinófilos.

Liberação de superóxido por macrófagos

A produção de superóxido (O_2^-) em sobrenadante de cultura de macrófagos (Tabela 2) mostrou-se reduzida ($p < 0,05$) em animais desnutridos em relação aos animais nutridos após 2h de estímulo dos macrófagos com PMA. Na endotoxemia, houve redução ($p < 0,05$) na produção de O_2^- após 1h e 2h de estímulo com PMA no grupo de animais desnutridos endotoxêmicos (DLPS) em relação ao grupo de animais nutridos endotoxêmicos (NLPS).

Produção de óxido nítrico

Em plasma, a produção média de ON (Tabela 2) foi reduzida ($p < 0,05$) no grupo desnutrido em relação ao grupo nutrido. No entanto, não houve diferença entre os grupos de animais nutridos endotoxêmicos (NLPS) e desnutridos endotoxêmicos (DLPS). Em sobrenadante de cultura de macrófagos não estimulados com LPS *in vitro*, houve redução ($p < 0,05$) na produção de ON no grupo DLPS em relação ao grupo NLPS. Nesse caso, não houve diferença entre os animais do grupo nutrido (N) e

desnutrido (D). Em sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados com LPS *in vitro*, houve redução ($p < 0,05$) significativa na produção de ON em animais desnutridos quando comparados aos animais nutridos. Entretanto, não se observou diferença entre os grupos NLPS e DLPS.

Atividade da SOD

A atividade da SOD (Figura 2) mostrou-se reduzida ($p < 0,05$) em animais desnutridos em relação aos animais nutridos nos tempos de 10min e 15min. Na presença de estímulo com LPS, houve redução ($p < 0,05$) na atividade da SOD nos tempos de 0, 5min, 10min e 15min no grupo de animais desnutridos endotoxêmicos em relação ao grupo de animais nutridos endotoxêmicos.

DISCUSSÃO

No presente estudo, a desnutrição imposta no período neonatal, seguida de recuperação nutricional, produziu seqüela no animal adulto. Assim, este modelo de desnutrição causou redução do recrutamento de células inflamatórias para o pulmão na presença ou não de estímulo com LPS, comprometeu a atividade oxidante-antioxidante de macrófagos alveolares (MA) antes e após endotoxemia, e acarretou déficit ponderal com início ainda no aleitamento e persistindo até a vida adulta do animal.

Em sua maioria, a DBR é constituída em sua composição por 96% de proteína de origem vegetal e apenas 4% de proteína de origem animal¹¹, o que a torna ainda mais deficiente em termos protéicos. Os dados do presente trabalho mostram que a desnutrição neonatal produziu reduções do peso corporal tanto no período de aleitamento quanto na fase de recuperação nutricional. Já aos 4 dias de idade observa-se peso menor nos animais desnutridos quando comparados aos animais nutridos. Tal

redução já foi descrita em estudos^{16,17} que empregaram a DBR como modelo experimental de desnutrição. A oferta de dieta normoprotéica a partir do desmame não se mostrou suficiente para igualar os pesos dos animais desnutridos e dos animais nutridos. Esta interferência no crescimento e desenvolvimento corporais dos filhotes aleitados pode ter sido provocada por um comprometimento na qualidade do leite materno, através da desnutrição protéica sofrida pelas ratas durante a lactação.

Além de causar déficit permanente no peso corporal, a desnutrição, no período de expansão das populações de leucócitos e formação de órgãos linfóides¹⁸, ocasionou redução do recrutamento destas células para o pulmão de ratos na idade adulta. Tal fato foi observado pela diminuição de MA em animais desnutridos precocemente. Além disso, a desnutrição reduziu de forma marcante o recrutamento de neutrófilos após administração sistêmica de LPS. As contagens total e diferencial dos leucócitos em sangue periférico e LBA foram efetivas para demonstrar de forma indireta a migração destas células para o sítio inflamatório/infeccioso.

Ainda não existem pesquisas relacionando desnutrição neonatal seguida de recuperação nutricional com o recrutamento celular para o pulmão no animal adulto. Neutrófilos e macrófagos são fagócitos e têm a capacidade de internalizar partículas inertes, células alteradas do indivíduo, microrganismos e parasitas. Os sinais quimiotáticos gerados no local da inflamação são os responsáveis pelo recrutamento das células fagocíticas. Esses fagócitos migram da corrente sanguínea para o local onde há lesão tecidual¹⁹.

