



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
TROPICAL**

**MAIARA SANTOS SEVERO**

**FUNÇÃO MICROBICIDA DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE  
RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NEONATAL: ESTUDO  
DA INFECÇÃO CELULAR, IN VITRO, POR *STAPHYLOCOCCUS  
AUREUS* METICILINA SENSÍVEL E METICILINA RESISTENTE**

**RECIFE  
2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**MAIARA SANTOS SEVERO**

**FUNÇÃO MICROBICIDA DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NEONATAL: ESTUDO DA INFECÇÃO CELULAR, IN VITRO, POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINA SENSÍVEL E METICILINA RESISTENTE**

Dissertação apresentada à Banca Avaliadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Maria Machado Barbosa de Castro**  
**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Amparo Andrade**

**RECIFE**  
**2009**

Severo, Maiara Santos

Função microbicida de macrófagos alveolares de ratos submetidos à desnutrição neonatal: estudo da infecção celular, *in vitro*, por *Staphylococcus aureus* metilina sensível e metilina resistente / Maiara Santos Severo. – Recife : O Autor, 2009.

iv, 112 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2009.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices.

1. *Staphylococcus aureus* - MRSA. 2. Macrófago alveolar. I. Título.

577.27  
616.01

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

UFPE  
BC2009-024



**RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA**

**MAIARA SANTOS SEVERO**

No dia 05 de março do ano de 2009, às 14h00, no Auditório 1 do Edif. das Pós-Graduações do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), os Membros Doutores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (UFPE/Membro Interno), a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Catarina de Souza Lopes (UFPE/Membro Externo) e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa (UFPE/Membro Externo), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a mestranda MAIARA SANTOS SEVERO sobre a sua dissertação intitulada “FUNÇÃO MICROBICIDA DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NEONATAL: ESTUDO DA INFECÇÃO CELULAR, *in vitro*, POR *Staphylococcus aureus* METICILINA SENSÍVEL E METICILINA RESISTENTE“. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

APROVADA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Catarina de Souza Lopes

APROVADA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa

APROVADA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Catarina de Souza Lopes

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa

<sup>1</sup> Endereço: Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n – Bloco A – Térreo do Hospital das Clínicas da UFPE. CEP.: 50670-420, Cidade Universitária, Recife-PE. Fone/Fax: (081) 2126.8527. Sítio: <http://www.ufpe.br/ppgmedtrop>



**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<sup>a</sup> Heloísa Ramos Lacerda de Melo

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

Prof<sup>a</sup> Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

**CORPO DOCENTE**

Prof<sup>a</sup> Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Prof. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Prof<sup>a</sup> Elizabeth Malagueño de Santana

Prof<sup>a</sup> Heloisa Ramos Lacerda de Melo

Prof Luiz Cláudio Arraes de Alencar

Prof<sup>a</sup> Maria do Amparo Andrade

Prof<sup>a</sup> Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Prof Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Prof<sup>a</sup> Sylvia de Lemos Hinrichsen

Prof<sup>a</sup> Valdênia Maria Oliveira de Souza

Prof<sup>a</sup> Vera Magalhães da Silveira

*Aos meus pais, **João & Maria**,  
pela imensidão de minha vida.*

*Aos meus avós, **Jaime (in memoriam) &  
Cecília**, por todos os belos momentos de  
amor e carinho, guardados pela eternidade.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, cuja presença me faz mais forte e me proporciona a fé de cada manhã.

A meus pais, João Severo e Maria José, exemplos de dedicação, perseverança, fé, amor, honestidade, solidariedade e simplicidade, que nunca, em momento algum, deixaram de acreditar em mim, e de me incentivar, me colocando à frente de si mesmos. Foram muitas as dificuldades, e grande a saudade, mas eis o mais recente fruto que nós conquistamos. Tenham certeza de que virão outros mais.

A minha irmã, a M.Sc., e futura Dra., Maíra, por servir de exemplo de força de vontade e superação. Obrigada pelo amor e carinho, e por manter firme o significado de irmã, apesar da distância. E a André, também M.Sc., e futuro Dr., em nome do qual agradeço a toda a minha família, por ser, além de primo, um companheiro na “odisséia de morar longe de casa”.

À Prof<sup>a</sup> Célia Castro, um anjo que surgiu em minha vida cinco anos atrás. És minha mãe, irmã, amiga, orientadora, conselheira e incentivadora. Tem sido um enorme prazer e um privilégio compartilhar de sua inteligência, serenidade, honestidade e compreensão. Muito obrigada pela confiança e carinho com que sempre me tratou, e principalmente, por ter despertado em mim o intenso interesse pela pesquisa, que facilmente se vê em teus olhos.

À Prof<sup>a</sup> Amparo Andrade, por ter me dado a oportunidade de trabalhar em um laboratório no exterior, me abrindo portas e me estimulando incondicionalmente. Obrigada pelo apoio, pela atenção e pela alegria que sempre traz à tona quando nos encontramos.

A Diogo, pelo amor, carinho, apoio, incentivo, amizade, cumplicidade e compreensão. Você tem sido, ao longo desses quase quatro anos, muito mais que um namorado e esteja certo de que farei o impossível para estar ao teu lado sempre que precisar. Obrigada por tudo, e em especial por ter me “emprestado” sua família, que foi essencial para acalantar a saudade, nas inúmeras vezes em que ela bateu mais forte.

À Natália Gomes e Thacianna Barreto, por cada esforço despendido para que esse trabalho se tornasse realidade. Vocês surgiram em um dos momentos mais complicados de minha vida, e me ajudaram de maneira imensurável, acreditando em mim e me fazendo mais forte. Como dois belos opostos, “razão vs. loucura”, e ao mesmo tempo se completando, “superóxido & óxido nítrico”, vocês transformaram esses dois anos uma grande e deliciosa aventura, e jamais irei me esquecer disso. O meu mais terno e imenso obrigada, meninas!

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 dois anos de mestrado.

Aos meus colegas de Mestrado, Luiz Felipe, Maíra, Mirelle e Narjara, por terem tornado esta tarefa muito mais agradável.

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

À Prof<sup>a</sup> Rosângela Coelho, por ter disponibilizado prontamente o seu laboratório para a realização de parte dos experimentos.

À Fátima Diniz, pela amizade nesses cinco anos de convívio, sempre me apoiando e tendo uma palavra amiga a me dar.

A Felipe, Edson e Paulo, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), e a todos que compõem este laboratório e que, de alguma maneira, me ajudaram ou me ensinaram alguma lição.

Às amigas e amigos da Microbiologia do LIKA: Bruno, Bruninho, Paulinha, Thays, Ketlin, Danielly, Renata, Juliana, Kedma, Simone, Rodrigo, Flávia, Rosângela, Glívia, Solange, Marcelo e, especialmente, Alice e Rafael, meus queridos, que não pouparam esforços para me ajudar sempre que precisei, e com quem me diverti a cada conversa, e mesmo a cada problema. Obrigada a todos pela ajuda, pelos sorrisos, e muitas vezes pelos “pepinos” do dia-a-dia, que fizeram de mim mais confiante.

A Mariana, Marina, Renan, Doug, Judith, Rafael, Juliana, Caicó, Isabella, Sérgio, Poliana, e Douglinhas, pela amizade e pela diversão sempre que nos juntamos, seja em casa, na rua, na chuva ou na fazenda (ops, na praia...que fazenda ninguém tem!).

Aos amigos e “conterrâneos”, Camila, Marquinhos, Leo e Thalles, pelas conversas filosóficas e idealistas nos fins de semana cinzentos e nostálgicos, que se tornaram mais leves pelas nossas reuniões regadas a “comes & bebes” e dominó.

Àqueles aqui não mencionados, não por esquecimento, mas por “exaustão mental”. Não se sintam menos importantes. Se você que aqui lê, me ajudou e não encontrou seu nome listado, o meu mais verdadeiro pedido de desculpas e obrigada!

Aos que me atrapalharam, um agradecimento especial. Cada lição aprendida me permitiu evoluir e acreditar que, para cada porta que se fecha, há uma janela a se abrir. “Pedras no caminho? Guardarei todas. Um dia, hei de construir um castelo”.

*Prepara-te para o que quiseres ser.*  
Provérbio alemão

## RESUMO

---

*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina têm aumentado de forma significativa nos últimos anos, sendo importante problema de saúde pública, como também, a desnutrição, ainda presente em nosso país. Assim, torna-se importante avaliar repercussões da desnutrição neonatal na resposta imune frente a patógenos em potencial, como o *S. aureus*. Ratos machos Wistar foram amamentados por mães que receberam durante a lactação, dieta padrão do biotério (grupo nutrido labina) ou dieta experimental, contendo 17% de proteína (grupo nutrido caseína) e 8% de proteína (grupo desnutrido). Após o desmame, todos os animais foram “recuperados” com dieta normoprotéica, Labina, até o experimento, mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12 h, e pesados diariamente até o 21º dia, em dias alternados e até a data de execução de cada experimento (90-120 dias). Vinte quatro horas antes do experimento, as cepas MSSA ATCC 29213 ou MRSA ATCC 33591 foram plaqueadas em Ágar Sangue, minutos antes, aliqüotadas em tubos contendo PBS estéril cuja turbidez foi ajustada para a concentração de  $10^6$  UFC/mL. Macrófagos alveolares (MA) foram obtidos após traqueostomia, através da coleta de lavado broncoalveolar sendo formados *in vitro*: um sistema controle, composto por MA; dois sistemas testes, de acordo com a cepa bacteriana. A análise estatística foi efetuada utilizando-se o teste t de Student,  $p < 0,05$ . Os resultados indicam que a desnutrição neonatal acarretou uma diminuição do crescimento ponderal, da taxa de fagocitose e da produção dos radicais superóxido e óxido nítrico, dos MA frente a *S. aureus*, não influenciando a aderência destas células. Pode-se sugerir que as cepas utilizadas tenham igual susceptibilidade aos mecanismos microbicidas dos MA tanto em animais eutróficos como em desnutridos no período neonatal, apresentando a mesma capacidade de manter os parâmetros imunológicos testados próximos aos valores referentes às condições normais das células.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; meticilina; macrófago alveolar; função microbicida; desnutrição neonatal.

## ABSTRACT

---

*Staphylococcus aureus* resistant to methicillin have increased significantly in recent years, and is a major public health problem, like is malnutrition, still presents in our country. Therefore it is important to evaluate effects of malnutrition in the neonatal immune response against potential pathogens such as *S. aureus*. Male *Wistar* rats were breastfed by dams that received experimental diet during the nursing, containing 17% of protein for nourished group or 8% of protein for undernourished group. After, all were recovered with normoproteic diet, Labina, during the whole lifetime. The animals were maintained in 12/12h dark/light cycle, and weighed daily until 21 days, on alternate days and to date execution of each experiment (90-120 days). Twenty four hours before the experiment, the strains MSSA ATCC 29213 or MRSA ATCC 33591 were plated on blood agar, minutes before, aliquots in tubes containing sterile PBS whose turbidity was adjusted to a concentration of  $10^6$  CFU / mL. Alveolar macrophages (AM) were obtained after tracheostomy, through the collection of bronchoalveolar lavage and were formed in vitro: one control system, composed of MA, two test systems, according to strain used. Statistical analysis was performed using the Student t test  $p < 0.05$ . The results indicate that malnutrition caused weight a reduction in growth, in the rate of phagocytosis and in the production of superoxide and nitric oxide radicals of the MA against *S. aureus*, with no influence on the adhesion percentage of MA. It can be suggested that the strains used have equal susceptibility to microbicides mechanisms of MA, both in normal and in early malnourished animals, presenting the same ability to maintain the immunological parameters tested close to the values for the normal cells.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; methicillin; alveolar macrophages; microbicidal function; neonatal malnutrition.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>c-NOS</b>	Nitric Oxide Sintase Constitutive (Óxido nítrico sintase constitutiva)
<b>D:</b>	Desnutrido
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunoenzimático)
<b>EO</b>	Estresse oxidativo
<b>FAG</b>	Taxa de fagocitose
<b>HBSS</b>	Hank's Buffered Salt Solution (Solução Balanceada e Tamponada de Hank)
<b>IA</b>	Índice de aderência
<b>IL</b>	Interleucina
<b>i-NOS</b>	Nitric Oxide Sintase Inducible (Óxido nítrico sintase induzida)
<b>LBA</b>	Lavado broncoalveolar
<b>LIKA</b>	Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami
<b>MA</b>	Macrófagos alveolares
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente
<b>MSSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina sensível
<b>N</b>	Nutrido

<b>NOS</b>	Nitric Oxide Sintase (Óxido nítrico sintase)
<b>ON</b>	Óxido nítrico
<b>PBP</b>	Protein binding penicilin (Proteína ligadora de penicilina)
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline (Solução salina tamponada com fosfato)
<b>PMA</b>	Phorbol miristate acetate (Acetato miristato de forbol)
<b>RPMI</b>	Meio de Cultura do Roswelt Park Memorial Institute
<b>ROI</b>	Reactive intermediates of oxygen (Intermediários reativos de oxigênio)
<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>SCC-mec</b>	<i>Staphylococcus</i> cassette chromosome mec (Cassete estafilocócico cromossomal mec)
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva
<b>VISA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> vancomicina intermediário
<b>VRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> vancomicina resistente

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Quadro 1</b> - Organograma geral da distribuição dos grupos.....	25
<b>Figura 1:</b> Etapas da metodologia.....	33
<b>ARTIGO I</b>	
<b>Figura 1:</b> Índice de aderência dos macrófagos alveolares de ratos adultos para os sistemas: C, MSSA e MRSA.....	55
<b>Figura 2:</b> Taxa de fagocitose dos macrófagos alveolares de ratos adultos para os sistemas C, MSSA e MRSA.....	55
<b>Figura 3:</b> Produção de superóxido dos macrófagos alveolares de ratos adultos para os sistemas C, MSSA e MRSA, nos tempos 1h e 2h de incubação.....	56
<b>Figura 4:</b> Liberação de óxido nítrico no sobrenadante das culturas dos macrófagos alveolares de ratos adultos para os sistemas C, MSSA e MRSA.....	56
<b>ARTIGO II</b>	
<b>Figura 1-</b> Evolução da curva ponderal durante a desnutrição neonatal (21 dias) e reposição nutricional (23-90 dias) dos grupos Caseína a 17% e a 8%.....	80
<b>Figura 2:</b> Índice de aderência dos macrófagos alveolares de ratos adultos para os sistemas C, MSSA e MRSA.....	81
<b>Figura 3:</b> Taxa de fagocitose dos macrófagos alveolares de ratos adultos para os sistemas C, MSSA e MRSA.....	81
<b>Figura 4:</b> Liberação de óxido nítrico no sobrenadante das culturas dos macrófagos alveolares de ratos adultos para os sistemas C, MSSA e MRSA.....	82

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Composição da dieta padrão “Labina” (Labina – “Purina”, Agribands do Brasil Ltda) utilizada por mães (gestação e período de aleitamento) e pelos filhotes até a vida adulta.....	25
<b>Tabela 2</b> - Composição centesimal das Dietas Caseína à 17% e Caseína a 8% utilizadas por mães durante o período de aleitamento.....	26
<b>Tabela 3</b> – Características das cepas <i>Staphylococcus aureus</i> utilizadas.....	27

**ARTIGO II**

<b>Tabela 1</b> – Valores absolutos para a produção de $O_2^-$ em todos os sistemas, de acordo com os grupos analisados e o tempo de incubação para 12 animais (6/grupo).....	81
---	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	4
2.1. Imunidade inata.....	5
2.1.1 Definições .....	5
2.1.2. Macrófagos .....	6
2.1.2.1.Fagocitose e aderência .....	7
2.1.2.3. Atividade Oxidante .....	7
2.2. Pulmão e defesa do hospedeiro.....	9
2.3. Bactérias .....	10
2.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	10
2.3.1.1 Resistência antimicrobiana.....	12
2.4. Desnutrição .....	14
2.4.1. Desnutrição e períodos críticos de desenvolvimento .....	15
2.4.2. Desnutrição e sistema imune.....	16
3. HIPÓTESES .....	18
4. OBJETIVOS .....	20
5. ANIMAIS, MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
5.1 Desenho do estudo .....	23
5.2 Animais, estado nutricional e peso corporal.....	23
5.3 Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	26
5.4 Lavado broncoalveolar .....	28
5.5 Cultura de macrófagos alveolares .....	28
5.6 Avaliação do índice de aderência.....	29
5.7 Determinação da taxa de fagocitose.....	29
5.8 Análise da produção de superóxido .....	30
5.9 Liberação de óxido nítrico.....	31
5.10 Análise estatística.....	32
5.11 Considerações éticas .....	32
6. ARTIGO I.....	34
7. ARTIGO II .....	57
8. CONCLUSÕES .....	83
9. PERSPECTIVAS.....	85

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
APÊNDICES .....	95
APÊNDICE 1 – Planilha de evolução ponderal .....	96
APÊNDICE 2 – Curva Padrão de Nitrito de Sódio .....	97
ANEXOS.....	98
ANEXO 1 – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Experimental Animal ....	99
ANEXO 2 – Comprovante de solicitação encaminhada ao Comitê de Ética em Experimentação animal para modificação. ....	100
ANEXO 3 – Normas para publicação na revista (Artigo I) .....	101
ANEXO 3 – Normas para publicação na revista (Artigo II).....	104

# **1. INTRODUÇÃO**

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é o principal patógeno envolvido tanto em infecções adquiridas na comunidade como nas nosocomiais. Ele pode ser encontrado colonizando o hospedeiro e vivendo como comensal nas vias aéreas do homem (FOURNIER & PHILPOTT, 2005). É considerado um microrganismo com alta versatilidade e virulência, e que apresenta diversos mecanismos de resistência (KANAFANI & FOWLER JR, 2006).

Na atualidade, *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA) constituem um grave problema para a saúde mundial. Estudos indicam que o MRSA tem sido associado a maiores taxas de falha de tratamento e morte por mediastinite quando comparado ao *S. aureus* sensível à metilina (MSSA) (MEKONTSO-DESSAP et al., 2001), e que a bacteremia por MRSA está relacionada a taxas de mortalidade significativamente maiores do que aquela provocada pelo MSSA (COSGROVE et al., 2003). Porém, ainda não está claro se o MRSA constitui *per se* fator de risco independente para morbidade e mortalidade (COMBES et al., 2004), por possuir, ou não, maior caráter de virulência que o MSSA.

Assim como a virulência e a patogenicidade de um microrganismo, outros fatores podem influenciar na capacidade de defesa do hospedeiro. Dentre eles encontra-se a desnutrição, uma vez que 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 hospedeiro. Dependendo da intensidade e da duração das alterações nutricionais, as conseqüências terão impacto maior ou menor sobre todo o organismo no futuro (GUEDES, MELO & TEODÓSIO, 2004).

Sabe-se que uma condição nutricional adequada depende de uma dieta que contenha todos os fatores nutricionais em proporções ideais às necessidades do indivíduo nos diferentes estágios da vida (OSLON, R.E., 1991). A maioria dos estudos tem utilizado dietas semi-sintéticas para animais de laboratório, na tentativa de reproduzir aspectos clínicos,

bioquímicos e patológicos observados em indivíduos desnutridos (STEWART, R.J.C., 1973; RESNICK, O. & MORGANE, P.J., 1979; BIRT, D.F., 1982; MCGUIRE, M.K., 1995). Neste contexto, a dieta à base de caseína tem destaque, sendo amplamente utilizada como dieta controle em estudos que analisam dietas experimentais, e como dieta de escolha em estudos com diferentes modelos de deficiência, como o modelo de desnutrição neonatal (DERIVI, et al, 2002; PERCEGONI et al., 2004; PORTO et al, 2007).

Pouco se sabe sobre eventuais seqüelas causadas nos mecanismos de defesa de hospedeiros que foram desnutridos na vida precoce. E muito embora a desnutrição tenha diminuído nos últimos anos, parte da população de países como o Brasil sofreu algum tipo em particular, de desnutrição no período crítico de seu crescimento e desenvolvimento, principalmente, do sistema imune. Por isso, tornam-se relevantes estudos que esclareçam como a resposta imune inata dos nutridos e “ex-desnutridos” responde aos processos infecciosos, particularmente aqueles causados por bactérias resistentes a antibióticos. Neste âmbito, este estudo tem por objetivo analisar a função microbicida de macrófagos alveolares infectados, *in vitro*, com *S. aureus* metilina-sensível e metilina-resistente, em grupos de ratos adultos nutridos e desnutridos precocemente, seguidos de reposição nutricional.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

## **2.1. Imunidade inata**

### **2.1.1 Definições**

O sistema imune é uma rede integrada de células, órgãos linfóides, fatores humorais e citocinas, que desempenha um papel crítico na defesa contra agentes infecciosos e é tida como principal mecanismo para impedir a ocorrência de infecções disseminadas (SEADI, 1998; MACHADO et al, 2004). Possui duas respostas distintas, entretanto, interligadas: a imunidade inata e a adaptativa. A imunidade inata está presente e é efetiva em todos os indivíduos normais mesmo sem exposição prévia ao antígeno. A imunidade adaptativa consiste em reações antígeno-anticorpo específica através de linfócitos T e B, e é ativada somente após o primeiro contato com um agente estranho ao organismo, quando então se desenvolve a memória imunológica. Portanto, exposições subseqüentes levam a uma reação mais rápida e intensa, mas não imediata (PARKIN, 2001).

A resposta imune inata exerce um papel de importância primária no controle e no desenvolvimento de doenças infecciosas (IKEDA et al, 2003), sendo a primeira linha de defesa contra patógenos microbianos (ROSENTHAL et al, 2006). Consiste em um mecanismo natural que carece de memória imunológica e de especificidade, sendo composta por barreiras epiteliais intactas, célula fagocíticas (macrófagos, monócitos e neutrófilos), células liberadoras de mediadores (basófilos, mastócitos e eosinófilos) e células matadoras naturais (células Natural Killer). Os componentes moleculares dessa resposta incluem por sua vez, o sistema complemento e as proteínas da fase aguda (DELVES & ROITT, 2000).

O sistema mononuclear fagocítico é formado por células que se originam na medula óssea, são transportadas pela circulação sanguínea e se localizam em diversos tecidos. Após a maturação e subseqüente ativação, estas células assumem morfologia variada, mas com uma função em comum, a defesa do organismo através da fagocitose. É constituído por

monoblastos, promonócitos e monócitos na medula óssea, por monócitos no sangue periférico, e por macrófagos nos tecidos (HATSUKARI et al, 2006).

