UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SÁUDE – CCS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

TESE DE DOUTORADO

EFEITO DA DESNUTRIÇÃO NEONATAL SOBRE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR E VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES INFECTADOS, *IN VITRO,* COM *Staphylococcus aureus* METICILINA SENSÍVEL E METICILINA RESISTENTE

NATÁLIA GOMES DE MORAIS

RECIFE, 2014

NATÁLIA GOMES DE MORAIS

EFEITO DA DESNUTRIÇÃO NEONATAL SOBRE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR E VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES INFECTADOS, *IN VITRO,* COM *Staphylococcus aureus* METICILINA SENSÍVEL E METICILINA RESISTENTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Área de concentração: Doença infecciosas e parasitárias.

Orientadora: Profª. Drª. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Co-orientadora: Profª. Drª. Valéria Rêgo Alves Pereira

RECIFE, 2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

M828e Morais, Natália Gomes de.
Efeito da desnutrição neonatal sobre sinalização intracelular e viabilidade de macrófagos alveolares infectados, *in vitro*, com *staphylococcus aureus* meticilina sensível e meticilina resistente / Natália Gomes de Morais. – Recife: O autor, 2014.
212 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Célia Maria Machado Barbosa de Castro.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2014.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Desnutrição. 2. Imunidade. 3. Macrófago. 4. Staphylococcus aureus. 5. Meticilina. I. Castro, Célia Maria Machado Barbosa de (Orientadora). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-198)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

NATÁLIA GOMES DE MORAIS

No dia 24 de outubro 2014, às 08h30, na Sala Prof. Murillo La Greca - no 3º. and. do CCS/UFPE -, os Membros Doutores: **a Profª. Drª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (Presidente da Banca - UFPE), a Profª. Drª. Valdênia Maria Oliveira de Souza (UFPE), a Profª. Drª. Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa (UFPE), a Profª. Drª. Maria do Amparo Andrade (UFPE) e a Profª. Drª. Thayza Christina Montenegro Stamford (UFPE),** componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguiram a doutoranda NATÁLIA GOMES DE MORAIS sobre a sua Tese intitulada **"Efeito da Desnutrição Neonatal sobre Sinalização Intracelular e Viabilidade de Macrófagos Alveolares Infectados, *in vitro*, com *Staphylococcus aureus* Meticilina Sensível e Meticilina Resistente"**, a qual foi orientada pelo **Profª. Drª. Célia Maria Machado Barbosa de Castro (UFPE)** e Co-orientada pela **Profª. Drª. Valéria Rêgo Alves Pereira (CPqAM/FIOCRUZ).** Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profª. Drª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho	Aprovada
Profª. Drª. Valdênia Maria Oliveira de Souza	Aprovada
Profª. Drª. Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa	Aprovada
Profª. Drª. Maria do Amparo Andrade	Aprovada.
Profª. Drª. Thayza Christina Montenegro Stamford	APROVADA

Profª. Drª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Profª. Drª. Valdênia Maria Oliveira de Souza

Profª. Drª. Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa

Profª. Drª. Maria do Amparo Andrade

Profª. Drª. Thayza Christina Montenegro Stamford

A Deus, à minha família

e a todos aqueles que tenham

um sonho que valha a pena

ser almejado....

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

Aos meus pais, por tudo que fizeram por mim, pelos esforços sem medida e por me ensinarem que tudo na vida é uma questão de vontade, trabalho árduo e determinação. Através da educação e dos ensinamentos recebidos, aprendi a ser gente, gente que luta pelo que quer, gente que procura fazer a diferença, gente que não deixa um sonho morrer. Sou e serei grata, por toda minha vida, por me encorajar nos momentos de desânimo e por colaborarem para que conseguisse alcançar meu sucesso. "*Uma família feliz nada mais é do que o paraíso antecipado*" (Autor desconhecido).

À minha irmã Nadja Morais, por todos os dias compartilhados, por me aceitar como sou, por toda força e amor. Obrigada por sempre me impulsionar em direção às vitórias dos meus desafios. Neste momento, me alegro em dizer que esta conquista também é sua! "*Um amigo representa uma só alma em dois corpos*" (Aristóteles).