Estudos revelam diminuição no número de macrófagos peritoneais²⁰ e MA²¹ na desnutrição. Ainda, outros trabalhos^{22,23} demonstraram que a desnutrição inibiu a migração de neutrófilos para o foco inflamatório de camundongos sem, no entanto,

avaliarem a interferência da endotoxemia no modelo experimental de desnutrição. Nesta pesquisa, a diminuição do número de neutrófilos recrutados para o pulmão, evidenciada somente após a endotoxemia, pode sugerir que a desnutrição neonatal causa um maior comprometimento da resposta inflamatória frente às infecções na vida adulta.

A desnutrição reduz a imunidade em geral, sobretudo, provoca alterações no pulmão, comprometendo a função dos macrófagos alveolares. De acordo com Souza *et al.*²⁴, diante de estímulos inflamatórios, os macrófagos de animais desnutridos não respondem com a mesma intensidade ou da mesma maneira que os macrófagos oriundos dos animais nutridos, possibilitando ou permitindo, o desenvolvimento dos processos inflamatórios e/ou infecciosos.

A avaliação da síntese de substâncias oxidantes é uma forma sensível e conveniente de se monitorar a função dos macrófagos²⁵. Neste estudo, demonstrou-se que a desnutrição neonatal reduziu a liberação de O_2^- , um potente microbicida natural²⁵, por MA na vida adulta. Redmond *et al.*²⁶ relataram prejuízos na produção de O_2^- em macrófagos peritoneais de animais com desnutrição ocorrida por curto ou longo período. Em macrófagos alveolares, estudo realizado em nosso laboratório¹⁶ comprovou redução na produção de O_2^- utilizando-se o mesmo modelo de desnutrição empregado no presente trabalho. Vale ressaltar que, nesta pesquisa, a produção de O_2^- mostrou-se reduzida desde a 1ª h de estímulo com PMA nos animais desnutridos endotoxêmicos. Já no grupo de animais desnutridos não endotoxêmicos, tal fato foi observado apenas 2h após estímulo de MA com PMA. Esses resultados sugerem maior prejuízo na função microbicida de macrófagos de animais desnutridos após endotoxemia permitindo evidenciar, após estímulo com LPS, um maior comprometimento na produção de O_2^- .

Assim como observado para a síntese de O_2^- , a desnutrição neonatal também acarretou prejuízo na liberação de ON em sobrenadante de cultura de MA além do plasma.

Neste trabalho, quando a produção de ON em macrófagos foi induzida pelo estímulo por 24h com o LPS, *in vitro*, houve redução desta síntese nos animais desnutridos. No plasma também observou-se redução dos níveis de ON no grupo desnutrido. Alguns estudos mostram déficit na produção de ON na desnutrição^{27,28}. Dong *et al.*²⁹ verificaram diminuição na liberação desse agente microbicida por MA de ratos desnutridos. Contudo, esses trabalhos não se referem a situações de endotoxemia e desnutrição neonatal. Nesta pesquisa foi evidenciada redução na liberação de ON por macrófagos não tratados com LPS, *in vitro*, após endotoxemia. A desnutrição veio a acentuar esse efeito.

A atividade da enzima antioxidante SOD, neste estudo, mostrou-se reduzida em MA de ratos adultos submetidos à desnutrição neonatal. Isto foi observado na presença ou não de endotoxemia. De acordo com Leite & Sarni³⁰, o desequilíbrio entre a produção de radicais livres, como superóxido e óxido nítrico, e sua neutralização poderia ser explicado pela diminuição das defesas antioxidantes que ocorre durante a desnutrição. Estudos demonstram atividade reduzida da SOD em soro de crianças desnutridas^{31,32}. Outro estudo³³ demonstra que ocorre redução na atividade da SOD em tecido pulmonar na deficiência nutricional, porém não há relatos na literatura quanto à produção desta enzima por MA neste modelo de desnutrição. Apesar da importância da SOD em impedir o acúmulo de radicais livres de oxigênio, como O_2^- , é bem provável que a atividade reduzida desta enzima tenha sido evidenciada em virtude de uma marcante redução na produção do agente oxidante O_2^- . Outro fato que deve ser

salientado é que na endotoxemia, esta redução foi observada em todos os tempos de avaliação (0-15min), enquanto que na ausência de estímulo com LPS tal situação foi evidenciada apenas a partir dos 10min. Em adição, esses dados podem indicar que a desnutrição neonatal causa comprometimento no sistema de defesa antioxidante, e que essa situação acrescida de um estímulo como a endotoxemia provoca maior comprometimento da resposta do animal na vida adulta.