### **2.1.2. Macrófagos**

Os monócitos, sob a influência das moléculas quimiotáticas, migram para vários tecidos do corpo, onde se diferenciam em macrófagos (HUME et al, 2002). Estes, são células relativamente grandes, que medem entre 25-50µm de diâmetro, apresentam núcleo irregular, possuem um ou mais nucléolos, cromatina pouco condensada, citoesqueleto bem desenvolvido, inúmeras projeções citoplasmáticas, grande número de lisossomos, complexo de Golgi e mitocôndrias (AUGER, ROSS, 1992). São, sem dúvida, um dos mais importantes tipos de células do sistema imune inato e podem assumir formas morfológicas diferentes conforme sua localização. Aqueles que não sofreram nenhum estímulo extracelular são denominados macrófagos residentes. São células menores, quando comparadas às células ativadas, com poucas projeções citoplasmáticas, localizados em diversos tecidos saudáveis, incluindo os macrófagos do tecido conjuntivo (histiócitos), do fígado, do pulmão, dos linfonodos, baço, medula óssea, dos fluidos serosos, da pele, entre outros (HALLIWELL et al, 1999).

Os macrófagos podem exercer a função de defesa de maneira indireta, por meio de atividades antitumorais e microbicidas, da secreção de citocinas, ou da apresentação de antígenos, regulando assim o sistema imune (KLIMP et al., 2001). Por exemplo, as interleucinas IL-1, IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral (TNF) mobilizam respostas imunes inatas e sinalizam linfócitos T, via IL-10, IL-12 e IL-18, a iniciar respostas específicas contra patógenos intra e extracelulares. Desta forma, o macrófago tem papel central no início da resposta inata e adquirida e a efetividade da resposta contra o patógeno depende da sua forma de ativação (DINARELLO et al, 1996).

### **2.1.2.1. Fagocitose e aderência**

A fagocitose desenvolvida pelos macrófagos compõe o início do conjunto das atividades biológicas de toda a resposta imunológica, e obviamente da resposta inata, e é constituída por várias etapas: aderência ao substrato, quimiotaxia, ingestão de células e partículas inertes, além da produção radicais livres (SPORN et al., 1990; DE LA FUENTE et al., 1991; HOLGATE & CHURCH, 1996; ADEREM & UNDERHILL, 1999; ZAPOLSKA-DONAR et al., 2000). Há espraiamento do macrófago, com alteração da forma (arredondada para achatada), e conseqüente aumento da área de contato da membrana plasmática com o substrato a ser fagocitado, e redistribuição das organelas citoplasmáticas.

Durante a aderência, ocorre a ativação de receptores para moléculas de adesão, como fibronectina, vibronectina e laminina, entre outros, ocasionando rearranjo do citoesqueleto celular (SAMPAIO et al, 2005). Após a internalização da partícula, a actina-F que envolve o fagossomo é despolimerizada, tornando vesícula acessível ao endossoma precoce (SWANSON et al, 1995). Por meio de uma série de eventos de fusão, a membrana vacuolar e seu conteúdo fusionam-se com o endossoma tardio e finalmente com o lisossomo, para formar o fagolisossoma. A taxa de fusão fagossomo-lisossomo varia drasticamente, dependendo da natureza da partícula ingerida (AMER et al, 2002).

### **2.1.2.3. Atividade Oxidante**

Funcionalmente, após ingestão da partícula, ocorre a "explosão respiratória", resultando em aumento no consumo de oxigênio e na geração de metabólitos intermediários, designados pela sigla ROI (intermediários reativos de oxigênio), como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) (WONG et al., 1990; COTRAN et al., 1994). A adição de um elétron ao oxigênio ( $O_2$ ) gera o  $O_2^-$ , o qual é rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela superóxido dismutase (SOD). Este  $H_2O_2$  formado é por si só capaz de se difundir e causar

danos celulares, devendo ser neutralizado rapidamente, impedindo a produção de radicais hidroxilas, ainda mais potentes (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Este agente oxidante atua na gênese de diversas doenças, devido à sua capacidade de oxidar lipoproteínas (DE CASTRO et al., 1995) ou alterar a transcrição gênica (BAUERLE et al., 1996), mas também, ataca microrganismos e/ou células infectadas, proporcionando a defesa do hospedeiro contra patógenos (BAUERLE et al., 1996.; PITHON-CURI et al., 2002).

Estresse oxidativo (EO) é o termo geralmente usado para descrever os danos causados pelas espécies reativas do oxigênio nas moléculas ou mesmo no organismo como um todo. O nível de EO é determinado pelo balanço entre a atividade pró-oxidante e a antioxidante. Dessa forma, o estresse oxidativo é o desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, que resulta em aumento da formação de radicais livres e induz aumento de injúrias oxidativas (STEBBENS, 2004; URSO et al., 2003).

O mecanismo pró-oxidante inclui radicais livres, tais como o ânion superóxido, o radical hidroxil e espécies reativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Como as substâncias pró-oxidantes são constantemente formadas em pequenas quantidades no metabolismo normal, as células possuem mecanismos para evitar o desequilíbrio oxidativo e, assim, impedir o dano causado pelos mecanismos agressores (URSO et al., 2003). As defesas antioxidantes apresentam componentes enzimáticos e não enzimáticos para manter esse sistema em equilíbrio. O sistema antioxidante enzimático inclui as enzimas SOD, catalase e glutathione peroxidase (SCHNEIDER et al., 2004).

Além dos ROIs, os macrófagos produzem intermediários reativos do nitrogênio, principalmente o óxido nítrico (ON). Dentro dos fagolisossomos, o óxido nítrico pode se combinar com superóxido ou peróxido de hidrogênio, produzindo radicais peroxinitrito altamente reativos na eliminação de patógenos invasores (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

O ON é gerado por uma família de isoenzimas expressas em uma grande variedade de células de mamíferos, através da catálise enzimática do aminoácido essencial L-arginina (SPRINDGALL et al, 1995). Essa catálise da reação do aminoácido L-arginina e oxigênio, que resulta na formação de L-citrulina e óxido nítrico, é realizada por enzimas denominadas: constitutiva (c-NOS) e induzida (i-NOS). A c-NOS, dependente de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e de calmodulina, está envolvida na sinalização celular (DUSSE et al, 2003). Esta isoforma compreende a NOS neuronal, presente normalmente nos neurônios, e a NOS endotelial, presente normalmente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas. O ON formado por estas vias participa de muitos processos homeostáticos. A i-NOS não é expressa sob condições normais. Uma vez sintetizada, libera quantidades maiores de ON que a c-NOS e a produção deste continua indefinidamente até que a L-arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese sejam depletados ou ocorra à morte celular (DUSSE et al, 2003). É induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo-se macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas (MONCADA et al, 1991).

## **2.2. Pulmão e defesa do hospedeiro**

No pulmão, mais especificamente nos alvéolos, existem dois principais tipos de células imunes residentes: células dendríticas, que medeiam à imunidade adaptativa, e macrófagos, que possuem papel central na manutenção da estrutura normal deste órgão. Neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, células natural killer também estão presentes, mas tendem a ser menos frequentes na ausência de inflamação (WEGLARCZYK et al., 2004). O trato respiratório é um alvo freqüente de infecção por bactérias capazes de produzir um amplo espectro de doenças desde lesões superficiais até severas infecções sistêmicas, no homem e em outros animais (HAMPTON et al, 1996). Elas utilizam extensivas estratégias

moleculares para manipular as defesas microambientais do hospedeiro infectado e colonizar os tecidos. A patogênese é devido aos inúmeros fatores de virulência na forma de toxinas, proteínas associadas à parede celular e enzimas (BRUDASTOV et al, 2001).

### **2.3. Bactérias**

As bactérias são os patógenos que mais causam infecções no homem. Elas podem ser classificadas em bactérias intracelulares e extracelulares. As bactérias intracelulares possuem a capacidade de sobreviver, e mesmo de se replicar, dentro dos fagócitos. Entretanto, as extracelulares, como por exemplo, o *Staphylococcus aureus*, são capazes de se replicar fora das células do hospedeiro (na circulação, nos tecidos conjuntivos e em espaços teciduais). Por serem susceptíveis à destruição quando fagocitadas, essas bactérias desenvolvem, como mecanismo de escape, substâncias que possuem atividade antifagocítica (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

#### **2.3.1. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* é considerado um dos principais patógenos causadores de infecções no ambiente hospitalar. As manifestações clínicas vão desde infecções traumáticas até septicemias (WUNDER et al, 2004). É uma bactéria pertencente à família *Micrococcaceae*, sendo cocos Gram e catalase-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados (SANTOS et al, 2007). Possui a capacidade de integrar-se à microbiota normal e colonizar o hospedeiro numa frequência superior à que determina infecções. No ser humano, está presente no trato respiratório (principalmente narinas) de cerca de 60% da população em geral, permanecendo sem causar doença em condições normais, e pode também ser detectado em outras regiões úmidas do corpo como axilas, períneo, vagina e reto (SIBBALD et al., 2006). Caso as

barreiras naturais, isto é, pele e mucosas, estejam comprometidas por trauma ou cirurgia, o *S. aureus* pode se alojar no tecido e provocar uma lesão local (SANTOS et al, 2007).

No último século, o *S. aureus* emergiu como um importante patógeno humano, resultado da evolução da resistência antimicrobiana e das técnicas de procedimentos médicos que acarretou o uso extensivo de dispositivos intravasculares (SOUZA, 2005). Esta bactéria é responsável por uma grande variedade de infecções, como de pele e tecidos moles, feridas cirúrgicas, osteomielite, pneumonias, abscessos, endocardites e bacteremia. As doenças provocadas pelo *S. aureus* podem ser decorrentes da invasão direta dos tecidos, de bacteremia primária ou, exclusivamente, devidas às toxinas produzidas (ANDRIOLO, 2005). Estas infecções acometem pacientes em todas as faixas etárias, com maior frequência nos extremos de idade. Entre as infecções hospitalares, as sepSES por *S. aureus* são responsáveis por elevada morbidade e mortalidade (SPIANDORELLO et al., 2000).

A patogenicidade do *S. aureus* é dada por um arsenal de fatores de virulência, dispostos na superfície da célula bacteriana ou secretados no meio externo (FEDTKE et al., 2004). Especificamente, esses fatores incluem: proteínas de superfície que promovem adesão e colonização dos tecidos do hospedeiro; fatores de superfície que inibem a fagocitose (cápsula e proteína A); superantígenos que contribuem para o choque séptico, dentre outros; e compostos bioquímicos que aumentam a permanência desta bactéria no interior de fagócitos (carotenóide e catalase) (SIBBALD et al., 2006).

Sabe-se que o *S. aureus* tem persistido como um importante problema de saúde pública desde a época pré-antibiótica, quando bacteremia estafilocócica era mortal para o paciente afetado. Apesar dos grandes avanços na área médica, *S. aureus* permanece como um importante agente de doenças infecciosas no hospedeiro humano por ser uma bactéria versátil, com vários fatores de virulência e mecanismos de resistência ao seu dano. A dificuldade em controlar a resposta inflamatória que se desenvolve pode provocar danos nos

próprios tecidos, muitas vezes limitados e sem maiores conseqüências para o hospedeiro. Porém, pode resultar em septicemia e choque séptico, situação extremamente grave e associada com alta taxa de mortalidade (MACHADO et al, 2004).

### **2.3.1.1 Resistência antimicrobiana**

Os antibióticos beta-lactâmicos (como por exemplo, penicilina, cefalosporinas, carpenêmicos, monobactâmicos, e carbacefens) constituem um grupo de drogas antimicrobianas que apresentam o anel  $\beta$ -lactâmico em comum. Atuam nas células bacterianas impedindo a síntese da parede bacteriana, através da inibição de enzimas que catalisam a etapa final da síntese da parede celular. Como são considerados os sítios de ligação das penicilinas, essas enzimas são denominadas proteínas ligadoras da penicilina (protein binding penicilin - PBPs). As PBPs são responsáveis pela reação de transpeptidação necessária para a união das cadeias de peptidoglicanos constituintes da parede celular. Apresentam elevada afinidade aos compostos  $\beta$ -lactâmicos, análogos estruturais de seu substrato, sendo inibidas por concentrações muito baixas desses agentes (SOUZA et al, 2005).

O desenvolvimento de resistência a antibióticos por diversos patógenos representa um grave problema à terapêutica antimicrobiana (KONEMAN, 2001). Na década de 1940, a grande maioria dos *S. aureus* era sensível à penicilina. No fim dos anos 50, a espécie *S. aureus* tinha adquirido resistência a praticamente todos os antibióticos de uso parenteral, incluindo a eritromicina e a tetraciclina. A introdução das penicilinas resistentes a penicilinasases, na década de 1960, possibilitou um avanço na terapêutica antiestafilocócica. Com o uso das penicilinas semi-sintéticas, como a meticilina empregada no tratamento de infecções estafilocócicas, surgiram cepas resistentes à meticilina denominadas MRSA (*S. aureus* resistente à Meticilina), cujo padrão de resistência se estende a outros antibióticos

beta-lactâmicos (REMONATTO et al., 2007). As cepas MRSA, rapidamente, se disseminaram em ambientes hospitalares, limitando, assim, a antibioticoterapia de combate do *S. aureus* aos glicopeptídios, vancomicina e teicoplanina. Vale ressaltar que já foram identificadas cepas com resistência à vancomicina, designadas pelas siglas VISA/VRSA (*S. aureus* Intermediários ou Resistentes à Vancomicina) (SANTOS et al, 2007).

*S. aureus* possui três mecanismos distintos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos: a) hiperprodução de beta-lactamases; b) presença de uma proteína ligadora de penicilina - PBP alterada denominada PBP 2a; c) modificações na capacidade de ligação das PBPs. Em 1991, De Lencastre e colaboradores, sugeriram que os três mecanismos podem estar presentes numa mesma amostra, inclusive interagindo entre si. Sabe-se ainda que essa resistência pode ser codificada cromossomicamente ou mediada por plasmídios (TOMASZ et al. 1989).

A resistência à meticilina, especificamente, em estafilococos é devida à produção de uma PBP adicional, anômala, denominada PBP 2a, que apresenta baixa afinidade aos antibióticos beta-lactâmicos, resultando na resistência de ligação alterada (SOUZA, et al 2005). Ela é conferida pela existência de um elemento genético móvel de 26 a 67 quilobases, denominado *SCCmec* (*Staphylococcus cassette chromosome mec*), que contém o gene *mecA* e seus reguladores, responsáveis por codificar a PBP2a (RICARDO, 2004).

Em 1979, Cutler sugeriu que as alterações nas paredes celulares das cepas de *S. aureus*, relacionadas com o fenótipo multirresistência, poderiam afetar seus mecanismos de virulência. Estafilococos resistentes à penicilina têm uma maior espessura da parede celular e conteúdo lipídico diferente das sensíveis a este antibiótico. Baseado nesta constatação é possível supor que cepas resistentes têm uma morfologia que confere uma maior proteção contra a destruição pelas enzimas lisossomais ou pelo metabolismo oxidativo dos fagócitos ativados. Acredita-se que as cepas MRSA possuam mecanismos distintos de virulência, que

podem ser ou não mais exacerbados quando comparados às cepas *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA) (MANDELL, 1975).

A proporção de isolados clínicos de *S. aureus* resistentes à meticilina tem aumentado de forma significativa nos últimos anos (TIEMERSMA et al., 2004). O MRSA é tipicamente um patógeno nosocomial, que infecta pacientes com fatores de risco como afecções dermatológicas, diálise, procedimentos cirúrgicos, internações prolongadas (>14 dias), permanência em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) e uso prolongado de antimicrobianos. Provoca altos índices de mortalidade, além de serem restritas as opções terapêuticas (BEAM et al, 2006) A ocorrência de MRSA adquirida na comunidade era raramente identificada, entretanto, vem aumentando de forma gradativa. Segundo Ribeiro e colaboradores, em 2005, o fator mais importante para a aquisição de MRSA na comunidade é o contato, direto ou indireto, com serviços de saúde. Além de impor grandes dificuldades terapêuticas, limitando as opções de drogas de escolha, o MRSA tem sido associado a altas taxas de morbidade e mortalidade, maiores do que as observadas em casos de infecção por MSSA (COSGROVE et al., 2003). Até o momento, porém os mecanismos subjacentes a essa observação ainda não foram bem esclarecidos (MEKONTSO-DESSAP et al., 2005).

#### **2.4. Desnutrição**

Apesar do avanço observado na situação da saúde brasileira, representado pelo processo de transição epidemiológica, as doenças infecciosas ainda constituem importante causa de óbito. Dentre os fatores associados ao aumento da susceptibilidade às infecções e à redução da qualidade de vida, encontra-se a desnutrição (BARBOSA-SILVA et al., 2002).

#### **2.4.1. Desnutrição e períodos críticos de desenvolvimento**

Os diversos sistemas do nosso organismo dependem de forma essencial de uma nutrição adequada para o seu bom desenvolvimento e funcionamento. Isso é absolutamente verdadeiro para qualquer sistema orgânico, mas tem implicações importantes no caso de sistemas de homeostase, como por exemplo, os sistemas nervoso, endócrino e imune (DE CASTRO et al., 1999; TEODÓSIO, 1990).

Em 1968, Dobbing sugeriu a existência dos chamados “períodos críticos de desenvolvimento”, nos quais existe uma “janela precoce de plasticidade fisiológica” durante a qual o organismo torna-se mais suscetível à ação de estímulos ambientais (MORGANE *et al.*, 1978; WINICK & COOMBS, 1972). É nesta fase de desenvolvimento que eventos celulares ocorrem em rápida velocidade, aumentando a vulnerabilidade dos sistemas orgânicos e permitindo, em consequência disso, o aparecimento de repercussões permanentes na vida adulta (BARROS *et al.*, 2006).

A nutrição neonatal é capaz de influenciar o crescimento e desenvolvimento humano, representando um *continuum* que se inicia no momento da concepção (MELO, 2007). Sabe-se que um estímulo ambiental ocorrido durante o período crítico de desenvolvimento, tem um efeito subsequente sobre estruturas e funções de sistemas orgânicos. Esse mecanismo foi denominado de “programação” (LUCAS, 1999). Efeitos de programação metabólica, induzidos por condições nutricionais alteradas durante o período pós-natal imediato, podem desencadear consequências em longo prazo, na idade adulta do indivíduo (SRINIVASAN & PATEL, 2008).

O modelo da “influência fenotípica”, proposto por Hales e Barker, em 1992, sugere que o organismo se adapta a um ambiente hostil prévio, e que o comportamento e o

metabolismo do organismo ajustam-se às condições ambientais, com as quais, provavelmente, ele conviverá durante toda a vida (BATESON *et al.*, 2004).

#### **2.4.2. Desnutrição e sistema imune**

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 nascimento (GOBEL, 1996). Assim, no homem e no rato, o início da vida pode ser considerado crítico para o desenvolvimento do sistema imunológico, onde as agressões nutricionais poderão ocasionar comprometimento da resposta imune, com seqüelas na capacidade de defesa do indivíduo adulto (WADE *et al.*, 1983; CUNNINGHAM-RUNDLES *et al.*, 2005).

Na desnutrição, são comuns os danos causados à imunidade inespecífica, como por exemplo, a perda da integridade das barreiras físicas do epitélio e das mucosas. Isto permite o livre acesso de microrganismos aos órgãos internos e à circulação, podendo, assim, aumentar a suscetibilidade aos agentes infecciosos e a gravidade das infecções (CHANDRA *et al.* 1997; MORGAN, 1997). Além disso, indivíduos severamente desnutridos apresentam deficiência em outros aspectos da resposta inata tais como: redução na produção de citocinas (LESOURD *et al.*, 1997) e ânion superóxido; migração, adesão e função fagocítica prejudicadas (REYNOLDS *et al.*, 1992; BORELLI *et al.*, 1998).

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 (BORELLI *et al.*, 2004; BRUNDTLAND, 2000). Desta forma, além da desnutrição facilitar a invasão do agente, favorecendo a sua proliferação no organismo e/ou produção de toxinas; pode também

aumentar as chances de uma infecção secundária ao modificar a evolução e prognóstico de uma determinada doença (BRUNDTLAND, 2000; CUNNINGHAM-RUNDLES et al., 2005).

Apesar de existirem muitos dados sobre o efeito da desnutrição e o sistema imune, ainda há muito para ser investigado a cerca de seu efeito tardio após reposição nutricional. Grande parte dos estudos é realizada em animais desnutridos, mas que não foram “recuperados” total ou parcialmente da desnutrição, deixando com isso, lacunas quanto ao esclarecimento sobre o comportamento do sistema imune após recuperação total ou parcial do quadro de desnutrição promovido durante o período neonatal.

Além disso, são raros os trabalhos que tenham demonstrado relação entre este modelo experimental de desnutrição neonatal, com reposição nutricional e avaliação da resposta imune na vida adulta. Esta fase é considerada a ideal para estudo da função imune, uma vez que, o sistema imune está completamente formado e com toda a sua capacidade de resposta aos agentes infecciosos. Logo, estudos da infecção celular *in vitro* por *Staphylococcus aureus* de macrófagos alveolares e suas eventuais alterações em ratos que foram desnutridos precocemente e recuperados, ainda são necessários e contribuirão de forma importante para o planejamento de medidas eficazes no sentido de reduzir índices de morbidade e mortalidade de quadros infecciosos graves provocados por esta bactéria. Poderão, ainda, auxiliar no desenvolvimento de novos compostos para o tratamento de quadros infecciosos graves provocados por MRSA, por propiciar uma melhor compreensão do comportamento da principal célula do sistema inato de defesa do hospedeiro, o macrófago, frente a este potencial patógeno.

### **3. HIPÓTESES**

Desnutrição neonatal promovida pela caseína a 8%, e infecção celular *in vitro* por *Staphylococcus aureus* metilina resistente, quando comparada com *Staphylococcus aureus* metilina sensível, causam na vida adulta do animal (90-120 dias de vida):

- Redução do índice de aderência de macrófagos alveolares;
- Redução da taxa de fagocitose de macrófagos alveolares;
- Redução da atividade oxidante de macrófagos alveolares.

## **4. OBJETIVOS**

**Geral:**

- Verificar a associação entre a desnutrição neonatal, e a resposta microbicida de macrófagos alveolares após infecção celular, *in vitro*, com *Staphylococcus aureus* metilina resistente.

**Específicos:**

1. Verificar o índice de aderência (IA), a taxa de fagocitose (FAG), a produção de superóxido ( $O_2^-$ ) e do óxido nítrico (ON) dos macrófagos alveolares (MA) de ratos nutridos (N) e desnutridos (D) frente à infecção celular, *in vitro*, com *Staphylococcus aureus* metilina resistente;
2. Verificar o IA, a FAG, a produção de  $O_2^-$  e ON dos MA de ratos N e D frente à infecção celular, *in vitro*, com *Staphylococcus aureus* metilina sensível;
3. Comparar o IA, a FAG, a produção de  $O_2^-$  e ON dos MA de ratos N e D frente à infecção celular, *in vitro*, com *Staphylococcus aureus* metilina resistente e metilina sensível.

## **5. ANIMAIS, MATERIAIS E MÉTODOS**

## **5.1 Desenho do estudo**

Para este trabalho foi utilizado o desenho tipo experimental. Considerando que a desnutrição apresenta uma alta prevalência nos países em desenvolvimento, o estudo experimental é o que melhor se aplica para identificar eventuais relações entre desnutrição neonatal seguida de recuperação nutricional e resposta microbicida no organismo adulto. A escolha desse desenho metodológico de estudo é determinada pela grande comparabilidade entre os grupos em termos de variáveis de confundimento e facilidade na formação do grupo controle. A comparabilidade é garantida pela homogeneidade que os grupos apresentam quanto à idade, sexo, raça, tipo de dieta etc.