Apesar de existirem muitos estudos sobre o efeito da desnutrição sobre o sistema imune, ainda há muito a ser investigado a cerca do seu efeito tardio pós recuperação nutricional. Dessa forma, os dados encontrados nesta pesquisa devem servir de subsídio para outros trabalhos com o objetivo de investigar o significado funcional das alterações nesse sistema de defesa oxidante-antioxidante em animais desnutridos endotoxêmicos.

Este estudo permite sugerir que a desnutrição neonatal, mesmo seguida de recuperação nutricional, compromete a resposta inflamatória pulmonar de ratos adultos diminuindo o recrutamento de células inflamatórias para o pulmão e a atividade oxidante-antioxidante dos macrófagos alveolares. A endotoxemia contribui para evidenciar essas seqüelas da resposta do hospedeiro frente a este modelo de desnutrição.

REFERÊNCIAS

1. Cunningham-Rundles S, Mcneeley DF, Moon A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 115:1119-28.
2. Guedes RCA, Melo APR, Teodosio NR. Nutrição adequada: a base do funcionamento cerebral. *Cienc Cult.* 2004; 56 (1):32-5.
3. Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr.* 1997; 66 (2):460-3.
4. Morgan G. What, if any, is the effect of malnutrition on immunological competence? *The Lancet.* 1997; 349:1693-5.
5. Chandra RK. Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr.* 2002; 3:73-6.
6. Borelli P, Souza IP, Borojevic R, Dagli MLZ, Kang HC. Protein Malnutrition: Some Aspects of the in vitro adhesion of peritoneal mouse macrophages. *Ann Nutr Metab.* 1998; 42:367-73.
7. Welbourn CRB, Young Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *Br J Surg.* 1992; 79:998-03.
8. Meyer J, Hinder F, Stothert J Jr, Traber LD, Herndon DN, Flynn JT, Traber DL. Increased organ blood flow in chronic endotoxemia is reversed by nitric oxide synthase inhibition. *J Appl Physiol.* 1994; 76(6):2785-93.
9. Amersfoort ESV, Berkel TJC, Kuiper J. Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. *Clin Microbiol.* 2003; 16(3):379-414.
10. Andrade Júnior DR, Souza RB, Santos SA, Andrade DR. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J Bras Pneumol.* 2005; 31(1):60-8.

11. Teodósio NR, Lago ES, Romani SAM, Guedes RCA. Regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoamer Nutr.* 1990; 40(4):533-47.
12. De Castro CMMB, Bureau MF, Nahori MA, Dumarey CH, Vargaftig BB, Bachelet M. Modulation by dexamethasone of phospholipase A₂ activities in endotoxemic guinea pigs. *J Appl Physiol.* 1995; 79:1271-77.
13. Johnston Jr RB. Measurement of O₂⁻ secreted by monocytes and macrophages. *Methods Enzymol.* 1984; 105:365-9.
14. Feder LS, Laskin DL. Regulation of hepatic endothelial cell and macrophage proliferation and nitric oxide production by GM-CSF, M-CSF and IL-1 b following acute endotoxemia. *J Leukoc Biol.* 1994; 55:507-13.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-75.
16. Queiros-Santos A. Desnutrição precoce e estresse agudo: aspectos da resposta imunitária em ratos adultos [dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2000.
17. Prazeres FG, Pessoa DCNP, Bion FM, Arnauld TMS. Exercício físico, crescimento e desenvolvimento: estudo em ratos jovens desnutridos pela dieta básica regional (DBR) e recuperados nutricionalmente. *Rev bras Educ Fís Esp.* 2004; 18(1):7-16.
18. Klasing KC. Nutritional Modulation of Resistance to Infections Diseases. *Poultry Sci.* 1998; 77(8):1119-25.
19. Ben Baruch A, Michiel DF, Oppenheim JJ. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem.* 1995; 270:11703-6.

20. Revillard JP, Cozon G. Experimental models and mechanisms of immune deficiencies of nutritional origin. *Food Addit Contam.* 1990;1:82-6.
21. Boles JM, Renault A, Menez JF, Garo B, Youinou P. Dénutrition et immunité respiratoire. *Nutr Clin Métab.* 1994; 8(1):39-44.
22. Borelli P, Mariano M, Borojevic R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. *Nutr Res.* 1995; 15(10):1477-85.
23. Ikeda S, Saito H, Inoue T, Fukatsu K, Han I, Furukawa S, Matsuda T, Hidemura A. Malnutrition impairs CD11b/CD18 expression on circulating polymorphonuclear neutrophils and subsequent exudation into inflammatory sites in the early phase of glycogen-induced murine peritonitis. *J Parenter Enteral Nutr.* 2000; 24(5):276-9.
24. Souza IP, Kang HC, Nardinele L, Borelli P. Desnutrição protéica: efeito sobre o espriamento, fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoneais. *Rev Bras Cienc Farm.* 2001; 37(2):143-51.
25. De Castro CMMB, De Castro RM, Medeiros AF, Santos AQ, Silva WTF, Filho JLL. Effect of stress on the production of O_2^- in alveolar macrophages. *J Neuroimmunol.* 2000; 108(1/2):68-72.
26. Redmond HP, Leon P, Lieberman MD, Hofmann K, Shou J, Reynolds JV, Goldfine J, Johnston RBJr, Daly JM. Impaired macrophage function in severe protein-energy malnutrition. *Arch Surg.* 1991;126(2):192-6.
27. Chan J, Tian Y, Tanaka KE, Tsang MS, Yu K, Salgame P, Carroll D, Kress Y, Teitelbaum R, Bloom BR. Effects of protein calorie malnutrition on tuberculosis in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93:14857-61.

28. Anstead GM, Chandrasekar B, Zhao W, Yang J, Perez LE, Melby PC. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infection and Immunity*. 2001; 69:4709-18.
29. Dong W, Selgrade MJK, Gilmour MI, Lange RW, Park P, Luster MI, Kari FW. Altered alveolar macrophage function in calorie-restricted rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998; 19:462-9.
30. Leite HP, Sarni RS. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. *Rev Bras Nutr Clin*. 2003; 18(2):87-94.
31. Shaaban SY, Nassar MF, Ibrahim SA, Mahmoud SE. Impact of nutritional rehabilitation on enzymatic antioxidant levels in protein energy malnutrition. *East Mediterr Health J*. 2002; 8(2-3):290-7.
32. Gupta P, Narang M, Banerjee BD, Basu S. Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers: a case control study. *BMC Pediatr*. 2004; 4:14.
33. Jimoh FO, Odotuga AA, Oladiji AT. Status of Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in the Tissues of Rats Fed Low-Protein Diet. *Pakistan J Nutr*. 2005;4(6):431-4.