## **5.2 Animais, estado nutricional e peso corporal**

Foram utilizados 36 ratos machos, albinos, da linhagem *Wistar*, com idades entre 90 e 120 dias, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição, da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em biotério em gaiolas de propileno, com tampa de arame zincado, contendo um máximo de três animais por gaiola, a uma temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , em ciclo claro/escuro, com acesso livre à água e à ração.

Os animais foram obtidos acasalando-se machos e fêmeas, adultos, na proporção de um macho para três fêmeas, por um período de 16 dias (HARKNESS, 1993). O diagnóstico da prenhez foi feito pela observação do crescimento do ventre. Um dia após o nascimento, a ninhada foi padronizada em seis filhotes machos por mãe. Este número parece conferir maior potencial lactotrófico (FISHBECK E RASMUSSEN, 1987). Neste

mesmo dia, adotado como primeiro dia de vida do animal, as ninhadas foram divididas em três grupos (QUADRO 1):

- 1) **Nutrido Labina** - constituído por 12 filhotes amamentados por mães submetidas à dieta padrão do Biotério (Labina-Purina do Brasil) contendo 23% de proteínas mistas (TABELA 1);
- 2) **Nutrido Caseína** - constituído por 12 filhotes amamentados por mães submetidas à dieta contendo 17% de proteína à base de caseína utilizada como fonte protéica (TABELA 2);
- 3) **Desnutrido** - constituído por 12 filhotes amamentados por mães submetidas à dieta contendo 8% de proteína à base de caseína utilizada como fonte protéica (TABELA 2).

Os animais dos três grupos foram amamentados durante os primeiros 21 dias após o nascimento - período de aleitamento (HARKNESS, 1993). Nesse período foram registrados diariamente (em balança eletrônica digital – Marte, modelo S-4000-com sensibilidade de 0,1g) os pesos corporais (PC) de cada animal, a fim de acompanhar o peso corporal durante a manipulação nutricional. A partir do 22<sup>o</sup> dia de vida até o final do experimento, o peso corporal era aferido duas vezes por semana, objetivando acompanhar a recuperação nutricional dos animais (APÊNDICE 1). Após o desmame, no 22<sup>o</sup> dia de vida, os animais foram separados de suas mães, mantidos em gaiolas coletivas contendo 3 ratos em cada gaiola, e passaram a receber Labina®, dieta padrão do biotério.

QUADRO 1 - Organograma geral da distribuição dos grupos.

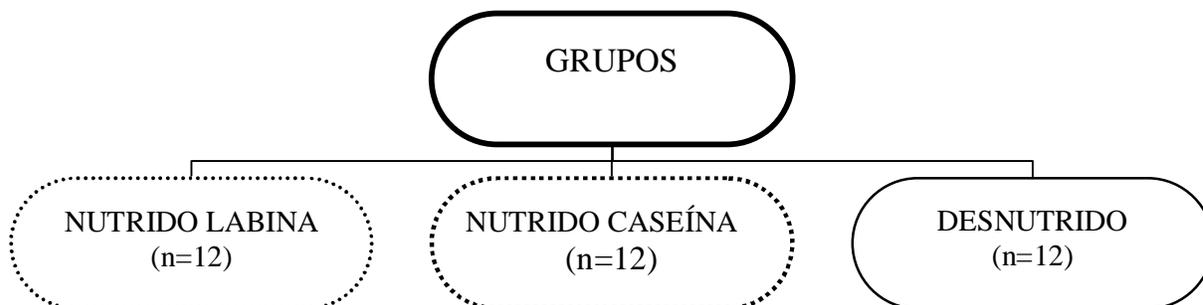


TABELA 1 - Composição da dieta padrão LABINA® (Purina do Brasil) utilizada na alimentação dos animais.

Enriquecimento		Enriquecimento		Níveis de garantia (%)	
<b>Vitamina A</b>	20000UI	<b>Piridoxina</b>	6mg	<b>Umidade (máx)</b>	13
<b>Vitamina D3</b>	6000UI	<b>Biotina</b>	0,1mg	<b>Proteína (min)</b>	23
<b>Vitamina E</b>	30UI	<b>Colina</b>	2000mg	<b>Extrato Etéreo</b>	2,5
<b>Vitamina K</b>	6mg	<b>Manganês</b>	50mg	<b>Matéria Fibrosa (máx)</b>	9,0
<b>Vitamina B12</b>	10mg	<b>Iodo</b>	2mg	<b>Matéria Mineral (máx)</b>	8,0
<b>Vitamina B2</b>	8mg	<b>Ferro</b>	65mg	<b>Cálcio (máx)</b>	1,8
<b>Pantetonato de Cálcio</b>	24 mg	<b>Zinco</b>	35mg	<b>Fósforo (min)</b>	0,0
<b>Niacina</b>	95mg	<b>Cobre</b>	26mg		
<b>Tiamina</b>	4mg	<b>Antioxidante</b>	100mg		
<b>Ácido Fólico</b>	0,5mg				

Fonte: Agribrands do Brasil Ltda.

TABELA 2 - Composição da dieta Caseína a 8% e a 17%, utilizada na alimentação dos animais.

INGREDIENTES	CASEÍNA A 8%	CASEÍNA A 17%
Caseína	79,3g	179,3g
Mix Vitamínico	10g	10g
Mix Mineral	35g	35g
Celulose	50g	50g
Bitartarato de Colina	2,5g	2,5g
DL-Metionina	3,0g	3,0g
Óleo de Soja	70mL	70mL
Amido de Milho	750,2g	650,2g

---

Fonte: AIN - 93G.

### 5.3 Cepas de *Staphylococcus aureus*

Foram utilizadas as cepas *S. aureus* metilicina resistente (American Type Culture Collection - ATCC 33591) e *S. aureus* metilicina sensível (ATCC 29213) pelo seu perfil distinto de resistência e por sua importância em termos de saúde pública. As cepas foram obtidas junto ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Departamento de Microbiologia Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Foram mantidas em caldo Tryptic Soy Broth (TSB), adicionado de 20% de glicerol e a uma temperatura de - 20°C até a sua utilização.

Vinte e quatro horas antes de cada experimento, as cepas foram semeadas em placas de Ágar Sangue (ágar suplementado com sangue de carneiro à 5%) e incubadas em

estufa a 37°C (FIGURA 1A). No início do ensaio, algumas colônias foram transferidas para tubos contendo PBS estéril, de forma a obter, com auxílio de espectrofotômetro a 570nm, uma turbidez de aproximadamente 0,15nm (FIGURA 1B). Esta absorbância, segundo Lu e McEwan, em 2007, corresponde aproximadamente à concentração de 10<sup>6</sup> bactérias/mL de PBS.

TABELA 3 - Características das Cepas *Staphylococcus aureus* utilizadas.

---

<b>Número ATCC®</b>	<b>33591™</b>
Organismo	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach
Isolamento	Não informado
Nível de Biossegurança	2
Condições de crescimento	Ágar ou Caldo Nutriente, Temperatura: 37.0°C
Comentários	Resistente à Meticilina
Aplicação	Microrganismo para testes de formulações para lavagem de mãos
<b>Número ATCC®</b>	<b>29213™</b>
Organismo	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach
Isolamento	Ferida
Nível de Biossegurança	2
Condições de crescimento	Ágar Trypticase soy , Temperatura: 37.0°C
Comentários	Sensibilidade à Oxacilina
Aplicação	Controle de qualidade Testes de susceptibilidade a antibióticos

---

Fonte: ATCC

#### **5.4 Lavado broncoalveolar**

O lavado broncoalveolar (LBA) foi obtido de acordo com a técnica utilizada por De Castro e colaboradores, em 1995. Sob efeito do anestésico, uretana 12.5% na proporção de 8 mL/kg i.p., o animal foi colocado em superfície plana de parafina e em decúbito dorsal. Com o objetivo de realizar o procedimento cirúrgico de traqueostomia, inicialmente, realizou-se uma assepsia do animal com álcool etílico a 70%. Em seguida, retiraram-se os pêlos e a pele na porção média do pescoço, abrindo-se e afastando-se as camadas musculares até obter acesso à traquéia (FIGURA 1C). Com uma pequena pinça, isolou-se a traquéia e, com uma tesoura foi feito um pequeno orifício entre dois anéis traqueais na porção ventral da mesma. Na seqüência, foi inserida uma cânula plástica acoplada a uma seringa contendo 3 ml de solução de NaCl a 0,9% (soro fisiológico-SF), à temperatura ambiente. Várias alíquotas de SF foram injetadas e imediatamente coletadas (FIGURA 1D). O LBA recolhido foi depositado em tubo de centrífuga, tipo Falcon de 50 ml. O procedimento de coleta do material foi realizado até se obter cerca de 30ml do LBA, para cada rato. O LBA foi armazenado em banho de gelo e ao abrigo da luz, até o início da etapa seguinte.

#### **5.5 Cultura de macrófagos alveolares**

Centrifugou-se amostras do LBA a 1500 rpm durante 15 minutos (FIGURA 1E). O precipitado que corresponde às células foi ressuspendido em RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen Corporation) contendo 3% de soro bovino fetal (Gibco-Invitrogen Corporation). A contagem foi realizada na Câmara de Neubauer colocando-se a suspensão de células e o corante Azul Tripán a 0.05% em uma diluição de 1:10. O Azul Tripán é um corante vital utilizado para avaliar a viabilidade e ao mesmo tempo promover a contagem

das células (FIGURA 1F). Após a contagem, as células foram ressuspensas em RPMI 1640 contendo soro fetal bovino a 3%.

As células foram transferidas para placas de cultura de 6 poços com 35 mm de diâmetro cada (Falcon), em uma proporção de  $10^6$  células/mL de RPMI 1640 em cada poço (FIGURA 1G). Após 1h na incubadora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, desprezou-se o sobrenadante com as células não aderentes e adicionou-se RPMI, deixando-se as placas por mais 1h em incubadora para estabilização das células.

### **5.6 Avaliação do índice de aderência**

Para avaliação do índice de aderência (IA), foram estabelecidos 3 sistemas: controle, contendo apenas macrófagos alveolares; MSSA, macrófagos alveolares mais 100µL de inoculo bacteriano referente a cepa sensível; e MRSA, macrófagos alveolares mais 100µL de inoculo bacteriano referente a cepa resistente. Após o período de 1 hora das células em cultura, foram retiradas alíquotas de sobrenadante, contendo células não aderentes e estas foram adicionadas ao corante azul Tripán na diluição de 1:10 e levadas para contagem das células em hemocítômetro. O IA foi calculado através da fórmula descrita por De La Fuente, 1991.

$$IA = 100 - \text{células não aderidas/mL} \div \text{n.º inicial de células/mL} \times 100.$$

### **5.7 Determinação da taxa de fagocitose**

Para este estudo, à suspensão de  $10^6$  células/ml de RPMI 1640 foi adicionado o inóculo bacteriano, para ambas as cepas, na concentração de  $10^6$  UFC/ml de PBS, sendo um volume final de 1,5 ml para cada tubo. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado, distribuído delicadamente, de maneira uniforme em lâminas para microscopia óptica,

previamente catalogadas. A catalogação era de conhecimento de um único profissional, de maneira a evitar possíveis vieses de análise durante a leitura. As lâminas foram colocadas em estufa por um período de 1 hora. Decorrido este tempo, foram lavadas para remoção das células não aderentes e coradas com kit Panótico Rápido. Depois de coradas e secas a temperatura ambiente, as lâminas foram levadas para leitura ao microscópio óptico, lidos com objetiva de 100 sob imersão, por observador treinado e “cego” para o grupo e o sistema a ser analisado. A taxa de fagocitose foi obtida como percentual de macrófagos que englobaram fungo em uma contagem total de 100 células (modificado de MALAGUEÑO et al, 1998).

### **5.8 Análise da produção de superóxido**

O ânion superóxido ( $O_2^-$ ) pode ser detectado pela sua habilidade em reduzir quimicamente um composto aceptor de elétrons. Para isso foi utilizado o ferrocitocromo C (30 mg/ml em Solução Balanceada e Tamponada de Hank - Hank's Buffered Salt Solution- HBSS,  $2.4 \times 10^{-3}$  M, Ferrocitocromo c de mitocôndria de cavalo, tipo VI, SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO). A especificidade do ensaio foi garantida pela adição de superóxido dismutase (SOD) de eritrócitos bovinos contendo 3000U/mg de proteína em solução final de 3mg/mL em água destilada (Sigma) (De Castro *et al.*, 2000).

Para a avaliação da produção de superóxido foram preparados 4 sistemas de análise descontínua com avaliação a cada 1h, durante um período de 2 horas: controle positivo, macrófagos em cultura (2ml/poço contendo  $10^6$  células/ml de RPMI 1640); controle negativo, adicionado de SOD; e dois sistemas teste, MSSA, macrófagos em cultura, adicionados desta cepa, na proporção de  $10^6$  bactérias/  $10^6$  de células/ml; e MRSA, com composição semelhante, diferindo apenas quanto à cepa adicionada.

A 1ª alíquota recolhida correspondia ao tempo "zero" de cada sistema e as amostras subsequentes 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 absorbância para nanomoles de  $O_2^-$ /min usando-se a fórmula:  $[O_2^-] = 205,49 \times \text{valor da absorbância} \times \text{volume da amostra coletada}$  (JOHNSTON, 1984).

### **5.9 Liberação de óxido nítrico**

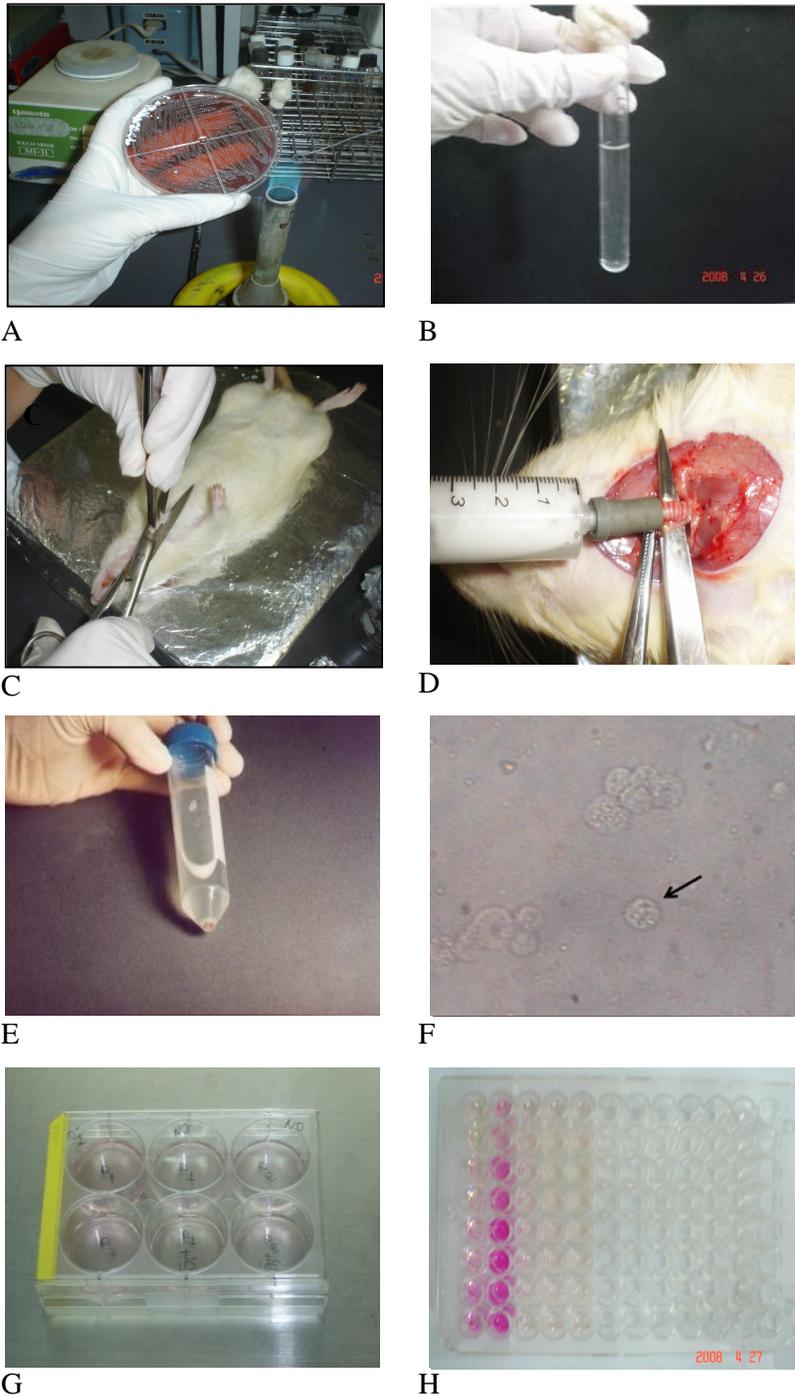
A produção de óxido nítrico (ON) foi determinada a partir de macrófagos em cultura, segundo o método descrito por Feder e Laskin, em 1994. Para a avaliação da produção de ON, foram estabelecidos 3 sistemas: controle, contendo apenas macrófagos alveolares; MSSA, macrófagos alveolares mais 100 $\mu$ L de inóculo bacteriano referente a cepa sensível; e MRSA, macrófagos alveolares mais 100 $\mu$ L de inóculo bacteriano referente a cepa resistente. As placas foram incubadas por 2 horas à 37°C em estufa. Para a quantificação de nitrato e nitrito, foram retirados 100  $\mu$ L do sobrenadante das culturas e acrescentado 50 $\mu$ l do reagente de Griess (1,5% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico -  $H_3PO_4$ , 0,1% de naftiletileno diamino diidrocloreto em  $H_2O$ ). Após um repouso de 10 minutos à temperatura ambiente, realizou-se a leitura em espectrofotômetro de placas tipo ELISA (Ensaio Imunoenzimático) com filtro de 550nm (FIGURA 1G). A concentração de nitrito foi calculada através de valores médios de uma curva padrão de nitrito de sódio ( $NaNO_2$ ) e os dados foram expressos em  $\mu$ M de nitrito/ml (APÊNDICE 2).

### **5.10 Análise estatística**

Na comparação entre os grupos, utilizou-se o teste t de Student. Os resultados foram representados em média  $\pm$  erro-padrão. A significância foi definida para  $p < 0,05$ . O software utilizado para as análises foi o SigmaStat®.

### **5. 11 Considerações éticas**

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco e seguiu as normas sugeridas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal, com o título “Desnutrição neonatal em ratos: estudo da função microbicida de macrófagos alveolares infectados *in vitro* com bactérias catalase positiva ou não” (ANEXO 1). A solitação de modificação do título foi enviada para a Comissão, estando esta de acordo com as normas e em vias de liberação (ANEXO 2).



**Figura 1:** **A.** Colônias bacterianas em placa de Ágar Sangue ; **B.** Inóculo bacteriano padronizado a 0,15 nm; **C.** Retirada de pêlos para início do procedimento cirúrgico de traqueostomia; **D.** Retirada do Lavado Broncoalveolar; **E.** Precipitado de células após centrifugação; **F.** Visualização da célula em Câmara de Neubauer (seta: célula corada com Azul Tripán); **G.** Células em placa tipo Falcon de 6 poços para cultura; **H.** Curva padrão de NaNO<sub>2</sub> e sobrenadante de células após adição de Reativo de Griess para análise de ON por ELISA.  
Fonte: Severo et al, 2009

## **6. ARTIGO I**

Dedico este artigo à Prof<sup>ª</sup>. Célia Castro.

Muitíssimo obrigada!

*“Feliz daquele que aprende o que ensina,  
e ensina o que aprende.”*

(Cora Coralina)

Com os dados obtidos através da análise da função microbica de macrófagos alveolares em ratos eutróficos, confeccionou-se o artigo intitulado: “Potencial microbica de macrófagos alveolares de ratos frente a *Staphylococcus aureus* metilina sensível/resistente”. Este artigo será submetido à revista Immunological Investigations, Thomson Scientific, Journal Citation Reports®, cujo fator de impacto é 1,529, ISSN: 1532-4311 (electronic) 0882-0139 (paper), Qualis A Internacional, Ciências Biológicas I e III.

ARTIGO ORIGINAL

Potencial microbicida de macrófagos alveolares de ratos frente a

*Staphylococcus aureus* meticilina sensível/resistente

*Microbicidal potential of alveolar macrophages of rats against*

*Staphylococcus aureus methicillin sensitive / resistant*

Maiara Santos Severo<sup>1,2</sup>

Natália Gomes de Morais<sup>1</sup>

Thacianna Barreto da Costa<sup>1</sup>

Maria do Amparo Andrade<sup>1,2</sup>

Célia Maria Machado Barbosa de Castro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Setor de Microbiologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

\*Endereço para correspondência:

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Setor de Microbiologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Campus Universitário, Cidade Universitária, Recife-PE-Brasil. CEP: 50670-901.

Tel.: + 55 81 2126 8484. E-mail: [cmmbc5@yahoo.com.br](mailto:cmmbc5@yahoo.com.br).

## RESUMO

O número de isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) têm aumentado significativamente nos últimos anos, e apesar dos inúmeros estudos, ainda não está claro se o MRSA é mais virulento que o *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA). Assim, torna-se importante avaliar a resposta microbicida de macrófagos frente à infecção com cepas MSSA e MRSA. Para isso, foram utilizados 12 ratos machos Wistar mantidos com idade ente 90 e 120 dias. Vinte quatro horas antes do experimento, as cepas MSSA ATCC 29213 ou MRSA ATCC 33591 foram plaqueadas em Ágar Sangue, minutos antes, aliqüotadas em tubos contendo PBS estéril cuja turbidez foi ajustada para a concentração de  $10^6$  UFC/mL. Macrófagos alveolares (MA) foram obtidos após traqueostomia, através da coleta de lavado broncoalveolar sendo formados *in vitro*: um sistema controle, composto por MA; dois sistemas testes, de acordo com a cepa utilizada, para avaliação dos parâmetros imunológicos. A análise estatística foi efetuada utilizando-se o teste t de Student com nível de significância estatística  $p < 0,05$ . Os resultados indicam que a resistência a meticilina parece não influenciar a função microbicida de macrófagos alveolares. Pode-se sugerir que as cepas utilizadas tenham igual susceptibilidade aos mecanismos microbicidas dos MA, apresentando a mesma capacidade de manter os parâmetros imunológicos testados próximos aos valores referentes às condições normais das células.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; meticilina; macrófago alveolar; função microbicida.

## INTRODUÇÃO

Os macrófagos apresentam papel proeminente na resposta imune inata frente as infecções e as injúrias teciduais, devido a sua habilidade de, uma vez ativados, aderir-se e fagocitar partículas como bactérias, produzir radicais livres como os ânions superóxido e óxido nítrico e secretar citocinas pró-inflamatórias (Meneghin e Hogaboam, 2007). No pulmão, são encontrados os macrófagos alveolares, que possuem papel central na manutenção da estrutura normal deste órgão e são de grande importância para a defesa contra microrganismos que comumente infectam o homem através das vias respiratórias (Weglarczyk et al., 2004).

*Staphylococcus aureus* é um dos patógenos humanos mais bem sucedidos, colonizando dois bilhões de indivíduos ao redor do mundo e causando infecções invasivas mesmo, em hospedeiro imunocompetentes. Ele pode evadir-se de múltiplos componentes do sistema imune inato, através de um arsenal de fatores de virulência, como o desenvolvimento de cápsulas e a produção de enzimas tais como: catalase, superóxido dismutase, e lactato desidrogenase óxido nítrico induzida, recentemente descoberta, que atuam driblando o mecanismo oxidativo de defesa dos fagócitos (Richardson, Libby e Fang, 2008).

*S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) é considerado, na atualidade, o principal patógeno envolvido tanto em infecções adquiridas na comunidade como em hospitais (Fournier e Philpott, 2005; Santos et al., 2007). Inúmeros estudos clínicos têm indicado, baseados em taxas de morbidade e mortalidade, que o MRSA é mais virulento que o *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA). Em contraste, estudos laboratoriais acerca da presença e magnitude de mecanismos patogênicos e fatores de virulência em cepas de MRSA e MSSA obtiveram resultados conflitantes (Cosgrove et al, 2003, Meskontso-Dessap et al, 2001; Rozgonyi et al, 2007).

Assim, o presente trabalho tem como objetivo a avaliar possíveis diferenças na atividade microbicida de macrófagos alveolares após infecção celular, *in vitro* por cepas MRSA e MSSA.

## **METODOLOGIA**

### **Animais**

Foram utilizados 12 ratos machos, albinos, da linhagem *Wistar*, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição, da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em biotério em gaiolas de propileno, com tampa de arame zincado, contendo um máximo de três animais por gaiola, a uma temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com ciclo fotoperiódico de claro-escuro de 12:12h, onde tiveram acesso livre à água e à ração.

### **Cepas de *Staphylococcus aureus***

Foram utilizadas as cepas *S. aureus* meticilina resistente (The American Type Culture Collection – ATCC 33591) e *S. aureus* metilicina sensível (ATCC 29213) pelo seu perfil distinto de resistência e por sua importância em termos de saúde pública. As cepas foram obtidas junto ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Departamento de Microbiologia Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Foram mantidas em caldo Tryptic Soy Broth (TSB), adicionado de 20% de glicerol e a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização.

Vinte e quatro horas antes de cada experimento, as cepas foram semeadas em placas de Ágar Sangue (ágar suplementado com sangue de carneiro a 5%) e incubadas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ . No início do ensaio, algumas colônias foram transferidas para tubos contendo PBS estéril (Figura 2), de forma a se obter, com auxílio de espectrofotômetro a 570nm, uma turbidez de aproximadamente 0,15nm. Esta absorbância, segundo Lu e

McEwan, em 2007, corresponde aproximadamente à concentração de  $10^6$  bactérias/mL de PBS.

### **Lavado broncoalveolar**

O lavado broncoalveolar (LBA) foi obtido de acordo com a técnica utilizada por De Castro et al., em 1995. Para isso, os animais foram anestesiados com uretana 12.5% na proporção de 8mL/kg i.p. O LBA foi coletado após a introdução de salina a 0,9% através de uma cânula plástica inserida na traquéia e em seguida, aspirada em várias alíquotas de 3mL. Foram coletadas em tubos cônicos de polipropileno de 50mL (Falcon, Sigma) recuperando-se, aproximadamente, 30mL de LBA para cada animal.

### **Cultura de macrófagos alveolares**

Centrifugou-se amostras do LBA a 1500 rpm durante 15 minutos. O precipitado que corresponde às células foi ressuscitado em RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen Corporation) contendo 3% de soro bovino fetal (Gibco-Invitrogen Corporation). As células foram transferidas para placas de cultura de seis poços com 35mm de diâmetro cada (Falcon), em uma proporção de  $10^6$  células/mL de RPMI 1640 em cada poço. Após 1h na incubadora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, desprezou-se o sobrenadante com as células não aderentes e adicionou-se RPMI, deixando-se as placas por mais 1h em incubadora para estabilização das células.

### **Avaliação do índice de aderência**

Para avaliação do índice de aderência (IA), foram estabelecidos três sistemas: controle (C), contendo apenas macrófagos alveolares; MSSA, macrófagos alveolares e 100µL de inóculo bacteriano referente a cepa sensível; MRSA, macrófagos alveolares e 100µL de inóculo bacteriano referente a cepa resistente. Após o período de 1 hora das

células em cultura, foram retiradas alíquotas de sobrenadante, contendo células não aderentes e estas foram adicionadas ao corante azul Tripán na diluição de 1:10 e levadas para contagem das células em hemocítômetro. O IA foi calculado através da fórmula descrita por De La Fuente et al., em 1991.

$$IA = 100 - \text{células não aderidas/mL} \div \text{divididas por n.º inicial de células/mL} \times 100.$$

### **Determinação da taxa de fagocitose**

Para este ensaio, à suspensão de  $10^6$  células/mL de RPMI 1640 foi adicionado o inóculo bacteriano, para ambas as cepas, na concentração de  $10^6$  UFC/mL de PBS, sendo o volume final de 1,5 mL para cada tubo. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado, distribuído delicadamente e de maneira uniforme sobre lâminas para microscopia óptica, previamente catalogadas. As lâminas foram colocadas em estufa por um período de 1 hora. Decorrido este tempo, foram lavadas para remoção das células não aderentes, coradas, visualizadas em microscópio óptico e lidas com objetiva de 100 sob imersão por observador treinado e “cego” para o sistema a ser analisado. O resultado foi expresso em percentual de células fagocitárias, em uma contagem total de 100 células (modificado de Malagueño et al, 1998).

### **Análise da produção de superóxido**

O ânion superóxido ( $O_2^-$ ) pode ser detectado pela sua habilidade em reduzir quimicamente um composto aceptor de elétrons. Para isso foi utilizado o ferrocitocromo C (30 mg/mL em HBSS,  $2.4 \times 10^{-3}$  M, Ferrocitocromo c de mitocôndria de cavalo, tipo VI, SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO). A especificidade do ensaio foi garantida pela adição de superóxido dismutase (SOD) de eritrócitos bovinos contendo 3000U/mg de proteína em solução final de 3mg/mL em água destilada (Sigma) (De Castro et al, 2000).

Para a avaliação da produção de superóxido foram preparados quatro sistemas de análise descontínua com avaliação a cada 1h, durante um período de 2 horas: controle positivo (C), macrófagos em cultura (2mL/poço contendo  $10^6$  células/mL de RPMI 1640); controle negativo, adicionado de SOD (resultados não demonstrados); e dois sistemas teste, MSSA, macrófagos em cultura, adicionados desta cepa, na proporção de  $10^6$  bactérias/ $10^6$  de células/mL e MRSA, com composição semelhante, diferindo apenas quanto à cepa adicionada.

A 1ª alíquota recolhida correspondia ao tempo "zero" de cada sistema e as amostras subsequentes 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 absorbância para nanomoles de  $O_2^-$ /min usando-se a fórmula:  $[O] = 205,49 \times \text{valor da absorbância} \times \text{volume da amostra coletada}$  (Johnston, 1984).

### **Liberação de óxido nítrico**

A produção de óxido nítrico (ON) foi determinada a partir de macrófagos em cultura, segundo o método descrito por Feder e Laskin, em 1994. Para a avaliação da produção de ON foram estabelecidos três sistemas: controle (C), contendo apenas macrófagos alveolares; MSSA, macrófagos alveolares e 100 $\mu$ L de inóculo bacteriano referente a cepa sensível; MRSA, macrófagos alveolares e 100 $\mu$ L de inóculo bacteriano referente a cepa resistente. As placas foram incubadas por 2 horas à 37°C em estufa. Para a quantificação de nitrato e nitrito foram retirados 100 $\mu$ L do sobrenadante das culturas e acrescentado 50 $\mu$ L do reagente de Griess (1,5% de sulfanilamida em 5% de  $H_3PO_4$ , 0,1% em  $H_2O$  de naftiletilene diamine diidrochloride). Após um repouso de 10 minutos à temperatura ambiente, realizou-se a leitura em leitor de ELISA com filtro de 550nm. A

concentração de nitrito foi calculada através de valores médios de uma curva padrão de  $\text{NaNO}_2$  e os dados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de nitrito/mL.

### **Análise estatística**

Na comparação entre os grupos, utilizou-se o teste t de Student. Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  erro-padrão. A significância foi definida para  $p < 0,05$ . O programa estatístico empregado para as análises foi o Sigma Stat®.

## **RESULTADOS**

### **Índice de Aderência (IA)**

Para o IA não houve diferença entre os sistemas C ( $87,5 \pm 3,0 \%$ ), MSSA ( $90,3 \pm 2,6 \%$ ) e MRSA ( $93,3 \pm 3,1 \%$ ) (Figura 1).

### **Taxa de fagocitose (TF)**

A figura 2 mostra que não foi encontrada diferença entre as médias da TF frente à cepa MRSA ( $12,1 \pm 3,0 \%$ ) quando comparada com a cepa MSSA ( $10,4 \pm 3,2 \%$ ).

### **Produção de superóxido ( $\text{O}_2^-$ )**

A produção de  $\text{O}_2^-$  no sobrenadante de cultura de macrófagos mostrou-se elevada da primeira para a segunda hora de incubação em todos os sistemas: C (1h:  $1,8 \pm 0,1$  / 2h:  $3,7 \pm 0,2$  nmoles/mL); MSSA (1h:  $1,9 \pm 0,1$  / 2h:  $3,8 \pm 0,2$  nmoles/mL); MRSA (1h:  $2,2 \pm 0,1$  / 2h:  $4,1 \pm 0,2$  nmoles/mL). Não houve diferença na produção deste ânion após estímulo com as cepas, quando comparado ao controle nos dois momentos de análise (Figura 3).

### **Produção de óxido nítrico (ON)**

Não foi observado aumento nos níveis dos níveis de ON quando os sistemas foram comparados (C:  $1,4 \pm 0,1$  / MSSA:  $1,4 \pm 0,1$  e MRSA  $1,4 \pm 0,1$   $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) (Figura 4).

## DISCUSSÃO

*Staphylococcus aureus* possui um poderoso repertório de fatores de evasão do sistema imune. O papel crucial da defesa inata do hospedeiro para eliminar o *S. aureus* é refletido pela abundância dos mecanismos que a bactéria utiliza para evadir-se dos fagócitos (Foster, 2005).

Células do sistema imune inato reconhecem patógenos por meio de receptores sem a necessidade de exposição prévia (Underhill e Ozinsky, 2002). Esses receptores, chamados de receptores de reconhecimento padrão, reconhecem elementos estruturais altamente conservados descritos como padrões moleculares ou PAMPs (“pathogen-associated microbial patterns”). Em bactérias Gram-positivas os PAMPs constituem vários componentes da parede celular microbiana, tais como: lipoproteínas, peptidoglicano e ácido lipoteicóico (Zähringer et al, 2008). Quando receptores das células do sistema imune são reconhecidos pela célula bacteriana e ligados, cascatas de sinalização são ativadas para a indução da resposta inflamatória. Há ativação de sinais de transdução que prolongam a sobrevivência da célula (Sabroe et al, 2003), promovem ou aumentam a adesão, fagocitose, liberação de citocinas, quimiocinas e radicais livres de oxigênio - ROIs (Sabroe et al, 2003; Hayashi, Means e Luster, 2003), contribuindo para a atividade microbicida.

Neste estudo, o objetivo foi analisar a atividade microbicida de macrófagos. Para isto, a capacidade de aderência e fagocitose e a produção de superóxido e óxido nítrico foram avaliados frente à bactéria *S. aureus*. Em nenhum dos ensaios realizados, observou-se diferença entre as cepas bacterianas, segundo a sensibilidade/resistência à meticilina.

No sítio de infecção ocorre reconhecimento do microrganismo e se inicia a fagocitose por parte de macrófago, com o espriamento e posterior aderência (Amer e Swanson, 2002). Ocorre então a ativação destas células e com isso, o aumento da

expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 (molécula de adesão intracelular-1) (Sporn et al, 1990). Assim sendo, a aderência do fagócito é crucial para a migração, diapedese e interação com outras células e componentes da matriz extracelular no sítio inflamatório. Isto é evidenciado pelo fato de que células aderidas apresentam maior capacidade fagocitária e menor complexidade de grânulos (Sköld et al, 1995).

No presente estudo, a co-incubação de macrófagos alveolares e cepas de *S. aureus* não promoveu alteração no índice de aderência destas células. Este fato pode ser justificado pela capacidade que o *S. aureus* apresenta em evadir-se do reconhecimento do sistema imune através de camuflagem, por meio de cápsulas de polissacarídeos ou biofilme e por produzirem ou secretarem moléculas específicas que bloqueiam a função do receptor de fagócitos (Deleo, Diep e Otto, 2009). Estudos indicam ainda, que tanto MSSA quanto MRSA apresentam a mesma magnitude de ligação a células epiteliais humanas (Duckworth & Jordens, 1990) e a corneócitos felinos (Wooley et al, 2007), sendo igualmente capazes de se aderir, ativando ou inibindo.

Da mesma forma, não foi evidenciada também qualquer diferença entre as taxas de fagocitose quando comparadas as cepas sensível (ATCC 29213) e resistente (ATCC 33591) utilizadas. Resultado semelhante foi descrito por Salgado, Pignatari e Bellinati-Pires, em 2004, quando demonstraram que MSSA e MRSA são igualmente susceptíveis aos fagócitos. Em 1989, Jordens, Duckworth, e Williams também não detectaram nenhuma diferença na ingestão de cepas de *S. aureus* sensíveis e resistentes à metilicina por neutrófilos humanos. Mekontso-Dessap et al., em 2001, tampouco observaram diferença na função fagocítica de neutrófilos e nem no percentual de sobrevivência das bactérias no interior da célula quando comparadas às cepas sensível e resistente à metilicina. Assim, parece que a reduzida ingestão de MRSA não está associada com o fenótipo de multirresistência, pelo menos sob condições experimentais.

A fagocitose de microrganismos ativa a oxidase dependente da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase (NADPH) que gera altos níveis de superóxido, em um processo tradicionalmente chamado de explosão respiratória (Quinn, Ammons e Deleo, 2006). O ânion superóxido tem vida curta, dismuta rapidamente em peróxido de hidrogênio e forma produtos reativos secundários. Esses produtos secundários, que incluem o ácido hipoclorito, radical hidroxila, cloraminas e oxigênio singleto, são compostos microbicidas efetivos (Klebanoff, 1968; Rosen e Klebanoff, 1977; Marcinkiewicz, 1997; Klebanoff, 2005). A importância da NADPH oxidase e dos reativos de oxigênio para a defesa do hospedeiro é exemplificada pela desordem hereditária conhecida pelo nome de doença granulomatosa crônica (DGC), na qual, existe um defeito nesta enzima. Indivíduos com DGC têm infecções fúngicas e bacterianas recorrentes especialmente causadas pelo *S. aureus* (Lekstrom-Himes e Gallin, 2000).

Estudos sobre a cinética da liberação deste ânion descrevem que há uma produção crescente de  $O_2^-$  durante as primeiras 6 horas após estímulo antigênico com acetato miristato de forbol (De Castro et al, 2000). No presente trabalho, a geração de  $O_2^-$  em sobrenadante de cultura de macrófagos foi crescente da 1<sup>a</sup>h para 2<sup>a</sup>h de incubação, tanto nos sistemas controle como nos estimulados pelas cepas MRSA e MSSA, demonstrando que a cinética respiratória para o radical estudado se mostrou adequada.

Kubica et al., em 2008, verificaram que após a fagocitose por macrófagos, *S. aureus* persistiu intracelularmente em vacúolos por 3-4 dias, antes da fuga para o citoplasma e posterior lise celular. Até a lise celular, os macrófagos infectados não apresentaram sinais de apoptose ou necrose e eram funcionais, isto é, a bactéria, além de poder persistir por vários dias dentro dos macrófagos, parecia ser capaz de escapar do confinamento intracelular e proliferar rapidamente no organismo do hospedeiro. Isso se deve ao grande arsenal de mecanismos de que este microrganismo dispõe para evadir-se

dos intermediários reativos microbicidas, aumentando a permanência desse microrganismo no interior do fagócito (Sibbald et al., 2006).

Sabe-se que uma vez ingerido, *S. aureus* lança mão da catalase e da superóxido dismutase para eliminar os radicais livres de oxigênio. Esta bactéria produz ainda toxinas e mecanismos que utilizam o ferro (Palazzo, et al., 2008). Além disto, foi descrita uma estafiloxantina, um carotenóide cuja estrutura e biossíntese foram recentemente elucidadas (Pelz et al, 2005). Esse composto encontra-se localizado na membrana celular bacteriana e pode ser considerado um antioxidante biológico contra o peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas. Segundo Clauditz et al., em 2006, a estafiloxantina desempenha um papel suplementar na defesa contra danos provocados pelos radicais livres de oxigênio e contribuem de forma mais ampla para a sobrevivência das células durante o estresse oxidativo e a resposta do hospedeiro. Esses achados podem justificar a ausência de diferenças entre as cepas MRSA e MSSA estudadas já que, independente do perfil de resistência antimicrobiana, a espécie bacteriana parece ser capaz de neutralizar os intermediários de oxigênio formado após sua internalização.

Os macrófagos ativados desencadeiam rapidamente a expressão de genes responsáveis não só pela síntese de espécies reativas de oxigênio, como também de intermediários do nitrogênio, como o óxido nítrico, e de lipídeos bioativos derivados do ácido araquidônico. Todos esses agentes contribuem para regulação da resposta inflamatória (Rahman, Biswas, e Kirkham, 2006). Segundo Macmicking, Xie e Mathan, em 1997, a produção de óxido nítrico parece ser o mecanismo antimicrobiano mais acentuado em macrófagos. Trata-se de um gás solúvel em água e lipídeos, livremente difusível e liberado (Costa et al, 2003) cuja citotoxicidade, resulta da sua ação direta com os metais presentes nas enzimas, principalmente o ferro, ou da sua ação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório, como o ânion superóxido, que

resulta na formação do peroxinitrito, um poderoso oxidante de proteínas (Beckman e Koppenol, 1996).

Foi demonstrado que a fagocitose de agentes biológicos induz altos níveis de óxido nítrico através da ativação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Cunha et al., 1993). No presente estudo, não houve diferença em relação à produção de óxido nítrico pelos macrófagos alveolares após infecção, *in vitro*, com MSSA ou MRSA. As cepas de *S. aureus* sensíveis e resistentes à metilicina podem ter inibido diretamente a ativação dos macrófagos e conseqüentemente a iNOS, ou ter neutralizado o óxido nítrico produzido, pois a produção desse radical se mostrou semelhante aos níveis basais observados nos macrófagos não estimulados.

Recentemente, Richardson, Libby e Fang, em 2008, descreveram a existência de um novo mecanismo de evasão do *S. aureus* frente ao sistema imune. Foi verificado que o *S. aureus* é capaz de adapta-se metabolicamente ao estresse nitrosativo por expressar uma desidrogenase induzível (NO-L-lactato) transcrita a partir da NO-desintoxicante flavohemoglobina. A produção NO-L-lactato permite que este microrganismo mantenha a homeostase durante o estresse redox nitrosativo, o que é essencial para a virulência destes patógenos.

Diante do exposto, pode concluir que não há evidências acerca da existência de diferenças entre a resposta microbicida de macrófagos alveolares, decorrente do estímulo bacteriano com a cepa MSSA (ATCC 29213) ou com a cepa MRSA (ATCC 33591). Sugerindo assim, como outros estudos quantitativos laboratoriais, que a resistência à metilicina parece não influenciar *per se* a capacidade de evasão que esta espécie bacteriana apresenta, especificamente, perante os macrófagos alveolares.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Amer, A.O.; Swanson, M.S. A phagosome of one's own: a microbial guide to life. *Macrophage Current Opinion in Microbiology* 2002; 5: 56-61.

Beckman J.S.; Koppenol W.H., Nitric Oxide, superoxide and peroxinitrito: the good, the bad and the ugly. *American Journal of Physiology* 1996; 271: 1474-1437.

Clauditz, A.; Resch, A.; Wieland, K.P.; Peschel, A.; Gotz, F.; Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and Its ability to cope with oxidative stress. *American Society for Microbiology* 2006; 74: 4950-4953.

Cosgrove, S. E., Sakoulas, G., Perencevich, E. N., Schwaber, M. J., Karchmer, A. W. & Carmeli, Y.. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2003; 36:53–59.

Costa, M.T.; Fabeni R.,C.; Aptekmann, K.P.; Machado, R.R.; The different roles of nitric oxide with focus on cancer. *Ciência Rural* 2003; 33: 967-974.

Cunha, F.Q. , Assreuy, J., Moncada, S. , Liew, F.Y. Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Immunology* 1993; 79: 408-411.

De Castro C.M., Bureau M.F., Nahori M.A., Dumarey C.H., Vargaftig B.B., Bachelet M. Modulation by dexamethasone of phospholipase A2 activities in endotoxemic guinea pigs. *J Appl Physiol.* 1995; 79:1271-1277.

De Castro C.M.M.B., De Castro R.M., Medeiros A.F., Santos A.Q., Silva W.T.F., Filho J.L.L. Effect of stress on the production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in alveolar macrophages. *J Neuroimmunol* 2000; 108:68-72.

De La Fuente M., Del Rio M., Ferrandez M.D., Hernanz A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. *Immunol* 1991; 73:205-211.

Deleo, F., Diep, B. A., Otto, M. Host defense and patogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Infect Dis Clin N Am* 2009; 23:17–34.

Duckworth G.J., Jordens J.Z. Adherence and survival properties of an epidemic methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* compared with those of methicillin-sensitive strains. J Med Microbiol 1990; 32: 195–200.

Feder L.S., Laskin D.L. 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.

Foster T.J. Immune evasion by staphylococci. Nat Rev Microbiol 2005;3: 948–58.

Fournier, B., Philpott, D.J. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. Clin Microb Rev 2005;18:521-540.

Hayashi F., Means T.K., Luster A.D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. Blood 2003;102:2660–2669.

Johnston Jr R.B. Measurement of  $O_2^-$  secreted by monocytes and macrophages. Methods Enzymol 1984; 105:365-369.

Jordens J.Z., Duckworth G.J., Williams RJ. Production of virulence factors by epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro. J Med Microbiol. 1989;30:245-252.

Klebanoff S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. J Leukoc Biol 2005;77: 598–625.

Klebanoff S.J. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. J Bacteriol 1968; 95:2131–8.