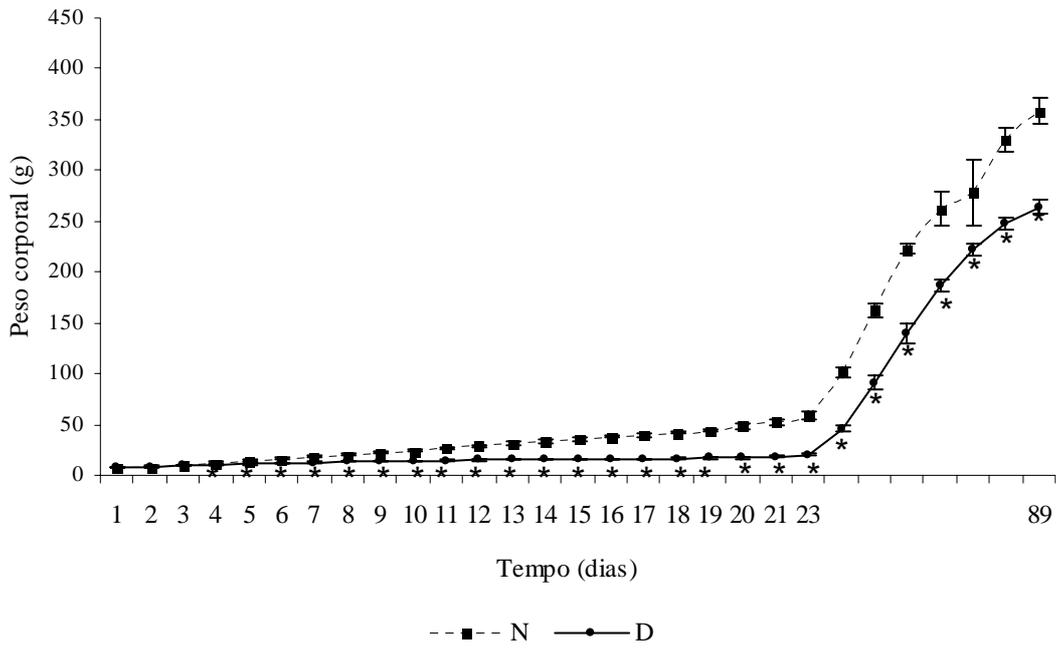


Figura 1- Evolução da curva ponderal durante a desnutrição neonatal (21 dias) e recuperação nutricional (23-89 dias) dos grupos Nutrido (N) e Desnutrido (D). Dados expressos em média \pm erro-padrão para 24 animais. * $p < 0,05$.

Tabela 1- Contagem de leucócitos em sangue e lavado broncoalveolar (LBA). Os resultados são representados em média ± erro-padrão para 12 animais.

Grupos	Contagem de células x 10 ³ /mL de sangue ou LBA			
	N	D	NLPS	DLPS
Sangue				
Leucócitos totais	13,99 ± 0,66	12,44 ± 1,07	19,77 ± 1,58	13,49 ± 1,01 [#]
Monócitos	0,83 ± 0,08 6,46 ± 0,56%	0,06 ± 0,02* 0,58 ± 0,19%*	1,05 ± 0,18 4,92 ± 0,48%	0,43 ± 0,14 [#] 2,91 ± 0,93% [#]
Linfócitos	9,67 ± 0,59 69,46 ± 2,17%	9,81 ± 1,08 77,08 ± 2,89%*	9,30 ± 1,45 45,07 ± 4,89%	6,84 ± 0,63 50,75 ± 3,45%
Eosinófilos	0,51 ± 0,06 3,92 ± 0,47%	0,13 ± 0,03* 1,25 ± 0,37%*	0,49 ± 0,09 2,61 ± 0,59%	0,19 ± 0,05 [#] 1,33 ± 0,41%
Neutrófilos	2,89 ± 0,26 20 ± 1,91%	2,40 ± 0,20 21,08 ± 2,93%	8,75 ± 1,14 47,38 ± 4,93%	6 ± 0,57 [#] 45 ± 3,37%
LBA				
Leucócitos totais	483,33 ± 29,72	400 ± 24,61	683,33 ± 82,41	575 ± 80,83
Macrófagos	458,16 ± 29,35 94,64 ± 0,82%	370,66 ± 22,93* 92,83 ± 1,11%	551,25 ± 70,30 80,68 ± 2,67%	511,08 ± 74,37 89,66 ± 2,48% [#]
Linfócitos	13 ± 2,36 2,92 ± 0,51%	19,16 ± 5,26 4,58 ± 1,10%	12,16 ± 3,52 1,25 ± 0,26%	20 ± 6,15 3,33 ± 0,98%
Eosinófilos	2,91 ± 1,58 0,57 ± 0,27%	0,66 ± 0,44 0,16 ± 0,11%	5,25 ± 2,64 0,62 ± 0,23%	3,33 ± 1,52 0,41 ± 0,19%
Neutrófilos	9,25 ± 2,21 1,85 ± 0,41%	9,5 ± 2,34 2,41 ± 0,58%	114,66 ± 18,92 17,43 ± 2,70%	40,58 ± 18,83 [#] 6,58 ± 2,43% [#]

* p<0,05 na comparação entre os grupos N e D.