Kubica, M.; Guzik, K.; Koziel, J.; Zarebski, M.; Richter, W.; Gajkowska, B. et al. Potential New Pathway for *Staphylococcus aureus* Dissemination: The Silent Survival of *S. aureus* Phagocytosed by Human Monocyte-Derived Macrophages, PLoS ONE 2007; 3: 1409-1435.

Lekstrom-Himes J.A., Gallin J.I. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. N Engl J Med 2000;343:1703–1714.

Lu Y.F., McEwan N.A. Staphylococcal and micrococcal adherence to canine and feline corneocytes: quantification using a simple adhesion assay. *Veterinary Dermatology* 2007; 18: 29–35.

Macmicking J.; Xie Q.; Nathan C. Nitric Oxide and macrophage function. *Ann Rev of Immunology* 1997; 15: 233-247.

Malagueno, E; Albuquerque, C; Castro, C.M.M.B; Gadelha, M; Irmão, J.I; Santana, J.V. Effect of *Biomphalaria straminea* Plasma in the Phagocytosis of *Biomphalaria glabrata* hemolymph Cells. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1998; 3:301-302.

Marcinkiewicz J. Neutrophil chloramines: missing links between innate and acquired immunity. *Immunol Today* 1997;18:577–580.

Mekontso-Dessap A, Kirsch M. Brun-Buisson C, Loisanç D. Poststernotomy mediastinitis due to *Staphylococcus aureus*: comparison of methicillin-resistant and methicillin-susceptible cases. *Clin Infect Dis* 2001; 32:877-883.

Meneghin, A., and C. M. Hogaboam. 2007. Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis. *J. Clin. Investig.* 117:530-538.

Palazzolo-Ballance A.M., Reniere M.L., Braughton K.R, Sturdevant, D. E., Otto, M., Kreiswirth, B.N. et al. Neutrophil microbicides induce a pathogen survival response in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 2008;180:500–509.

Pelz, A.; Wieland, K.P., Putzbach, K.; Hentschel, P.; Albert, K.; Gotz, F.; Structure and Biosynthesis of Staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*, *The journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 32493-32498.

Quinn M.T., Ammons M.C., DeLeo F.R. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. *Clin Sci* 2006;111:1–20.

Rahman I, Biswas S.K., Kirkham P.A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol.* 2006;72: 1439-52.

Richardson, A.R., Libby, S.J., Fang, F.C. A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity. *Science* 2008;319:1672–1676.

Rosen H., Klebanoff S.J. Formation of singlet oxygen by the myeloperoxidase mediated antimicrobial system. *J Biol Chem* 1977; 252:4803–4810.

Rozgonyi F., Kocsis E., Kristo F, K., Nagy, K. Is MRSA more virulent than MSSA? *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 843–845.

Sabroe I., Prince L.R., Jones E.C., Horsburgh, M.J., Foster, S., Vogel, S.N. et al. Selective roles for toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol* 2003;170:5268–5275.

Salgado M.M., Pignatari A.C.C., Bellinati-Pires R. Phagocytosis and killing of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by human neutrophils and monocytes. *Braz J Infect Dis* 2004; 8: 80–89.

Santos A. L., Santos D. O., Freitas C. C., Ferreira B. L. A., Afonso I. F., Rodrigues C. R. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J. Bras. Patol. Med. Lab* 2007; 43: 413-423.

Sibbald, M. J. J. B.; Ziebandt, A. K.; Engelmann, S.; Hecker, M.; Jong, A. De; Harmsen, H. J. M.; Raangs, G. C.; Stokroos, I.; Arends, J. P.; Dubois, J. Y. F.; Van Dijl, J. M.; Mapping the Pathways to Staphylococcal Pathogenesis by Comparative Secretomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2006; 70: 755-788.

Sköld C.M., Barck C., Lundahl J., Johansson A. Different functional and morphological characteristics in a nonadherent subpopulation of human macrophages recovered by bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J* 1995; 8: 1719–1724.

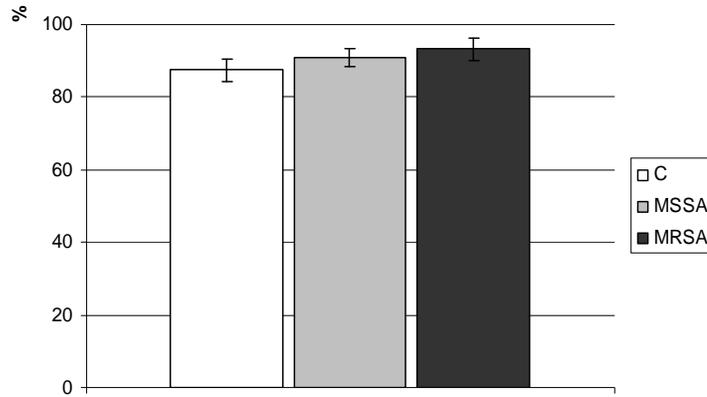
Sporn, S.A.; Eierman, D.F.; Johnson, C.E.; Morris, J.; Martin, G.; Ladner, M.; Haskill, S. Monocyte adherence results in selective induction of novel genes sharing homology with mediators of inflammation and tissue repair. *J Immunol*; 1990; 144,: 4434-4441.

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

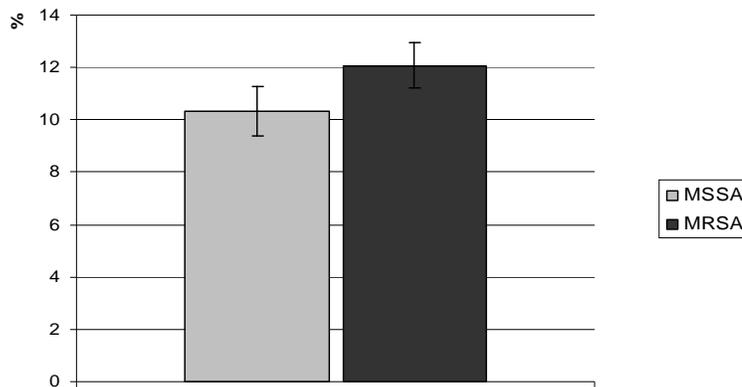
Weglarczyk, K; Baran, J; Zembala, M; Pryjma, J. Caspase-8 activation precedes alterations of mitochondrial membrane potential during monocyte apoptosis induced by phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2004;72:2590–2597.

Woolley, K. L.; Kelly, R. F.; Fazakerley, J.; Williams, N. J.; Nuttall, T. J.; Mcewan, N. A. Reduced in vitro adherence of *Staphylococcus* species to feline corneocytes compared to canine and human corneocytes. *The University of Liverpool Faculty of Veterinary Science*, 2007; 19: 1-6.

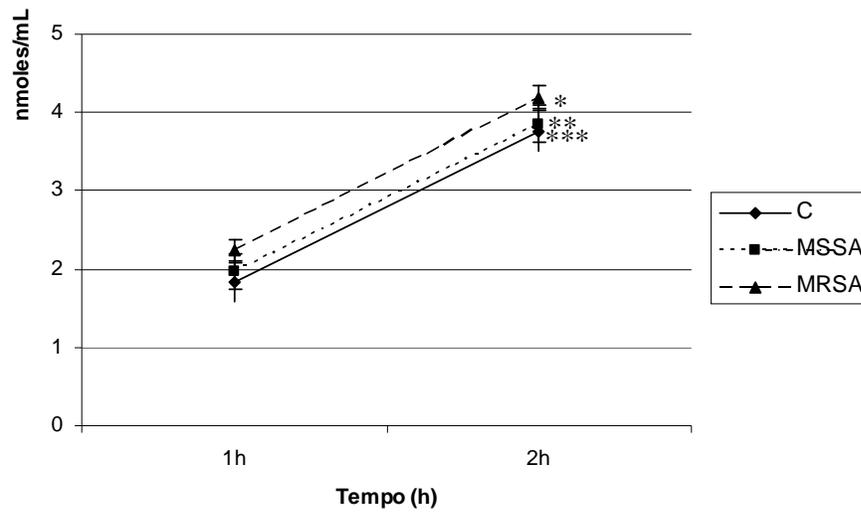
Za'hringer, B. Lindner, S. Inamura, H. Heine, C. Alexander, TLR2- promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity, *Immunobiology* 2008; 213: 205-224.



**Figura 1:** Índice de aderência dos macrófagos alveolares de ratos adultos para os sistemas: C, MSSA e MRSA. Teste t de Student. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão (n = 12).



**Figura 2:** Taxa de fagocitose dos macrófagos alveolares de ratos adultos para os sistemas C, MSSA e MRSA. Teste t de Student. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão (n = 12).

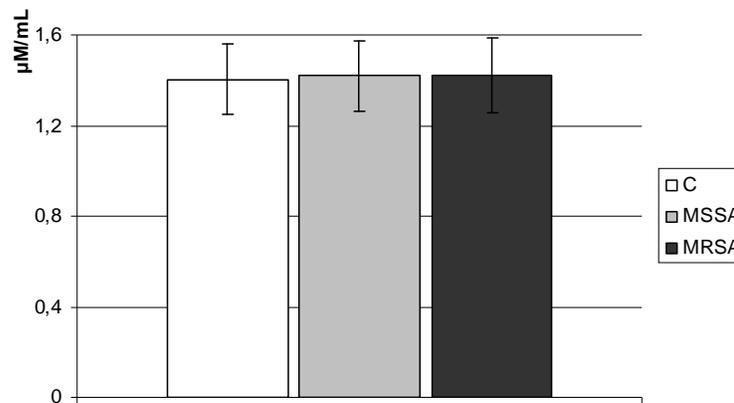


\*  $p < 0,05$  na comparação entre os tempos 1h e 2h, para o sistema C.

\*\*  $p < 0,05$  na comparação entre os tempos 1h e 2h, para o sistema MSSA.

\*\*\*  $p < 0,05$  na comparação entre os tempos 1h e 2h, para o sistema MRSA.

**Figura 3:** Produção de superóxido dos macrófagos alveolares de ratos adultos para os sistemas C, MSSA e MRSA, nos tempos 1h e 2h de incubação. Teste t de Student. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão (n = 12).



**Figura 4:** Liberação de óxido nítrico no sobrenadante das culturas dos macrófagos alveolares de ratos adultos para os sistemas C, MSSA e MRSA. Teste t de Student. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão (n = 12).

## **7. ARTIGO II**

Dedico este artigo à

Natália Gomes de Moraes

&

Thacianna Barreto da Costa.

Muito obrigada, meninas!

*“Ninguém é melhor do que todos nós juntos.”*

A partir dos dados obtidos com a análise da função microbica de macrófagos alveolares em ratos desnutridos durante a amamentação, confeccionou-se um artigo intitulado: “Desnutrição neonatal altera função microbica de macrófagos frente a *Staphylococcus aureus* metilina sensível/resistente”. Este artigo será submetido à Nutrition, da Editora Elsevier, ISSN 0899-9007, cujo fator de impacto é 2.104, Qualis A Internacional, Medicina I, II e III.

ARTIGO ORIGINAL

Desnutrição neonatal altera função microbicida de macrófagos frente à

*Staphylococcus aureus* metilina sensível/resistente

*Early malnutrition alters macrophage function against Staphylococcus aureus*

*methicillin sensitive/resistant in rats*

Maiara Santos Severo<sup>1,2</sup>

Thacianna Barreto da Costa<sup>1</sup>

Natália Gomes de Morais<sup>1</sup>

Maria do Amparo Andrade<sup>1,2</sup>

Célia Maria Machado Barbosa de Castro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Setor de Microbiologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

\*Endereço para correspondência:

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Setor de Microbiologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Campus Universitário, Cidade Universitária, Recife-PE-Brasil. CEP: 50670-901.

Tel.: + 55 81 2126 8484. E-mail: [cmmbe5@yahoo.com.br](mailto:cmmbe5@yahoo.com.br).

## RESUMO

**Objetivo:** Estudar em ratos submetidos à desnutrição neonatal, a função microbicida de macrófagos alveolares infectados, *in vitro*, com *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA) e resistente à meticilina (MRSA). **Metodologia:** Ratos machos Wistar (n=12/ 90 a 120 dias de vida) foram amamentados por mães cuja dieta continha 17% de proteína (grupo nutrido) e 8% de proteína (grupo desnutrido). Após desmame, ambos os grupos foram alimentados com dieta normoprotéica (23% de proteína). Todos os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12 h, e pesados diariamente até o 21º dia, em dias alternados e até a data do experimento (90-120 dias). Macrófagos alveolares (MA) foram obtidos após traqueostomia, através da coleta de lavado broncoalveolar sendo formados, *in vitro*: um sistema controle, composto por MA; dois sistemas testes, de acordo com a cepa utilizada, na concentração de  $10^6$  UFC/mL: MSSA ATCC 29213 e MRSA ATCC 33591. A análise estatística foi efetuada utilizando-se o teste t de Student,  $p < 0,05$ . **Resultados:** A desnutrição acarretou diminuição do crescimento ponderal, da taxa de fagocitose e da resposta oxidativa dos MA frente a *S. aureus*, não influenciando a aderência dos MA. Não foi observada diferença entre os sistemas em nenhum dos grupos. **Conclusões:** O modelo de desnutrição neonatal adotado produz seqüela no peso corporal e compromete a função dos macrófagos alveolares, mesmo após reposição nutricional. Ambas as cepas são capazes de manter os parâmetros imunológicos similares às concentrações normais, demonstrando a presença de mecanismos de evasão frente à resposta microbicida de MA.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; meticilina; macrófago alveolar; função microbicida; desnutrição neonatal.

## INTRODUÇÃO

O início da vida pode ser considerado crítico para o desenvolvimento do sistema imunológico. As agressões nutricionais poderão ocasionar comprometimento da resposta imunológica com seqüelas na capacidade de defesa do indivíduo adulto [1]. Na desnutrição, são comuns os danos causados à imunidade inespecífica, como por exemplo, a perda da integridade das barreiras físicas do epitélio e das mucosas [2]. Além disso, indivíduos severamente desnutridos apresentam deficiência em outros aspectos da resposta inata, tais como: redução na produção de citocinas [3] e do ânion superóxido, e migração e função fagocitária prejudicadas [4, 5].

Um dos principais mecanismos de defesa do trato respiratório inferior contra a invasão de microrganismos e outras partículas inaladas depende da capacidade fagocitária dos macrófagos [6]. Estas células constituem a segunda maior população celular do sistema imune e podem assumir formas morfológicas diferentes conforme sua localização, como, por exemplo, os macrófagos alveolares no pulmão [7]. Os mecanismos-chave da função fagocitária celular são a quimiotaxia (migração de células fagocíticas em direção ao sítio infectado), a fagocitose (reconhecimento, fixação e ingestão do microrganismo) e a morte ou degradação intracelular dos microrganismos ingeridos [8].

As bactérias estão entre os patógenos que mais causam infecções no homem. Dentre elas, *Staphylococcus aureus* merece destaque, tendo em vista que, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) é considerado na atualidade, o principal patógeno envolvido tanto em infecções adquiridas na comunidade como em hospitais [9]. Assim, diversos estudos têm buscado esclarecer a existência de diferenças entre cepas *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) e cepas resistentes (MRSA) [10, 11, 12].

Uma vez que são escassos os trabalhos demonstrando o efeito tardio da desnutrição precoce, após reposição nutricional do animal, sobre resposta imune, apesar das interações entre infecção e desnutrição estarem bem esclarecidas e revisadas, o presente trabalho se propõe avaliar possíveis diferenças na atividade de macrófagos alveolares após infecção celular, *in vitro*, por MSSA e MRSA, no que diz respeito aos animais nutridos e desnutridos nesta condição e se há seqüelas em parâmetros imunes no animal adulto.

## **METODOLOGIA**

### **Animais, estado nutricional e peso corporal**

Foram utilizados 12 ratos machos, albinos, da linhagem *Wistar*, com idade de 90 a 120 dias, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição, da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em biotério em gaiolas de propileno, com tampa de arame zincado, contendo um máximo de três animais por gaiola, a uma temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com ciclo fotoperiódico de claro-escuro de 12:12h, onde tiveram acesso livre à água e à ração.

Os animais foram obtidos acasalando-se machos e fêmeas, com idade entre 90 e 120 dias, na proporção de um macho para três fêmeas, por um período de 16 dias. O diagnóstico da prenhez foi feito pela observação do crescimento do ventre. Um dia após o nascimento, a ninhada foi padronizada em seis filhotes machos por mãe. Neste mesmo dia, adotado como primeiro dia de vida do animal, as ninhadas foram divididas em dois grupos:

- **Nutrido (N)** - constituído por 6 filhotes amamentados por mães submetidas à dieta contendo 17% de proteína à base de caseína utilizada como fonte protéica;
- **Desnutrido (D)** - constituído por 6 filhotes amamentados por mães submetidas à dieta contendo 8% de proteína à base de caseína utilizada como fonte protéica.

Os animais dos dois grupos foram amamentados durante os primeiros 21 dias após o nascimento - período de aleitamento. Nesse período foram registrados diariamente (em balança eletrônica digital – Marte, modelo S-4000-com sensibilidade de 0,1g) os pesos corporais (PC) de cada animal, a fim de acompanhar o peso corporal durante a manipulação nutricional. A partir do 22<sup>o</sup> dia de vida até o final do experimento, o peso corporal era aferido duas vezes por semana, objetivando acompanhar a recuperação nutricional dos animais. Após o desmame, no 22<sup>o</sup> dia de vida, os animais foram separados de suas mães, mantidos em gaiolas coletivas contendo 3 ratos em cada gaiola, e passaram a receber a Dieta Padrão do Biotério (Labina-Purina do Brasil), até a vida adulta (aproximadamente 90 dias).

### **Cepas de *Staphylococcus aureus***

Foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus* metilicina sensível (The American Type Culture Collection – ATCC 29213) e as cepas de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (ATCC 33591), pelo seu perfil distinto de resistência e por sua importância em termos de saúde pública. As cepas foram obtidas junto ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Departamento de Microbiologia Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Foram mantidas em caldo Tryptic Soy Broth, adicionado de 20% de glicerol e a uma temperatura de -20°C até a sua utilização.

Vinte e quatro horas antes de cada experimento, as cepas foram semeadas em placas de Ágar Sangue (ágar suplementado com sangue de carneiro à 5%) e incubadas em estufa a 37°C. No início do ensaio, algumas colônias foram transferidas para tubos contendo PBS estéril (Figura 2), de forma a obter, com auxílio de espectrofotômetro a 570nm, uma turbidez

de aproximadamente 0,15nm. Esta absorvância corresponde aproximadamente à concentração de  $10^6$  bactérias/mL de PBS [13].

### **Lavado broncoalveolar**

O lavado broncoalveolar (LBA) foi obtido de acordo com a técnica utilizada por De Castro *et al.* [14]. Para isso, os animais foram anestesiados com uretana 12.5% na proporção de 8 mL/kg i.p. O LBA foi coletado após a introdução de salina a 0,9% através de uma cânula plástica inserida na traquéia, e em seguida aspirada em várias alíquotas de 3 mL e foram coletadas em tubos cônicos de polipropileno de 50 mL (Falcon, Sigma). Recuperou-se aproximadamente 30 mL de LBA para cada animal.

### **Cultura de macrófagos alveolares**

Centrifugou-se amostras do LBA a 1500 rpm durante 15 minutos. O precipitado que corresponde às células foi ressuspenso em RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen Corporation) contendo 3% de soro bovino fetal (Gibco-Invitrogen Corporation). As células foram transferidas para placas de cultura de 6 poços com 35 mm de diâmetro cada (Falcon), em uma proporção de  $10^6$  células/mL de RPMI 1640 em cada poço. Após 1h na incubadora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, desprezou-se o sobrenadante com as células não aderentes e adicionou-se RPMI, deixando-se as placas por mais 1h em incubadora para estabilização das células.

### **Avaliação do índice de aderência**

Para avaliação do índice de aderência (IA), foram estabelecidos 3 sistemas: controle (C), contendo apenas macrófagos alveolares; MSSA, macrófagos alveolares mais 100µL de inóculo bacteriano referente a cepa sensível; e MRSA, macrófagos alveolares mais 100µL de

inóculo bacteriano referente a cepa resistente. Após o período de 1 hora das células em cultura, foram retiradas alíquotas de sobrenadante, contendo células não aderentes e estas foram adicionadas ao corante azul Tripán na diluição de 1:10 e levadas para contagem das células em hemocítmetro. O IA foi calculado através da fórmula [15]:

$$IA = 100 - \text{células não aderidas/mL} \div \text{n.º inicial de células/mL} \times 100.$$

### **Determinação da taxa de fagocitose**

Para este estudo, à suspensão de  $10^6$  células/mL de RPMI 1640 foi adicionado o inóculo bacteriano, para ambas as cepas, na concentração de  $10^6$  UFC/ml de PBS, sendo o volume final de 1,5 mL para cada tubo. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado, distribuído delicadamente, de maneira uniforme em lâminas para microscopia óptica, previamente catalogadas. As lâminas foram colocadas em estufa por um período de 1 hora. Decorrido este tempo, foram lavadas para remoção das células não aderentes, coradas, visualizadas em microscópio óptico e lidas com objetiva de 100 sob imersão por observador treinado e “cego” para o grupo e o sistema a ser analisado. O resultado foi expresso em percentual de células fagocíticas em uma contagem total de 100 células [16].

### **Análise da produção de superóxido**

O ânion superóxido ( $O_2^-$ ) pode ser detectado pela sua habilidade em reduzir quimicamente um composto aceptor de elétrons. Para isso foi utilizado o ferrocitocromo C (30 mg/ml em HBSS,  $2,4 \times 10^{-3}$  M, Ferrocitocromo c de mitocôndria de cavalo, tipo VI, SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO). A especificidade do ensaio foi garantida pela adição de superóxido dismutase (SOD) de eritrócitos bovinos contendo 3000U/mg de proteína em solução final de 3mg/mL em água destilada (Sigma) [17].

Para a avaliação da produção de superóxido foram preparados 4 sistemas de análise descontínua com avaliação a cada 1h, durante um período de 2 horas: controle positivo (C), macrófagos em cultura (2ml/poço contendo  $10^6$  células/ml de RPMI 1640); controle negativo, adicionado de SOD (resultados não demonstrados); e dois sistemas teste, MSSA, macrófagos em cultura, adicionados desta cepa, na proporção de  $10^6$  bactérias/  $10^6$  de células/ml; e MRSA, com composição semelhante, diferindo apenas quanto à cepa adicionada.

A 1ª alíquota recolhida correspondia ao tempo "zero" de cada sistema e as amostras subsequentes 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 absorbância para nanomoles de  $O_2^-$ /min usando-se a fórmula:  $[O] = 205,49 \times \text{valor da absorbância} \times \text{volume da amostra coletada}$  [18].

### **Liberação de óxido nítrico**

A produção de óxido nítrico (ON) foi determinada a partir de macrófagos em cultura segundo o método descrito por Feder & Laskin [19]. Para a avaliação da produção de óxido nítrico, foram estabelecidos 3 sistemas: controle (C), contendo apenas macrófagos alveolares; MSSA, macrófagos alveolares mais 100 $\mu$ L de inóculo bacteriano referente a cepa sensível; e MRSA, macrófagos alveolares mais 100 $\mu$ L de inóculo bacteriano referente a cepa resistente. As placas foram incubadas por 2 horas à 37°C em estufa. Para a quantificação de nitrato e nitrito, foram retirados 100  $\mu$ L do sobrenadante das culturas e acrescentado 50 $\mu$ l do reagente de Griess (1,5% de sulfanilamida em 5% de  $H_3PO_4$ , 0,1% em  $H_2O$  de naftiletilene diamine diidrochloride). Após um repouso de 10 minutos à temperatura ambiente, realizou-se a análise em leitor de ELISA com filtro de 550nm. A concentração de nitrito foi calculada através de

valores médios de uma curva padrão de  $\text{NaNO}_2$  e os dados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de nitrito/ml.

### **Análise estatística**

Na comparação entre os grupos, utilizou-se o teste t de Student. Os resultados foram representados em média  $\pm$  erro-padrão. A significância foi definida para  $p < 0,05$ . O programa estatístico empregado para as análises foi o Sigma Stat®.

## **RESULTADOS**

### **Peso corporal na desnutrição e após a reposição nutricional**

Nos primeiros dias de vida, os pesos corporais (g) dos grupos nutridos (N) e desnutridos precocemente (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 em relação aos dos animais nutridos. Entre o 23º e o 90º dia de vida ocorreu a reposição nutricional e os valores dos pesos do grupo desnutrido permaneceram menores quando comparados aos do grupo nutrido (Figura 1).

### **Índice de Aderência**

Os dados para o índice de aderência (Figura 2) indicam que a desnutrição neonatal não alterou o índice de aderência à superfície dos poços nas placas de cultura. Indicam ainda que, apesar da tendência de aumento da aderência após estímulo com as cepas, não houve diferença significativa entre os sistemas C, MSSA e MRSA, em nenhum dos grupos.

**Taxa de fagocitose**

Os dados para a taxa de fagocitose (Figura 3) demonstram que a dieta deficiente durante os primeiros 21 dias de vida, acarretou diminuição no percentual de células que fagocitaram as cepas utilizadas, não sendo encontrada diferença entre as médias de fagocitose para os sistemas MSSA e MRSA.

**Produção do superóxido**

A produção de superóxido no sobrenadante de cultura de macrófagos mostrou-se elevada da primeira para a segunda hora de incubação em ambos os grupos e em todos os sistemas. Não foi observada diferença na produção intragrupo, no que diz respeito aos sistemas teste e controle, em nenhum dos momentos. Houve diferença na comparação intergrupos para todos os sistemas e em ambos os tempos de incubação (Tabela 1).

**Liberação do óxido nítrico**

A liberação de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de macrófagos foi diminuída no grupo desnutrido, quando comparado com o grupo nutrido em todos os sistemas. A análise intragrupo indicou um discreto aumento dos níveis basais, expressos pelo sistema C, quando comparados com os sistemas teste, MSSA e MRSA, mas a análise estatística não revelou diferenças (Figura 4).

**DISCUSSÃO**

No presente estudo utilizou-se um modelo de desnutrição imposta no período de aleitamento, seguida de reposição nutricional e com as avaliações realizadas na vida adulta do animal. Observou-se que a desnutrição, neste modelo, produziu seqüela no animal adulto

representada pela redução da evolução ponderal e pelo comprometimento da função fagocitária e da atividade oxidativa dos macrófagos alveolares, estimulados ou não, com as cepas bacterianas.

A desnutrição precoce causou déficit no peso corporal, ocasionando um retardo da evolução ponderal durante o período de aleitamento. Estes dados estão de acordo com aqueles obtidos por Medeiros *et al.* [20], Porto *et al.* [21], Barros *et al.* [22] que empregaram a dieta básica regional (DBR), deficiente em todos os seus constituintes [23], como modelo experimental de desnutrição. Apesar dos diferentes modelos experimentais de desnutrição usados, neste estudo, a deficiência de proteínas promovida através de dietas contendo caseína em diferentes concentrações, mostrou-se eficiente para promover a desnutrição. A dieta contendo caseína a 8% caracteriza-se por ser hipoprotéica, parece acarretar comprometimento do teor protéico do leite de lactantes que a consomem, sendo determinante para a gênese de seus efeitos deletérios observados na prole.

A desnutrição ocorrida nesse período também influenciou o peso corporal dos animais na idade adulta. Estudos indicam que animais desnutridos durante os períodos pré e pós-natal, ao serem alimentados com dieta nutricionalmente adequada, melhoram o seu peso. Entretanto, este peso permanece inferior ao dos animais controle. A dieta padrão do biotério é equilibrada (Labina) e contém 23% de proteínas mistas e apesar de ser equilibrada não parece ser suficiente, para promover recuperação da deficiência de peso originada ainda na amamentação. Esses resultados corroboram com outros estudos [21, 22] que também encontraram redução do peso corporal verificada, inclusive, até a idade adulta.

Ainda não existem pesquisas relacionando desnutrição neonatal seguida de reposição nutricional sobre a função microbicida de macrófagos infectados, *in vitro*, com bactérias multirresistentes. Estudos anteriores analisaram a atividade de macrófagos em hospedeiros

submetidos à desnutrição protéica [5, 24], ou mesmo desnutridos precocemente [21] frente a parasitas e fungos, além de em condições de estresse [25] e em endotoxemia [26]. No presente trabalho, a função macrofágica foi avaliada após infecção celular, *in vitro*, com cepas de *Staphylococcus aureus* reconhecidas pelo ATCC e com perfis distintos de sensibilidade e resistência à meticilina. Trata-se de um microrganismo versátil, com características virulentas e que apresentam diversos mecanismos de resistência a sua disposição [27].

Neste estudo, em nenhum dos ensaios realizados, observou-se diferença entre as cepas bacterianas segundo a sensibilidade/resistência à meticilina. Outrossim, não foi encontrada diferença quando comparados os sistemas controle e testes estimulados pelas cepas. Estes resultados corroboram com aqueles obtidos por outros autores, que fizeram análises frente a diferentes cepas de *S. aureus* sensíveis/resistentes à meticilina, a função fagocitária de monócitos e de neutrófilos humanos [11, 28]. Estes dados podem ser justificados pela abundância de mecanismos que a bactéria utiliza para evadir-se dos fagócitos [29].

Sabe-se que *S. aureus* esconde-se do reconhecimento do sistema imune por meio de camuflagem através de cápsulas de polissacarídeos ou biofilme e da produção ou secreção moléculas específicas, que bloqueiam a função de receptor de fagócitos, inibindo a aderência e a fagocitose [30]. Produz ainda, após ser ingerido, enzimas como a catalase, superóxido dismutase e estafiloxantina, que funcionam como antioxidantes contra peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas microbicidas formados [31, 32, 33], além de NO-L-lactato desidrogenase induzível que permite que este microrganismo mantenha a homeostase durante o estresse redox nitrosativo [34]. Todos estes fatores, em conjunto, sugerem que as cepas de *S. aureus* utilizadas, independente do perfil de resistência à meticilina, são capazes de driblar a resposta de macrófagos sem alterar a aderência e a fagocitose, e produção de radicais

microbicidas como superóxido e óxido nítrico, propiciando sua sobrevivência no interior do macrófago, tanto no hospedeiro nutrido quanto no desnutrido durante a etapa inicial da vida.

A oferta de dieta hipoprotéica à base de proteína animal, na concentração de 8%, por lactantes durante o período de aleitamento, não alterou o percentual de aderência de macrófagos alveolares, com ou sem estímulo patogênico, sugerindo que esta etapa inicial da resposta imune de macrófagos pode não ser prejudicada pela desnutrição neonatal promovida com dieta à base de caseína. Chandra [2] observou que a desnutrição modifica diferentes etapas do processo fagocítico, principalmente em neutrófilos e macrófagos ativados. Assim, agressões nutricionais podem alterar mecanismos efetores dependentes da ativação de macrófagos, e não necessariamente anteriores a esta ativação.

Concordando com esta premissa, este estudo evidenciou que a desnutrição durante a amamentação ocasionou diminuição da fagocitose de macrófagos para ambos os sistemas. Segundo 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. Autores relataram ainda, diminuição da capacidade fagocítica em animais desnutridos [2] e submetidos à desnutrição neonatal [21].

Similarmente, a atividade oxidante de macrófagos frente a patógenos parece ser alterada pela desnutrição precoce. Os dados obtidos neste estudo demonstram que macrófagos alveolares de ratos desnutridos na etapa neonatal apresentam menor produção de superóxido, tanto em condições normais, quanto frente a estímulo bacteriano, não apresentando alteração na sua cinética após 2 horas de análise. Este achado pode ser justificado pelos estudos de Kawakami *et al.* [35], os quais verificaram que sistemas microbicidas de fagócitos são potencialmente afetados pela desnutrição. Ainda,

correlacionando-se com este resultado Redmond *et al.* [36] relataram prejuízo na produção de superóxido durante a desnutrição protéica severa, e estudos prévios no nosso laboratório também demonstraram diminuição na produção deste ânion, após estímulo antigênico com acetato miristato de forbol (PMA) (Sigma) em animais desnutridos precocemente [25, 26].

De maneira semelhante, neste estudo, a liberação de óxido nítrico também se mostrou reduzida em animais amamentados por mães submetidas à dieta hipoprotéica, após duas horas de incubação, e mesmo em ausência de estímulo com as cepas bacterianas. Outros pesquisadores relataram déficit na produção de ON na desnutrição [37, 38]. Dong e *et al.* [39] observaram diminuição na liberação desse agente microbicida por MA de ratos desnutridos, assim como Melo *et al.* [25] verificaram redução deste radical em ratos, utilizando dieta experimental distinta, como modelo de desnutrição e lipopolissacarídeo para indução da produção de ON durante 24 horas. Outros autores [21] também evidenciaram redução de ON utilizando LPS por 24 horas de incubação e fazendo uso de dieta semelhante à deste estudo.

Apesar de existirem muitos estudos sobre o efeito da desnutrição e suas repercussões sobre o sistema imunológico, ainda há muito a ser investigado a cerca do efeito tardio da desnutrição durante o período de aleitamento, após reposição nutricional e seus efeitos na vida adulta do animal. Em especial, no que diz respeito a um importante problema de saúde pública, como as infecções provocadas por cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. Desta forma, este trabalho poderá auxiliar a esclarecer inúmeras lacunas que ainda persistem no que diz respeito, aos diversos aspectos da resposta imunológica frente a esse patógeno e em indivíduos desnutridos precocemente.

## **CONCLUSÕES**

Desnutrição neonatal seguida de reposição nutricional acarreta, em ratos: redução do peso corporal do 4º dia de vida até a idade adulta, diminuição da fagocitose e da atividade oxidativa de macrófagos alveolares frente às cepas de MSSA e MRSA, que demonstraram igual susceptibilidade aos mecanismos microbicidas estudados.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

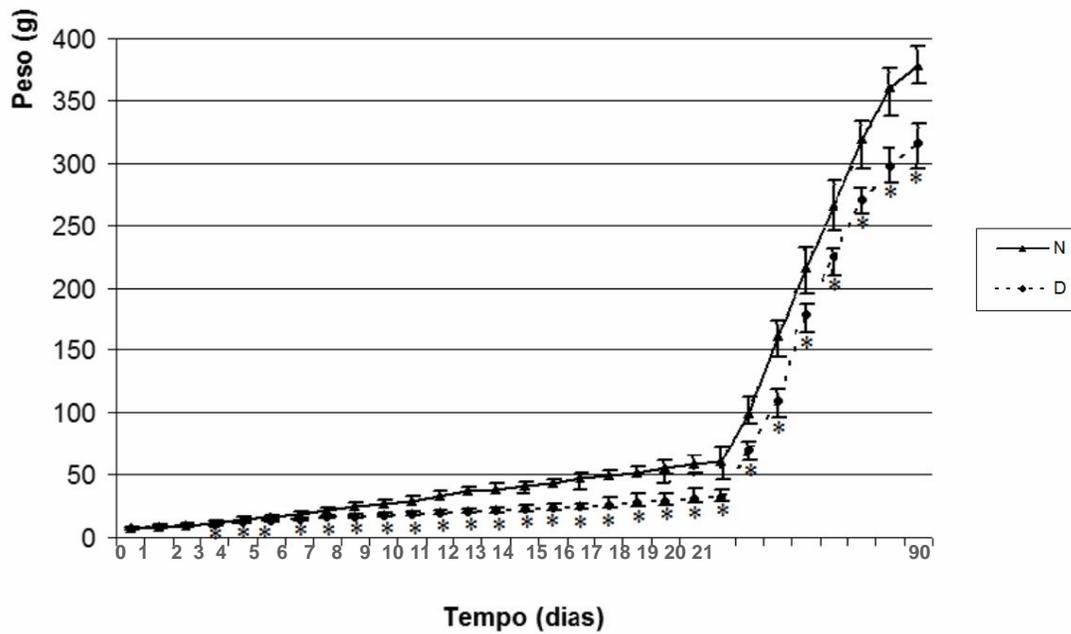
1. Wade, S., Lemonnier, D., Bleiberg, F., Delorme, J. Early nutritional experiments: effects on the humoral and cellular immune responses in mice. *J Nutr* 1983; 113:1131 – 9.
2. Chandra, R.K. Nutrition and immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 460 – 3.
3. Lesourd, M.B. Nutrition and immunity in the elderly: modification of immune responses with nutritional treatments. *Am J Clin Nutr* 1997;66: 478-84.
4. Reynolds, J. A., Redmond, P. H., Ueno, N., Steigman, C., Ziegler, M. M., Daly, J. M. et al. Impairment of Macrophage Activation and Granuloma Formation by Protein Deprivation in Mice. *Cellular immunology* 1992; 139: 493-04.
5. Borelli, P., Souza, I.P., Borojevic, R., Dagli, M.L.Z. and Kang, H.C. Protein malnutrition: some aspects of the in vitro adhesion of peritoneal mouse macrophages. *Ann Nutr Metab* 1998; 42: 367-73.
6. Wong, C.W., Thompson, H.L., Thong, Y.H., Thornton, J.R.. Effect of strenuous exercise stress on chemiluminescence response of equine alveolar macrophages. *Equine Vet J* 1990; 22:33-5.
7. Weglarczyk, K; Baran, J; Zembala, M; Pryjma, J. Caspase-8 activation precedes alterations of mitochondrial membrane potential during monocyte apoptosis induced by phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2004;72:2590–2597.
8. Cotran, R.S., Kumar, V.K., Robbins, S.L. Inflammation And Repair. In: Schoen, F.J. (ed). Robbins pathologic basis of disease. 5 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. p.51-92.
9. Santos, A. L. D. O., Freitas C. C., Ferreira B. L. A., Afonso I. F., Rodrigues C. R. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J Bras Patol Med Lab* 2007; 43: 413-23.

10. Cosgrove, S. E., Sakoulas, G., Perencevich, E. N., Schwaber, M. J., Karchmer, A. W. & Carmeli, Y.. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clin Infect Dis 2003; 36:53–59.
11. Mekontso-Dessap A, Kirsch M. Brun-Buisson C, Loïsançe D. Poststernotomy mediastinitis due to *Staphylococcus aureus*: comparison of methicillin-resistant and methicillin-susceptible cases. Clin Infect Dis 2001; 32:877-883.
12. Rozgonyi F., Kocsis E., Kristo F, K., Nagy, K. Is MRSA more virulent than MSSA? Clin Microbiol Infect 2007; 13: 843–845.
13. Lu YF, McEwan NA. Staphylococcal and micrococcal adherence to canine and feline corneocytes: quantification using a simple adhesion assay. Vet Dermat 2007; 18: 29–35.
14. De Castro C.M., Bureau M.F., Nahori M.A., Dumarey C.H., Vargaftig B.B., Bachelet M. Modulation by dexamethasone of phospholipase A2 activities in endotoxemic guinea pigs. J Appl Physiol. 1995; 79:1271-7.
15. De La Fuente M., Del Rio M., Ferrandez M.D., Hernanz A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. Immunol 1991; 73:205-11.
16. Malagueno, E; Albuquerque, C; De Castro, C.M.M.B., Gadelha, M; Irmão, J.I; Santana,J.V. Effect of Biomphalaria straminea Plasma in the Phagocytosis of Biomphalaria glabrata hemolyph Cells. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1998; 93:301-2.
17. De Castro C.M.M.B., De Castro R.M., Medeiros A.F., Santos A.Q., Silva W.T.F., Filho JLL. Effect of stress on the production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in alveolar macrophages. J Neuroimmunol. 2000; 108:68-72.
18. Johnston Jr, R.B. Measurement of O<sub>2</sub><sup>-</sup> secreted by monocytes and macrophages. Methods Enzymol 1984; 105:365-9.

19. Feder L.S., Laskin D.L. 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.
20. Medeiros J.M.B., Feitoza E.G., Magalhães. L. K., Cabral Filho J.E., Castro F.M.M., et al. Malnutrition during brain growth spurt alters the effect of fluoxetine on aggressive behavior in adult rats. *Nutr Neurosci (USA)* 2004; 7:49-52
21. Porto S, Araujo F.R.G., Melo J.F., Silva R.R., Silva K.M.F., Castro C.M.M.B. Cinética do perfil leucocitário do sangue, antes e após treinamento físico moderado, em ratos adultos desnutridos no período neonatal. *Anais Fac Med Univ Fed Pernambuco.* 2006; 51:59-65.
22. Barros K.M.F.T., Manhães de Castro R, Sousa S.L., Matos R.J.B., Deiró T.C.B.J., Cabral Filho JE, et al. A regional model (Northeast Brazil) of induced malnutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutr Neurosci (UK)* 2006; 9: 99-104.
23. Teodósio N.R., Lago E.S., Romani S.A.M., Guedes R.C.A. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Plant Foods Hum Nutr* 1990; 40: 289-96.
24. Souza I.P., Kang H.C., Nardinele L., Borelli P. Desnutrição protéica: efeito sobre o espraiamento, fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoneais. *Rev Bras Cienc Farm* 2001; 37:143-51.
25. Queiros-Santos A. Desnutrição precoce e estresse agudo: aspectos da resposta imunitária em ratos adultos [dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2000.
26. Melo, J. F. De Atividade oxidante-antioxidante de macrófagos alveolares em ratos endotoxêmicos submetidos à desnutrição neonatal. [dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2007.
27. Kanafani, Z. A., Fowler Jr, V. G. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. *Enferm Infecc Micrbiol Clin* 2006; 24:182-93.

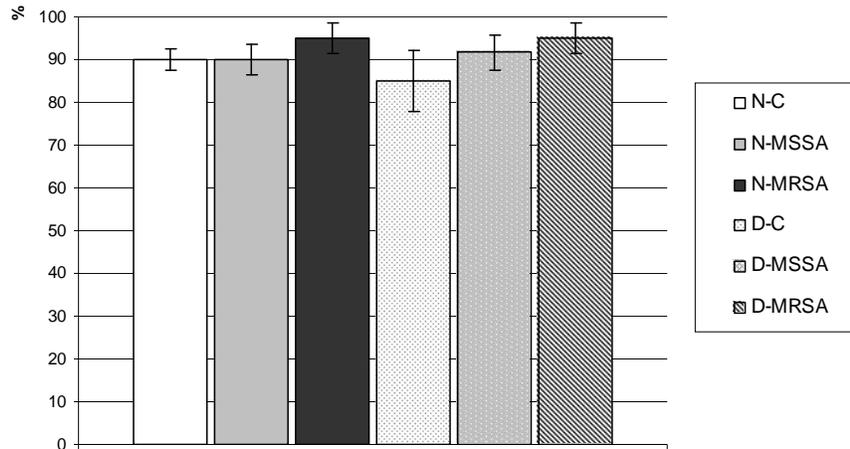
28. Salgado, M.M., Pignatari, A.C.C., Bellinati-Pires, R. Phagocytosis and killing of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by human neutrophils and monocytes. *Braz J Infect Dis* 2004; 8: 80–9.
29. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 2005;3: 948–58.
30. Deleo, F., Diep, B. A., Otto, M. Host defense and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Infect Dis Clin N Am* 2009; 23:17–34.
31. Palazzolo-Ballance A.M., Reniere M.L., Braughton K.R, Sturdevant, D. E., Otto, M., Kreiswirth, B.N. et al. Neutrophil microbicides induce a pathogen survival response in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 2008;180:500–9.
32. Pelz, A., Wieland, K.P., Putzbach, K., Hentschel, P., Albert, K., Gotz, F. Structure and Biosynthesis of Staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*, *The journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 32493-8.
33. Clauditz, A., Resch, A., Wieland, K.P., Peschel, A., Gotz, F. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and Its ability to cope with oxidative stress. *American Society for Microbiology* 2006; 74: 4950-3.
34. Richardson, A.R., Libby, S.J., Fang, F.C. A Nitric Oxide–Inducible Lactate Dehydrogenase Enables *Staphylococcus aureus* to Resist Innate Immunity; *Science*, 2008.
35. Kawakami, K., Kadota, J., Iida, K., Shirai, R., Abe, K., Kohno, S. Reduced immune function and malnutrition in the elderly. *Tohoku J. Exp. Med.*, v.187 (2), p.157-171, 1999.
36. Redmond, H.P., Leon, P., Lieberman, M.D., Hofmann, K., Shou, J., Reynolds, J.V., Goldfine, J., Johnston, R.B.Jr, Daly, J.M. Impaired macrophage function in severe protein-energy malnutrition. *Arch Surg*. 1991;126:192-6.

37. Chan, J., Tian, Y., Tanaka, K.E., Tsang, M.S., Yu, K., Salgame, P., Carroll, D., Kress, Y., Teitelbaum, R., Bloom, B.R. Effects of protein calorie malnutrition on tuberculosis in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93:14857-61.
38. Anstead, G.M., Chandrasekar, B., Zhao, W., Yang, J., Perez, L.E., Melby, P.C. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infection and Immunity.* 2001; 69:4709-18.
39. Dong, W., Selgrade, M.J.K., Gilmour, M.I., Lange, R.W., Park, P., Luster M.I., Kari, F.W. Altered alveolar macrophage function in calorie-restricted rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998; 19:462-9.

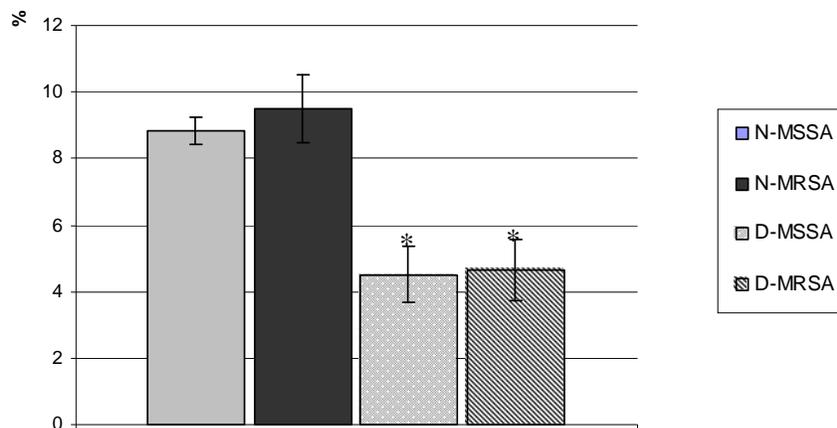


**Figura 1-** Evolução da curva ponderal durante a desnutrição neonatal (21 dias) e reposição nutricional (23-90 dias) dos grupos Caseína a 17% e a 8%. Dados expressos em média  $\pm$  erro-padrão para 12 animais.