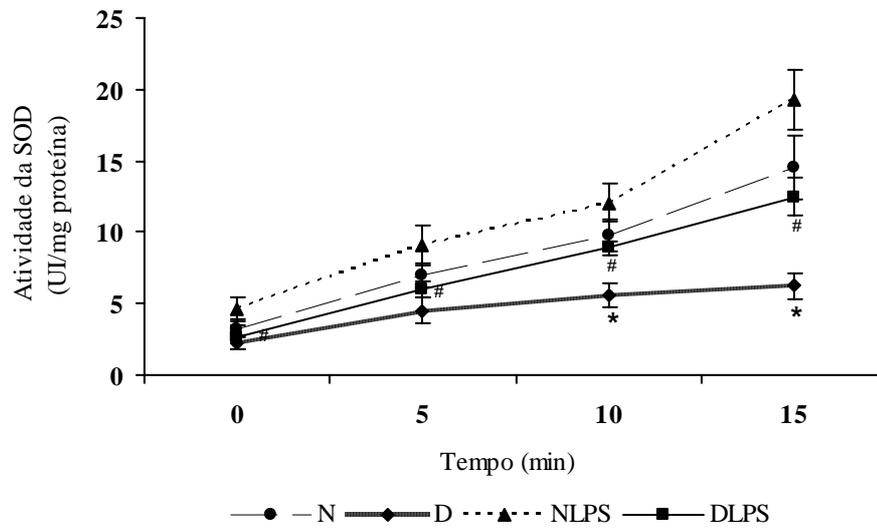
p<0,05 na comparação entre os grupos NLPS e DLPS.

Tabela 2- Atividade oxidante (O_2^- e ON) em sobrenadante de cultura de macrófagos e plasma. Os resultados são representados em média \pm erro-padrão para 12 animais.

Grupos	O_2^- 1h (nmoles/mL)	O_2^- 2h (nmoles/mL)	ON plasma (μ M/mL)	ON sobrenadante de cultura de MA não estimulados com LPS (μ M/mL)	ON sobrenadante de cultura de MA estimulados com LPS na dose de 10 μ g/mL (μ M/mL)
N	13,35 \pm 0,97	23,26 \pm 2,23	24,65 \pm 3,02	49,78 \pm 7,47	92,9 \pm 5,44
D	11,75 \pm 0,89	16,17 \pm 1,12*	16,6 \pm 1,74*	36,19 \pm 4,56	72,45 \pm 6,87*
NLPS	20,04 \pm 1,85	31,82 \pm 2,44	27,47 \pm 5,86	68,6 \pm 9,09	101,75 \pm 7,68
DLPS	13,45 \pm 0,50 [#]	18,1 \pm 0,56 [#]	25,87 \pm 5,47	43,86 \pm 3,53 [#]	84,89 \pm 3,18

* $p < 0,05$ na comparação entre os grupos N e D.

$p < 0,05$ na comparação entre os grupos NLPS e DLPS.



* $p < 0,05$ na comparação entre os grupos N e D.

$p < 0,05$ na comparação entre os grupos NLPS e DLPS.

Figura 2- Atividade da superóxido dismutase (SOD) em sobrenadante de cultura de macrófagos nos tempos de 0, 5min, 10min e 15min. Os resultados são representados em média \pm erro-padrão para 12 animais.

5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

CONCLUSÕES

A endotoxemia induz uma resposta inflamatória pulmonar em ratos adultos saudáveis, representada por recrutamento de neutrófilos para o pulmão e aumento na atividade oxidante dos macrófagos alveolares. Porém, não altera a atividade antioxidante. Isto pode sugerir não só a indução de uma resposta de defesa do hospedeiro frente ao processo inflamatório/infeccioso pulmonar, mas também pode favorecer a patogênese de injúria a esse órgão.

A desnutrição neonatal, mesmo seguida de recuperação nutricional, compromete a resposta inflamatória pulmonar de ratos adultos, diminuindo o recrutamento de células inflamatórias para o pulmão e a atividade oxidante-antioxidante dos macrófagos alveolares. Além disso, causa um retardo permanente na evolução ponderal dos animais. Neste modelo de desnutrição, a endotoxemia contribui para maior prejuízo dos mecanismos de resistência do hospedeiro frente aos processos inflamatórios/infecciosos pulmonares.