\* $p < 0,05$  na comparação N e D.



**Figura 2:** Índice de aderência dos macrófagos alveolares de ratos adultos para os sistemas C, MSSA e MRSA. Teste t de Student. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão para 12 animais (6/grupo).



**Figura 3:** Taxa de fagocitose dos macrófagos alveolares de ratos adultos para os sistemas C, MSSA e MRSA. Teste t de Student. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão para 12 animais (6/grupo).

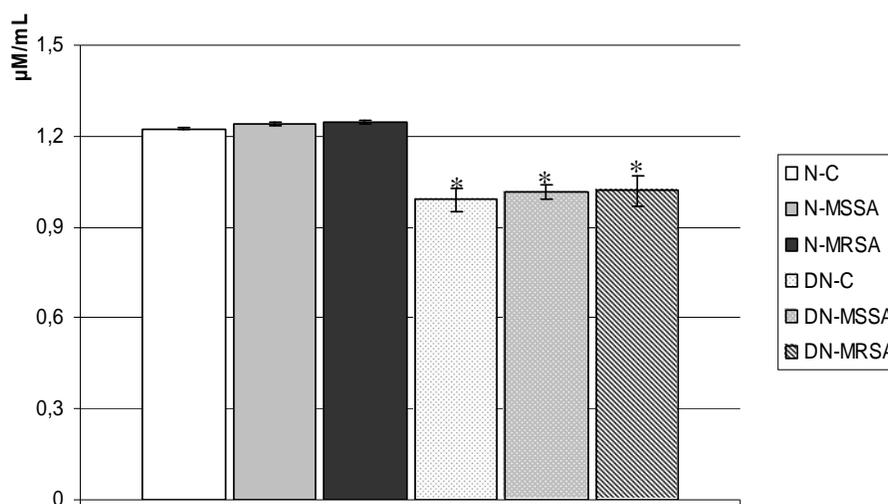
\*  $p < 0,05$  na comparação N e D

**Tabela 1**– Valores absolutos para a produção de  $O_2^-$  em todos os sistemas, de acordo com os grupos analisados e o tempo de incubação para 12 animais (6/grupo).

Tempo	1h			2h		
Sistemas	C	MSSA	MRSA	C	MSSA	MRSA
Grupos						
N	1,471±0,087	1,692±0,079	1,703±0,074	2,790±0,146#	2,886±0,193#	3,543±0,177#
D	1,077±0,089*	1,106±0,146*	1,118±0,081*	2,129±0,285#*	2,341±0,116#*	2,482±0,140#*

#  $p < 0,05$  na comparação 1<sup>a</sup>h e 2<sup>a</sup>h

\*  $p < 0,05$  na comparação N e D



**Figura 4:** Liberação de óxido nítrico no sobrenadante das culturas dos macrófagos alveolares de ratos adultos para os sistemas C, MSSA e MRSA. Teste t de Student. Valores expressos como média ± erro padrão para 12 animais (6/grupo).

\*  $p < 0,05$  na comparação N e D

## **8. CONCLUSÕES**

A desnutrição neonatal promovida pela dieta à base de caseína a 8% acarretou, mesmo seguida de reposição nutricional, redução do peso corporal a partir do 4º dia de vida pós-natal e até a vida adulta. Comprometeu ainda, a função microbicida de macrófagos alveolares, diminuindo a taxa de fagocitose e da atividade oxidativa frente às cepas MSSA e MRSA, não alterando, porém, o índice de aderência destas células e a susceptibilidade das cepas utilizadas para estímulo.

A cepa *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (ATCC 33591) mostrou-se igualmente susceptível aos mecanismos microbicidas de macrófagos alveolares de ratos, quando comparada com a cepa sensível (ATCC 29213), e a estimulação destas células com ambas as cepas não acarretou qualquer aumento no índice de aderência, na taxa de fagocitose e na atividade oxidativa no tempo estudado, para cada parâmetro.

## **9. PERSPECTIVAS**

O presente estudo despertou interesse para investigações adicionais a cerca da desnutrição neonatal e do estímulo bacteriano com cepas *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos. Estas investigações serão efetuadas por nosso grupo de pesquisa, levando-se em consideração os seguintes pontos:

- Modelo de desnutrição neonatal promovida pela Dieta Básica Regional (DBR), já em fase final de análise de resultados;
- Níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias em macrófagos estimulados ou não com as cepas utilizadas, já em fase inicial de avaliação;
- Atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase;
- Pesos do baço, timo e adrenal antes e após a desnutrição neonatal;
- Estímulo bacteriano com cepas *S. aureus* provenientes da Região Metropolitana do Recife e clones brasileiros de importância clínica;
- Infecção *in vivo* de ratos utilizando inóculos padronizados contendo cepas MSSA e MRSA;
- Cinética da liberação de óxido nítrico em macrófagos estimulados com cepas MSSA e MRSA.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Células e tecidos do Sistema Imunológico. In: Abbas, A.K.; Lichtman, A.H. **Immunologia Celular e Molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.26-28, 2005.

ADEREM, A., UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol**, v. 17, p. 593-623, 1999.

AMER, A.O.; SWANSON, M.S.; A phagosome of one's own: a microbial guide to life. Macrophage. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 56-61, 2002.

ANDRIOLO, A. **Guias de medicina ambulatorial e hospitalar**. São Paulo: Editora Manole, 2005.

AUGER, M.J., ROSS, J.A. The biology of the macrophages. In: **The natural immune system: the macrophage**. Eds. C.E. Lewis & J.O.D. McGee, IRL Press, Oxford, New York, Tokio, p.1-57, 1992.

BARBOSA-SILVA, M.C.G.; BARROS, A.J.D. Avaliação nutricional subjetiva. Parte 1 - Revisão de sua validade após duas décadas de uso. **Arq. Gastroenterol.**, v.39, n.3, São Paulo July/Sept, 2002.

BARROS, K.M.F.T.*et al.* A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 9, p. 99-104, 2006.

BATESON, P. *et al.* Developmental plasticity and human health. **Nature**, v. 430, p. 419-421, 2004.

BAUERLE, P.A.; RUPEC, R.A.; PAHL, H.L. Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. **Pathol Biol.**, v. 44, n. 1, p. 29-35, 1996.

BEAM, J. W., BUCKLEY, B. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Prevalence and Risk Factors. **Journal of Athletic.**, v.41, n. 3, p. 337-340, 2006.

BIRT, D.F., BAKER, P., HRUZA, D.S. Nutritional evaluations of three dietary levels of lactalbumin through the lifespan of two generations of Syrian hamsters. **J Nutr.**, v. 112, p. 2657-2660, 1982.

BORELLI, P. *et al.* Protein malnutrition: some aspects of the in vitro adhesion of peritoneal mouse macrophages. **Ann Nutr Metab.**, v. 42, p. 367-373, 1998.

BORELLI, BLATT S.L.; ROGERO MM, FOCK RA. Haematological alterations in protein malnutrition. **Rev Bras Hematol Hemoter.**, v. 26, p. 49-56, 2004.

BRUDASTOV, I.U.A., SBORETS, T.S., DERIABIN, D.G. Activity catalase and superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* during its persistence in the body. **Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.**, n. 2, p. 13-16, 2001.

BRUNDTLAND, G.H. Nutrition and infection: malnutrition and mortality in public health. **Nutr Rev.**, v. 58, p. 1-4, 2000.

CHANDRA, R.K. Nutrition and immune system: an introduction. **Am J Clin Nutr.**, v. 66, n.2, p. 460– 463, 1997.

COMBES, A. *et al.* The impact of methicillin resistance on the outcome of poststernotomy mediastinitis due to *Staphylococcus aureus*. **Clin Infect Dis.**, v. 38, p.822-829, 2004.

COSGROVE, S. E. *et al.* Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. **Clin Infect Dis.**, v. 36, p. 53–59, 2003.

COTRAN, R.S., KUMAR, V.K., ROBBINS, S.L. Inflammation and repair. In: SCHOEN, F.J. (ed). **Robbins pathologic basis of disease**. 5 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p.51-92, 1994.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S., MCNEELEY, D.F., MOON, A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.115, p. 1119-1128, 2005.

CUTLER, R.R. Relationship between antibiotic resistance, the production of "virulence factors", and virulence for experimental animals in *Staphylococcus aureus*. **J Med Microbiol.**, v.12, p. 55-62, 1979.

DE CASTRO, C.M.M.B. *et al.* Modulation by dexamethasone of phospholipase A2 activities in endotoxemic guinea pigs. **J Appl Physiol.**, v. 79, n. 4, p. 1271-1287, 1995.

DE CASTRO, C.M.M. B. *et al.* Effect of stress on the production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in alveolar macrophages. **J Neuroimmunol.**; v. 108, n. ½, p. 68-72, 2000.

DE CASTRO, C.M.M.B. *et al.* Estresse: Interações neuroendócrinas e imunológicas. **Anais Faculd de Méd CCS-UFPE**. v. 44, n. 2, p. 132-137, 1999.

DE LA FUENTE, M. *et al.* Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. **Immunol.**, v.73, n.2, p.205-211, 1991.

DE LENCASTRE, H. *et al.* Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 35, p. 632-639, 1991.

DELVES, P.J.; ROITT, I.M. The Immune System: First of Two Parts. **Advances in Immunology**, v. 354, n. 1, p. 37-49, 2000.

DERIVI, S. C. N. *et al.* Efeito hipoglicêmico de rações à base de berinjela (*Solanum melongena*,L.), em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n .2, p .164-169, 2002.

DINARELLO, C. A. Biological basis for interleukin-1 in disease. **Blood**. v.87, p. 2065-2147, 1996.

DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. In: DAVISON, A.N.; DOBBING, J. (ed) Applied Neurochemistry. **Oxford Blackwell**, p. 287-316, 1968.

DUSSE, L.M.S., VIEIRA, L.M., CARVALHO, M.G., Nitric oxide revision; **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.4, 2003.

FEDER, L.S., LASKIN, D.L. 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.**, v. 55, n. 4, p. 507-513, 1994.

FEDTKE, I., GÖTZ, F., PESCHEL, A. Bacterial evasion of innate host defenses – the *Staphylococcus* lesson. **Int J Med Microbiol.**; v. 294, n. 2/3, p. 189-94, 2004.

FISHBECK, K.L., RASMUSSEN, K.M. Effect of repeated cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.117, n.11, p.1967-1975, 1987.

FOURNIER, B., PHILPOTT, D.J. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. **Clin Microb Rev.**, v. 18, n. 3, p. 521-540, 2005.

GOBEL, H. *et al.* Die exteroceptive Suppression der Aktivität des M. temporalis in der Analyse von Schmerzmechanismen. **Der Schmerz**, v.10, p. 121-129, 1996.

GUEDES, R.C.A., MELO, A.P.R., TEODÓSIO, N.R. Nutrição adequada: a base do funcionamento cerebral. **Cienc. Cult.**, v.56 , n.1, 2004.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, p. 595-601, 1992.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals reactive species and toxicology. Free radicals in biology and medicine, New York: **Oxford University Press**, p.544-616, 1999.

HAMPTON, M.B., KETTLE, A.J., WINTERBOURN, C.C. Involvement of superoxide and myeloperoxidase in oxygen-dependent killing of *Staphylococcus aureus* by neutrophils. **Infect Immun.**; v. 64, n.9, p. 3512-3519; 1996.

HARKNESS, J.E. Biologia e manejo. In **Biologia clínica de coelhos e roedores**. Roca, cap. 2, p.9-55, 1993.

HATSUKARI, I., HITOSUGI, N. Morphine modulates monocyte-macrophage conversion phase, **Cellular Immunology**. v. 239, p. 41-48, 2006.

HOLGATE, S.T., CHURCH, M.K. **Allergy**. Trad OLIVEIRA NG. Manole, São Paulo, p 7.1-7.7; 1996.

HUME, D.A. *et al.* The mononuclear phagocyte system revisited; **Journal of Leukocyte Biology**, v. 72, p. 621-627, 2002.

IKEDA. Genome analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: "waiting for Godot". **Immunogenetics**, v. 55, n. 8, p. 570-578, 2003.

JOHNSTON JR, R.B. Measurement of O<sub>2</sub>- secreted by monocytes and macrophages. **Methods Enzymol.**, v. 105, p.365-369, 1984.

KANAFANI, Z. A. & FOWLER JR, V. G. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. **Enferm Infecc Micrbiol Clin.**, v.24, n. 3, p .182-93, 2006.

KLIMP, A.H. *et al.*; A potencial role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, in press, 2001.

KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M. **Diagnóstico Microbiológico**. 5.ed., São Paulo: MEDSI, Cap. 15, p. 795-865, Cap. 11, p. 551-588, 2001.

LESOURD, M.B. Nutrition and immunity in the elderly: modification of immune rponses with nutritional treatments. **Am J Clin Nutr.**, v.66, p. 478-484, 1997.

LU, Y.F., MCEWAN, N.A. *Staphylococcal* and *micrococcal* adherence to canine and feline corneocytes: quantification using a simple adhesion assay. **Veterinary Dermatology**, v.18, p. 29-35, 2007.

LUCAS, A., FEWTRELL, M.S., COLE, T.J. Fetal origins of adult disease – the hypothesis revisited. **British Medical Association**, London, v.319, p. 245-249, 1999.

MACHADO, P.R.L. *et al.* Immune response mechanisms to infections, **An bras Dermatol**, v.79, n.6, p. 647-664, 2004.

MALAGUENO, E. *et al.* Effect of *Biomphalaria straminea* Plasma in the Phagocytosis of *Biomphalaria glabrata* hemolyph Cells. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93 n.1, p.301-302, 1998.

MANDELL, G. Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on *staphylococcal*-leukocyte interaction. **J Clin Invest.**, v. 55, p.561-566, 1975.

MCGUIRE, M.K. *et al.* Pre- and postweaning food restrictions illteract to determine reproductive sucess and milk volume in rats. **J Nutr.**, v.125, p. 2400- 2466, 1995.

MEKONTSO-DESSAP, A. *et al.* Poststernotomy mediastinitis due to *Staphylococcus aureus*: comparison of methicillin-resistant and methicillin-susceptible cases. **Clin Infect Dis.**, v.32, p. 877-883, 2001.

MELO, J. F. DE **Atividade oxidante-antioxidante de macrófagos alveolares em ratos endotoxêmicos submetidos à desnutrição neonatal**. 2007. 75 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Review**, v.43, n.2, p.109-142, 1991.

MORGAN, G. What, if any, is the effect of malnutrition on immunological competence? **The Lancet.**, v. 349, p.1693-1695, 1997.

MORGANE, P.J. Malnutrition and the development of the brain. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 17, p. 91-128, 1993.

OSLON, R.E. Evolución de la investigación en nutrición. In: OPS. **Conocimientos actuales sobre nutrición**. 6. ed. Washington, p. 582-586, 1991.

PARKIN, J. An overview of the immune system. **The Lancet**, v.357, p.1777-1789, 2001.

PERCEGONI, N. *et al.* Efeito de caseína, proteína isolada de soja e colestiramina em coelhos hiperlipidêmicos **Rev. ciênc. farm.**, v.25, n.2, p.99-110, 2004.

PITHON-CURI, T.C. *et al.* Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47phox, p22phox and gp91phox in rat neutrophils. **Clin Sci.**, v.103, n.4, p.403-8, 2002.

PORTO, S.M.M.S. *et al.* Desnutrição neonatal e microbiota normal da cavidade oral em ratos. **Rev. Nutr.**, v.20, n. 6, p. 625-632, 2007.

REMONATTO, G. *et al.* CA-MRSA: um patógeno emergente. **NewsLab**, ed. 80, 2007.

RESNICK, O. *et al.* Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat. **Neurosci. Behav. Rev.** v. 3, p. 233-246, 1979.

REYNOLDS, J. A. *et al.* Impairment of Macrophage Activation and Granuloma Formation by Protein Deprivation in Mice. **Cellular immunology**, v. 139, p. 493-504, 1992.

RIBEIRO, A. *et al.* First Report of Infection with Community-Acquired Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in South America. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p. 1985-1988, 2005.

RICARDO, S.B. **Emergência de *S. aureus* metilina resistente (MRSA) na comunidade; Prática Hospitalar**, n.34, p. 131-134, 2004.

ROSENTHAL, K.L. Tweaking innate immunity: the promise of innate immunologicals as anti-infectives; **Journal Infect Dis Med Microbiol**; v. 17, n.5, p. 307-313, 2006.

SAMPAIO, S.C.; Espriamento, fagocitose, atividade fungicida e metabólitos reativos do oxigênio e do nitrogênio – Como avaliar função de macrófagos. **Como cultivar células**, Peris Curi; 2005.

SANTOS, A. L., *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar • **J Bras Patol Med Lab.**; v. 43, n. 6 , p. 413-423, 2007.

SCHNEIDER, C.D., OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, v.10, p. 1-6, 2004.

SEADI, C. **Princípios Básicos de Imunologia**. 1ªed., Ulbra, Canoas, 1998.

SIBBALD, M.J. *et al.* Mapping the pathways to *Staphylococcal* pathogenesis by comparative secretomics. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v.70, n.3, p.755-88; 2006.

SOUZA, M.V., REIS, C., PIMENTA, F.C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos, **Revista de Patologia Tropical**, v.34, n.1, p. 27-36, 2005.

SPIANDORELLO, W.P. *et al.* A resistência do *Staphylococcus aureus* à oxacilina em hospital de Caxias do Sul. **Revista AMRIGS**, Porto Alegre, v.44, n. 3/4, p. 120-125, 2000.

SPORN, S.A. *et al.* Monocyte adherence results in selective induction of novel genes sharing homology with mediators of inflammation and tissue repair. **J Immunol.**,v. 144, n.11, p. 4434-4441, 1990.

SPRINGALL, D.R.; Nitric oxide - Friend and foe. editorial. **Journal Pathology**, v.175, p.165-166, 1995.

SRINIVASAN, M., PATEL, M. S. Metabolic programming in the immediate postnatal period. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 19, p. 146-152, 2008.

STEBBENS, W.E. Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS. **Exp Mol Pathol.**, v. 77, p.121-32, 2004.

STEWART, R.J.C., PREECE, R.F., SHEPPART, H.G. The long-term effects of marginal protein energy deficiency. **Proc Nutr Sor.**, v. 32, p. 102, 1973.

SWANSON, J.A., BAER, S.C., Phagocytosis by zippers and triggers. **Trends in cell biology**, v.5, p. 89-93, 1995.

TEODÓSIO, N.R. *et al.* Regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Archivos Latinoamericanos de Nutritión**, v. 40, n. 4, p.533-547, 1990.

TIEMERSMA, E. W. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999–2002. European Antimicrobial Resistance Surveillance System. **Emerg Infect Dis.**, v. 10, p. 1627–1634, 2004.

TOMAZ, A. *et al.* New mechanism for methicillin-resistance in *S. aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicilin-binding proteins with modified penicilin-binding capacity. **Antimicrob Agents Chemother**, 1989.

URSO, M.L., CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicol.**, v. 189, p.41-54, 2003.

WADE, S. *et al.* Early nutritional experiments: effects on the humoral and cellular immune responses in mice. **J Nutr.**, v. 113, n.6, p. 1131 – 1139, 1983.

WEGLARCZYK, K. *et al.* Caspase-8 activation precedes alterations of mitochondrial membrane potential during monocyte apoptosis induced by phagocytosis and killing *Staphylococcus aureus*. **Infec. Immun.**, v. 72, n. 5, p.2590-2597, 2004.

WINICK, M., COOMBS, J. Nutrition, environment, and behavioral development. **Annual Review of Medicine**, v. 23, p. 149-160, 1972.

WONG, C.W. *et al.* Effect of strenuous exercise stress on chemiluminescence response of equine alveolar macrophages. **Equine Vet. J.**, v.22, p. 33-35, 1990.

WUNDER, C.T., SETUBAL, R. Principais patógenos bacterianos em UTI: avaliação da resistência em cinco anos. **Arq. Bras. Med. Naval**, v.65, n.1, p. 7-21, 2004.

ZAPOLSKA-DONAR, D. *et al.* Ibuprofen inhibits adhesiveness of monocytes to endothelium and reduces cellular oxidative stress in smokers and no-smokers. **Eur J Clin Invest.**, v. 30, p. 1002-1010, 2000.

## **APÊNDICES**

### APÊNDICE 1 – Planilha de evolução ponderal

#### PLANILHA DE EVOLUÇÃO PONDERAL

Projeto de Mestrado: Simone Fraga

GRUPO: \_\_\_\_\_ GAIOLA: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

D.N.:

DATAS		PESO DOS ANIMAIS (g)					
		PAD - 1	PAE - 2	DM - 3	DP - 4	PPD - 5	PPE - 6
1° dia							
2° dia							
3° dia							
4° dia							
5° dia							
6° dia							
7° dia							
8° dia							
9° dia							
10° dia							
11° dia							
12° dia							
13° dia							
14° dia							
15° dia							
16° dia							
17° dia							
18° dia							
19° dia							
20° dia							
21° dia							
Desmame	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

#### OBSERVAÇÕES:

##### GRUPO EXPERIMENTAL (desnutrição neonatal)

- Até o 21° dia, as mães serão alimentadas com caseína a 8% e os filhotes serão pesados diariamente.
- A partir do 22° dia, os filhotes passarão a ser alimentados com Labina®. A partir de agora, os filhotes serão pesados em dias alternados.

##### GRUPO CONTROLE

- Até o 21° dia, as mães serão alimentadas com caseína a 17% e os filhotes serão pesados diariamente
- A partir do 22° dia, os filhotes passarão a ser alimentados com Labina®. A partir de agora, os filhotes serão pesados em dias alternados

**APÊNDICE 2 – Curva Padrão de Nitrito de Sódio**

Tubo	Concentração de NaNO <sub>2</sub> (x 10 <sup>-6</sup> M)
1	0,5
2	1
3	2
4	4
5	5
6	6
7	10
8	12,5
9	20
10	25
11	37,5
12	50
13	100

**OBSERVAÇÕES:**

- Quantidades para placas de 96 poços.
- Diluente: PBS, soro fisiológico, solução salina.
- Solução-mãe para diluição: NaNO<sub>2</sub> a 10 mM em Água Milli-Q.

**ANEXOS**

## ANEXO 1 – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Experimental Animal

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 22/07

Recife, 03 de maio de 2007

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE  
Para: **Profa. Célia Maria Machado Barbosa de Castro**  
Setor de Microbiologia Clínica/LIKA - UFPE  
Processo nº 004895/2007- 58

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 “**Desnutrição neonatal em ratos: estudo da função microbica de macrófagos alveolares infectados in vitro com bactérias catalase positiva ou não**”.

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos 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.

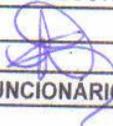
Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

  
Prof. Silene Carneiro do Nascimento  
 Presidente CEEA

**ANEXO 2 – Comprovante de solicitação encaminhada ao Comitê de Ética em Experimentação animal para modificação.**

	
23076.011890/2008-62	
INTERESSADO:	<i>Bélica m<sup>a</sup> Machado Barbosa de Castro</i>
ASSUNTO:	<i>Projeto de Pesquisa</i>
<a href="http://www.processo.ufpe.br">www.processo.ufpe.br</a>	
	
FUNCIONÁRIO	
<small>Cód. 3 1604 046 03</small>	<small>088 005 F/V - Verso</small>

### **ANEXO 3 – Normas para publicação na revista (Artigo I)**

**IMMUNOLOGICAL INVESTIGATIONS**  
Thomson Scientific, Journal Citation Reports®  
ISSN: 1532-4311 (electronic) 0882-0139 (paper)

#### **Instructions for Authors**

##### **Aims and Scope**

This journal is devoted to the dissemination of immunological information on a worldwide basis, encompassing all facets of fundamental and applied immunology.

##### **Submission of Manuscripts**

Manuscripts should be submitted via the journal's online Manuscript Central system - <http://mc.manuscriptcentral.com/limm>. The main text of the paper is best submitted as a Microsoft Word file. Tables and figures should not be embedded with your main document, but should be submitted as separate digital files.

Each manuscript must be accompanied by a statement that it has not been published elsewhere and that it has not been submitted simultaneously for publication elsewhere. Authors are responsible for obtaining permission to reproduce copyrighted material from other sources. The authors are required to sign an agreement for the transfer of copyright to the publisher. All accepted manuscripts, artwork, and photographs become the property of the publisher.

All parts of the manuscript should be typewritten, double-spaced, with margins of at least one inch on all sides. Authors will be asked for a shortened version of the title suitable for the running head, not exceeding 50 characters. Each article should be summarized in an abstract of not more than 200 words. Avoid abbreviations, diagrams, and reference to the text.

##### **Declaration of interest**

It is the policy of all Informa Healthcare, to adhere in principle to the Conflict of Interest policy recommended by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). (<http://www.icmje.org/index.html#conflict>)

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. It is the sole responsibility of authors to disclose any affiliation with any organization with a financial interest, direct or indirect, in the subject matter or materials discussed in the manuscript (such as consultancies, employment, paid expert testimony, honoraria, speakers bureaus, retainers, stock options or ownership, patents or patent applications or travel grants) that may affect the conduct or reporting of the work submitted. All sources of funding for research are to be

explicitly stated. If uncertain as to what might be considered a potential conflict of interest, authors should err on the side of full disclosure.

All submissions to the journal must include full disclosure of all relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interest. If there are no conflicts of interest, authors should state that there are none. This must be stated at the point of submission (within the manuscript after the main text under a subheading "Declaration of interest" and where available within the appropriate field on the journal's Manuscript Central site). This may be made available to reviewers and will appear in the published article at the discretion of the Editors or Publisher.

If no conflict is declared, the following statement will be attached to all articles:

*Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.*

The intent of this policy is not to prevent authors with these relationships from publishing work, but rather to adopt transparency such that readers can make objective judgments on conclusions drawn.

## References

Please cite references in the text by (author, year). At the end of the article, list the references in alphabetical order. Footnotes should be included in the list of references. Examples:

**Journal:** Hvala, B. Generalized derivations in rings. *Comm. Algebra* 26:1147-1166.

**Book:** Birkenmeier, G. F., Heatherly, H. E., Lee, E. K. (1995). Completely prime ideals and radicals in Near-rings. In: Fong, Y., et al. ed. *Proceedings of Near-rings and Near-Fields*. Kluwer, pp. 63-73.

**Work presented at Meetings and Conferences:** Garrone, E.; Ugliengo, O. In *Structure and Reactivity of Surfaces*, Proceedings of the European Conference, Trieste, Italy, Sept 13-20, 1988; Zecchina, A., Costa, G., Morterra, C., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1988.

## Illustrations

Illustrations submitted (line drawings, half-tones, photos, photomicrographs, etc.) should be digital files. Please follow these guidelines for highest quality reproduction:

- 300 dpi or higher
- sized to fit on journal page
- TIFF, EPS or JPEG file type.
- submitted as separate files, not embedded in text files

Color illustrations will be considered for publication; however, the author will be required to bear the full cost involved in their printing and publication. The charge for the first page with color is \$1000.00. The next three pages with color are \$500.00 each. A custom quote will be provided for color art totaling more than 4 journal pages. Good-quality color prints or files

should be provided in their final size. The publisher has the right to refuse publication of color prints deemed unacceptable. Be sure that every figure has a brief descriptive legend and that every table has a concise title.

### **Tables and Figures**

Tables and figures should not be embedded in the text, but should be included as separate digital files. A short descriptive title should appear above each table with a clear legend and any footnotes suitably identified below. All units must be included. Figures should be completely labeled, taking into account necessary size reduction. Captions should be typed, double-spaced, on a separate sheet. All original figures should be clearly marked in pencil on the reverse side with the number, author's name, and top edge indicated.

### **Research Involving Human Subjects**

Studies involving research on human subjects must be approved by an appropriate Institutional Review Board (IRB) and comply with all relevant federal, state and local regulations. For research conducted outside federal regulations, authors must provide documentation that the research was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>). A statement describing IRB approval, consent procedures and that all human participants gave written informed consent must appear at the beginning of the Methods section; the editor may request to see such documentation.

### **Research Involving Animal Subjects**

Studies involving research on animal subjects must be approved by an appropriate Institutional Review Board (IRB) at the institution and comply with all relevant federal, state and local regulations. Any animal research must include a statement that authors followed the Guidelines for Ethical Conduct in the Care and Use of Animals (<http://www.apa.org/science/anguide.html>) by the APA Board of Scientific Affairs Committee on Animal Research and Ethics, or an equivalent.

### **Page Proofs**

All proofs must be corrected and returned to the publisher within 48 hours of receipt. If the manuscript is not returned within the allotted time, the editor will decide if the article should be published or held for a later issue. Only correction of typographical errors is permitted.

### **Reprints**

Each corresponding author of the article will receive a complete copy of the issue in which the article appears. Reprints of an individual article are available for order at the time authors review page proofs. A discount is available to authors who order before print publication.

### ANEXO 3 – Normas para publicação na revista (Artigo II)

#### NUTRITION

Editora Elsevier, ISSN 0899-9007

#### Guide for Authors

The International Journal of Applied and Basic Nutritional Sciences

*Nutrition* provides an international forum for professionals interested in the **applied and basic** biomedical **nutritional sciences, and publishes papers both of clinical interest and of scientific import**. Investigators are encouraged to submit papers in the disciplines of nutritionally related biochemistry, genetics, immunology, metabolism, molecular and cell biology, neurobiology, physiology, and pharmacology. Papers on nutrition-related plant or animal sciences which are not of direct relevance to man, whereas occasionally of interest are not the main focus of the Journal.

#### CONDITIONS OF PUBLICATION — ETHICAL AND LEGAL CONSIDERATIONS

All material submitted to *Nutrition*, for any section of the journal, is considered for publication on the understanding that authors (including all coauthors) agree to *Nutrition's* publication policies as stated in this section of the Guidelines to Authors.

In the event of non-compliance with these conditions of publication, including issues that surface after a contribution is published, *Nutrition's* rights include: sending a notice of failure to comply to authors' employers and funding agencies; and/or informing readers via a published correction/retraction; the latter is linked to the original contribution via electronic indexing and becomes part of the formal published record.

Research/publication misconduct is a serious breach of ethics. Such misconduct includes:

- i) Redundant or duplicate publication by same author(s),
- ii) Publication in another source by the same author(s) without acknowledgement or permission from the publisher, or
- iii) Plagerism or self-plagiarism (publication of material without acknowledging original author source).
- iv) Fabrication of data, not substantiable via review of research records.

Should such publications occur, editorial action would be taken. In certain cases, secondary publication is justifiable and even beneficial; however, such circumstances should be prospectively discussed with and agreed upon by the Editor-In-Chief.

*Nutrition* will not accept a submission of work previously reported in large part in a published article (duplicate) or that is contained in another paper submitted or accepted for publication in *Nutrition* or elsewhere.

### ***Authorship***

**Corresponding Author:** One author is designated the corresponding author (not necessarily the senior author) who will be approached to clarify any issues, such as those pertaining to materials and methods, or technical comments. If *Nutrition* receives feedback from its readers concerning the published paper, the corresponding author will be contacted. It is this author's responsibility to inform all coauthors of such matters to ensure they are dealt with promptly.

The corresponding author must affirm in the cover letter at the time of submission that:

1. None of the material in the manuscript is included in another manuscript, has been published previously, or is currently under consideration for publication elsewhere. This includes symposia proceedings, transactions, books, articles published by invitation, and preliminary publications of any kind except an abstract of less than 250 words. If there is any question concerning potential overlap, the related material must be included for evaluation.
2. Ethical guidelines were followed by the investigator in performing studies on humans or animals and should be described in the paper. The approval of the institutional review board of either animal or human ethics committee must be cited in the Methods.
3. Each author must have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content of the paper and must approve of the final version of the manuscript. Authorship should be based on substantive contributions to each of the following: conception and design of the study; generation, collection, assembly, analysis and/or interpretation of data; and drafting or revision of the manuscript; approval of the final version of the manuscript. Authors are required to include a statement in the Acknowledgements to specify the actual contribution of each coauthor under the above headings.
4. If requested, the authors will provide the data or will cooperate fully in obtaining and providing the data on which the manuscript is based for examination by the editors or their assignees

### ***Conflict of Interest***

Conflict of interest regarding a manuscript exists when a participant in the peer review and publication process—author, reviewer, or editor—has ties to activities that could inappropriately influence his or her impartial judgment, whether or not judgment is in fact affected. Financial relationships with industry are usually considered to be the most important conflicts of interest. However, conflicts can occur for other reasons, such as personal relationships or academic competition. See Competing Interest Form for instructions about the competing interests statement.

## **CATEGORIES OF MANUSCRIPTS**

*Nutrition* publishes a wide range of articles, which includes original investigations, review articles, rapid communications, research letters, case reports and special category manuscripts. Manuscripts must be prepared in accordance with the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" developed by the International Committee of Medical Journal Editors (*N Engl J Med* 1991;324:424-428). All submissions are peer reviewed.

### **Original Investigations (4,000-6000 words)**

Original investigations are considered full-length applied (human) or basic (bench work) research reports. They cover topics relevant to clinical and basic studies relevant to man in the following areas nutritionally related biochemistry, genetics, immunology, metabolism, molecular and cell biology, neurobiology, physiology, and pharmacology. Studies in adult and pediatric populations are welcome. The work presented in the manuscript must be original; studies confirming previous observations will be considered. Other considerations of a paper's publishability are its importance to the science, the soundness of the experimental design, the validity of methods, the appropriateness of the conclusions and the quality of presentation.

### **Rapid Communications: (3000 words including tables, figures, and references)**

Papers representing concise and original studies of scientific importance are considered. In the cover letter the author should justify the request for Rapid Communication. The review process is 10 days, authors are allowed one revision if accepted, and the final version of the paper appears in the next available issue of the journal.

### **Research Letters: (1000 words, up to 10 references and 1 figure or table)**

A Research Letter contains new data or a clinical observation, in a format that allows for rapid publication.

### **Review articles (6000 words)**

In-depth, comprehensive state of the art reviews on a nutritional topic are welcomed. Reviews may be invited by the Editor or may be unsolicited viewpoints.

### **Case Reports (2,500 words)**

Case Reports include case studies of 4 or fewer patients that describe a novel situation or add important insights into mechanisms, diagnosis or treatment of a disease.

### **Editorials**

Editorials express opinions on current topics of interest, or provide comments on papers published in *Nutrition* or other journals. Editorials are generally solicited by one of the Editors.

### **Correspondence (Letters to the Editor) (1000 words including references)**

Opinion pieces concerning papers published in *Nutrition* are particularly welcomed and all submissions are subject to editing. Letters commenting on past-published papers are sent to the corresponding author for a response. Letters are selected for their relevance and originality; not all letters submitted can be published.

### **Reports of meetings (2700 words)**

Reports of meeting proceedings are synopses of scientific meetings of interest to *Nutrition's* audience. Authors should e-mail the Editor to solicit potential interest 8 weeks prior to conference.

*Collections of abstracts, representing the proceedings of organizational meetings* are not subjected to customary peer review. It is the view of the editorial board that it is of service to the nutrition community to present such material as promptly as possible.

## **PREPARATION OF MANUSCRIPT**

Manuscripts must be written in English. Prior to submission, it is mandatory that authors have the manuscript evaluated and edited by a native English speaker. The layout and style should adhere strictly to the instructions given under **PREPARATION OF MANUSCRIPT**.

### **Cover Letter (see AUTHORSHIP)**

The cover letter should make it clear that the final manuscript has been seen and approved by all authors and that they have taken due care to ensure the integrity of their work and their personal scientific reputation. Any potential conflicts of interest should be declared, in addition to any information on prior or duplicate publication (**see Ethical and Legal Considerations**).

Authors must recommend five potential referees, at least three of whom should be from outside the country of the principal author, together with their e-mail addresses. While *Nutrition* does not guarantee these reviewers will be called upon, these suggestions may facilitate the editorial decision. It is *Nutrition's* experience that friends are the harshest critics while investigators in the same field are the most objective. Also include any person(s) who should not be considered a potential reviewer.

## **SUBMISSION PROCEDURE - PREPARING ELECTRONIC MANUSCRIPTS**

**As of 15 March 2005 all new manuscripts must be submitted through *Nutrition's* online**

**submission and review Web site** (⇒ <http://ees.elsevier.com/nut/> ). Use the following guidelines to prepare your submission. Via the "[Author Gateway](#)" page of this journal you will be guided stepwise through the creation and uploading of various files. Once the uploading is done, the system automatically generates an electronic (PDF) proof (which is then used for reviewing). The corresponding author will be informed via e-mail that a PDF of the submission has been created and that approval is required from the corresponding author to begin the review process. Be sure to keep a backup copy of your paper for reference and safety. All correspondence should be with the Regional Editorial Offices. If a paper is accepted, the Production Office will correspond with the author via e-mail.

For online submission authors are requested to submit the text, tables and artwork in separate documents in electronic form to ⇒<http://ees.elsevier.com/nut/> . In an accompanying cover letter, authors should state that the manuscript, or parts of it, have not been and will not be submitted elsewhere for publication.

Text files should be supplied in one of the following formats: Microsoft Word Windows or Macintosh formatted. Format your paper (tabs, indents, etc.) consistently. Once a manuscript has been accepted, most formatting codes will be removed or replaced so there is no need to use excessive layout styling. Do not use options such as automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering. However, do use bold face, italic, subscripts, and superscripts for scientific nomenclature.

When preparing tables, if you are using a table grid, please use only one grid for each separate table and not a grid for each row. If no grid is being used, use tabs to align columns, not spaces.

Graphic files: see Artwork Instructions under [Instructions for Authors](#) on *Nutrition's* website within Science Direct for guidelines for preparing electronic artwork: (Note: Only TIFF, EPS, or PDF formats are acceptable formats). Each figure should be a separate file and not be embedded in the text. All graphic files must be submitted in sufficiently high resolution (300dpi for grayscale or color images and 600-1000 dpi for line art) to allow for printing.

## **PREPARATION OF MANUSCRIPT**

Manuscripts should be typewritten, using DOUBLE SPACING and 1-inch margins. Pages should be numbered consecutively starting with the title page.

### **Title Page**

This should include 1) title of paper (**use no abbreviations, limit: 120 characters with spaces**), 2) running head of fewer than 55 characters with spaces, 3) full names of all authors with highest academic degree(s); 4) affiliations of all authors; 4) role of each author in the work (see Authorship); 5) a word count for the entire manuscript (including figures and tables), and the number of figures and tables, 4) the complete mailing address (including telephone, fax, and e-mail address of the corresponding author for e-mailing of proofs and reprint requests).

### **Acknowledgments**

Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining permission of everyone acknowledged by name. If the name of the individual performing statistical consultation is not included with authors, acknowledgment must include name and degree of statistician. Acknowledge all funding and material support, both direct and indirect for the work represented by the manuscript; include commercial, institutional, and other forms of support.

### **Abstract**

Abstracts should be no more than **250 words**, in accordance with Medline limitations. The structured abstract for an original investigation should be organized as follows:

*Objective.* The abstract should begin with a clear statement of the precise objective or question addressed in the paper. If a hypothesis was tested, it should be stated.

*Research Methods & Procedures.* The basic design of the study and its duration should be described. The methods used should be stated, the statistical data/methods provided and referenced.

*Results:* The main results of the study should be given in narrative form. Measurements or other information that may require explanation should be defined. Levels of statistical significance should be indicated, including other factors crucial to the outcome of the study.

*Conclusion(s)* State only conclusions that are directly supported by the evidence and the implications of the findings.

**Key Words:** 5—7 key words or phrases should be provided which should be selected from the body of the text and not duplicate title words.

### **Structure of Text**

*Introduction:* Context of study.

*Materials and Methods:* Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference; only relevant modification should be described.

*Results:* These should be clear and concise and not duplicate data in Tables.

*Discussion:* This should be relevant to the results and placed in context of the current literature.

*Conclusion:* (no longer than 50 words) Summarize your findings.

### **References**

References are numbered sequentially in the order in which they first appear in the text in

square brackets. All references cited in the text should be listed at the end of the manuscript on a separate page. All items in the reference list should be cited in the text and conversely, all references cited in the text must be presented in the list. The Journal has adopted the Vancouver style, citing the first six authors and then adding et al. and uses page ranges.

References to periodicals should be as follows: name and initials of authors, title of paper, abbreviated journal title (conforming to those used in *Index Medicus*), year, and first and last pages of the article.

Book references should be as follows: author, initials, title of book, title of series and volume number (if applicable), publisher and city, and year.

Multi-author books or to proceedings printed in book form should be similar to those for monograph books.

#### Article

Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;266:497-509.

#### Article in Book

Johnson RK. Energy. In: Mahan LK, Escott-Stump S, editors. *Krause's food, nutrition & diet therapy*. 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2000, p. 19-30.

#### Book

Kline P. *The handbook of psychological testing*. London: Routledge; 1993.

The authors are responsible for the accuracy, relevance, and completeness of each reference.

For references to articles in press, supply the name of the journal. References to unpublished material, including written (not verbal) personal communications, should be included parenthetically in the text with investigators' names and initials.

### **Figures**

***Legends to Figures:*** Figure legends should be concise and clear and should not duplicate the body of the text. Each illustration must have a title and an explanatory legend. The title should be part of the legend and not be reproduced on the figure itself. The legends should be placed on a separate page at the end of the manuscript and begin with the number of the illustration they refer to. All symbols and abbreviations used in the figure including statistical information must be explained.

***Figures and other graphic material:*** May be formatted in any common file format, such as TIFF, GIF, JPG, or BMP as long as quality and resolution are borne in mind.

All material submitted must have been originally produced with proportions that will remain legible when reduced to the width of a one-half page column in the final publication (Column

width: 20 picas, 3 $\frac{1}{3}$ ", 8.3 cm). Text font size should be consistent both within each figure and among all figures in the document.

Authors are responsible for applying for permission for both print and electronic rights for all borrowed materials and are responsible for paying any fees related to the applications of these permissions.

**Color Reproduction:** If a manuscript containing color figures undergoes peer review and acceptance, it must be published with color figures. Authors are required to pay for the printing of color figures (\$650 for the first figure in an article, \$100 for every additional figure in the article).. If the author does not wish to pay for printing color figures, then the manuscript's figures must be in black and white at the time of submission and during the review process.

### **Tables**

These should be typed double-spaced with each table on a separate page. Legends should contain sufficient information to provide an adequate understanding of the table by the reader without reference to the text.

### **Copyright**

Publications are made subject to copyright for the protection of the authors and the publisher. A Transfer of Copyright Agreement will be sent to the corresponding author along with the page proof. The form must be completed and returned to the publisher before the article can be published.

## **MANUSCRIPT PROCESSING AND REVIEW**

**Review Process:** All contributions selected for peer review are sent to at least two, independent reviewers, designated by the editors. Authors are required to suggest suitable independent referees and may also request that *Nutrition* excludes one or two (but no more) individuals or laboratories if there is a specific, declared conflict of interest.

*Nutrition's* editors may seek advice about submitted papers from technical and statistical referees on any aspect of a paper that raises concerns. These may include ethical issues or issues of data or materials access. As in all publishing decisions, the ultimate decision whether to publish is the responsibility of the Editor of the journal concerned.

**Decisions:** The single most important criterion for acceptance is the originality of the work. However, a decision to accept is not solely based on the scientific validity of the paper's content. Other factors affecting decisions include the extent and importance of new information in the paper compared with papers previously published or under consideration; the Journal's need to represent a wide range of topics and the overall suitability for *Nutrition*.

Decision letters usually, but not always convey all factors considered for a particular decision. Occasionally the comments to the author may appear to be inconsistent with the editorial decision, which takes into consideration confidential reviewers' comments to the Editor as well as the above factors.

**Author Checklist for Manuscript Submission** 1) Double-spaced manuscript in PDF or MS Word-compatible format; with structured abstract, pages numbered, running head, key words, author(s)' full names, degrees and affiliations.

- 2) Photos, legends, tables, and/or figures numbered sequentially (see Color Reproduction).
- 3) Cover letter including statement regarding declaration of authorship, of scientific integrity, and of any potential conflict of interest (See Competing Interest Form).
- 4) Address, e-mail, phone number and FAX number of corresponding author.
- 5) Names and e-mail addresses of 5 potential referees.

## **PUBLISHING AND REPRINT INFORMATION**

Accepted papers are sent to the publisher, Elsevier, upon acceptance. They will be immediately copyedited, typeset, and sent to authors for review. Articles will be uploaded to *Nutrition* online under the heading 'Articles in Press' for preprint viewing by subscribers as soon as author corrections are implemented.

**Reprints:** Forms for ordering article reprints are e-mailed to each contributor with the page proof and should be returned with the correct proofs. Authors do not receive free reprints and therefore are responsible for ordering their own reprints from the publisher. Prospective ordering of reprints is less expensive than retrospective. Bulk reprints are arranged via Elsevier.

Manuscripts from outside of North America should be directed to the appropriate Regional Editor.

### **Latin American Office**

Isabel Correia, MD, PhD  
Belo Horizonte, MG  
30140-090 Brazil

### **Sponsored Articles:**

Nutrition offers authors or their institutions the option to sponsor non-subscriber access to their articles on Elsevier's electronic publishing platforms. For more information please click [here](#).

# 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](#)