PERSPECTIVAS

O presente estudo despertou o interesse para investigações adicionais sobre a desnutrição neonatal e a endotoxemia.

Estas avaliações poderão ser versadas sobre os seguintes parâmetros:

- Níveis de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos cultivados e estimulados com LPS.
- Contagem de eritrócitos e de plaquetas.
- Valores de hemoglobina e hematócrito.
- Índice de adesividade e função fagocítica de macrófagos e neutrófilos.
- Subpopulações linfocitárias.
- Atividade da enzima antioxidante catalase.
- Pesos do timo, do baço e da adrenal durante e após desnutrição.

6 – ANEXOS

ANEXOS

Anexo – 1 Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal

Anexo – 2 Declaração de artigo submetido para publicação

Anexos – 3/4 Resumos apresentados na XXI Reunião Anual da FESBE

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 23/05

Recife, 09 de junho de 2005

Da: Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
À : **Profª Célia Maria Machado Barbosa de Castro**
Setor de Microbiologia Clínica/LIKA

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado "ATIVIDADE OXIDANTE-ANTI-OXIDANTE EM MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE RATOS ENDOTOXÊMICOS SUBMETIDOS OU NÃO Á DESNUTRIÇÃO NEONATAL".

Concluíram que os procedimentos descritos para a utilização experimental com os animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos um **PARECER FAVORÁVEL** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


rof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
ANAIS DA FACULDADE DE MEDICINA

DECLARAÇÃO

DECLARAMOS, para fins de prova, que recebemos o artigo de revisão intitulado **“Resposta orgânica na endotoxemia e desnutrição precoce”**, de autoria conjunta de *Juliana Félix de Melo, Célia Maria Machado Barbosa de Castro, Érika Michelle Correia de Macedo, Rebecca Peixoto Paes Silva, Wylla Tatiana Ferreira e Silva, Carlos Teixeira Brandt*, para revisão e possível publicação nesta revista.

Recife, 11 de janeiro de 2007.

HEDIENE M. F. GALINDO
Secretária

Revista Anais da Faculdade de Medicina
Pós-Graduação em Cirurgia/CCS/UFPE
Matrícula SIAPE 1134157

XXI Reunião Anual da



Certificamos que:

o resumo 31.037 RECRUTAMENTO DE LEUCÓCITOS PARA O PULMÃO NA ENDOTOXEMIA. ¹Melo, J. F.; ²PAES-SILVA, R.P.; ³Macêdo, É. M. C.; ⁴De Castro, C. M. M. B.; ⁵Manhaes-de-castro, R. ^{1,4}Medicina Tropical, UFPE; ^{2, 5}Nutrição, UFPE; ³Nutrição Experimental, UFPE foi apresentado sob a forma de painel na

**XXI Reunião Anual da
Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, realizada
na cidade de Águas de Lindóia - São Paulo, de 23 a 26 de agosto de 2006**

Genivaldo Maluc

Comissão Organizadora

**CONFERE COM
O ORIGINAL**

Marli Souza Sáez Pedrosa
Secretaria Administrativa

Departamento de Nutrição/UFPE
Flux. STAF-E: 13 10294

2006

XXI Reunião Anual da

FSBE

Federação de Sociedades de
Biologia Experimental

Certificamos que:

o resumo 32.018 PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE RATOS ENDOTOXÊMICOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NEONATAL. ¹Macêdo, É. M. C.; ²Paes-Silva, R.P.; ³Melo, J. F.; ⁴Silva, J.M.; ⁵Manhaes-de-Castro, R.; ⁶De Castro, C. M. M. B. ¹Nutrição Experimental, UFPE; ^{2, 4, 5}Nutrição, UFPE; ^{3, 6}Medicina Tropical, UFPE foi apresentado sob a forma de painel na

**CONFERE COM
O ORIGINAL**


Maria Tereza Louza Pedrosa
Secretaria Administrativa
Departamento de Nutrição/UFPE
Mat. SIAFE:11310294

**XXI Reunião Anual da
Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FESBE, realizada
na cidade de Águas de Lindóia - São Paulo, de 23 a 26 de agosto de 2006**

Gerhard Malusc

Comissão Organizadora

2006

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)