Ao meu namorado Lucas Coneglian, pelo estímulo constante, paciência e compreensão nos dias de ansiedade e dificuldade. Obrigada por permanecer ao meu lado, seja nos momentos alegres ou tristes, o seu amor foi essencial. "*Quando encontrar alguém e esse alguém fizer seu coração parar de funcionar por alguns segundos, preste atenção: pode ser a pessoa mais importante da sua vida*" (Carlos Drummond de Andrade).

À minha orientadora Célia Castro, por ter inserido a ciência na minha vida, pela amizade, incentivo, pelas críticas e paciência em todos os momentos. À Drª. Valéria Rego, por ter aberto as portas do seu laboratório, onde parte deste trabalho foi desenvolvido, por ter aceitado o desafio da co-orientação, pelas lições de profissionalismo, sensibilidade e calma. À

Drª. Milena Paiva, que transmitiu conhecimentos e experiências essenciais para minha formação e para meu crescimento intelectual.

À Thacianna Barreto são tantos anos juntas, tantos ensinamentos, tanto companheirismo, tantos conselhos, que não sei por onde começar a agradecer. Muitíssimo obrigada pela partilha das dificuldades, apoio, amizade, confiança durante toda jornada! "*Um amigo fiel é uma poderosa proteção: quem o achou, descobriu um tesouro*" (Eclo 6,14).

À Suênia da Cunha, por dividir seus conhecimentos, pelo acompanhamento e contribuição fundamental durante a realização desta pesquisa. À Thays Miranda, sempre disposta a ajudar, obrigada pelo carinho, atenção e pelos grandes ensinamentos nos experimentos desenvolvidos neste trabalho. À Maria Carolina Acioli, pela colaboração e compartilhamento de conhecimentos.

À Alice Bezerra, Juliana Melo e Maiara Severo, apoio, conselhos, amizade e por estarem presentes nos momentos mais importantes da minha vida. "*Quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se encontre, jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudades, mas não estará só*" (Amir Klink).

Aos professores das disciplinas de Microbiologia e Parasitologia do departamento de Medicina Tropical da UFPE pela valiosa contribuição na minha formação profissional e pessoal. Em especial, professora Amélia Maciel, Ana Catarina, Cleide Miranda e Ivanize Aca pela amizade, confiança e apoio tanto na graduação como na pós-graduação. À professora Mônica Campelo e Janaina Rocha pelos sábios conselhos, amizade, disponibilidade, confiança, por terem acreditado na realização dos meus sonhos e me impulsionado a realizá-los. Serei eternamente grata por todo apoio. *"Eu aprendi que todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e crescimento ocorre quando você está escalando-a"* (William Shakespeare).

À minha família, pelo carinho e pelas orações. Em especial, a minha avó Carmem Freitas, inspiração da minha vida, pelo exemplo de mulher, de luta e força. As minhas tias Clécia Maria e Carla Freitas, exemplos de alegria, fé, amor, fundamentais na minha construção pessoal. Aos meus primos-irmãos Michelle Morais e Jônatha Morais pelos momentos de descontração, carinho e apoio que nunca me faltaram.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia Clínica do LIKA, por todos os bons momentos que passamos juntos, importantes experimentos e inesquecíveis congressos. Em especial, Bruno Galvão, Fátima Diniz, Flavia Regina e Rodrigo pela força, amizade, palavras de incentivo, conselhos e brincadeiras. Às alunas de iniciação científica Joana Lyra e Amanda Pedrosa, por toda ajuda na parte experimental deste trabalho.

À todos os colegas, secretários e professores da pós-graduação em Medicina Tropical pelo convívio e aprendizado. Em especial, Ana Lúcia Fontenele, Liana Macedo, Iana Rafaela e Paula Jacome. Ao Centro de Pesquisa Ageu Magalhães - CPqAM/FIOCRUZ e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, pelo espaço físico e toda a sua estrutura cedida. Aos funcionários do biotério do Departamento de Nutrição da UFPE. Aos animais, parte fundamental desse trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência. Ao órgão financiador: CAPES e CNPq.

À todos aqueles que cruzaram a estrada da minha vida, deixando suas marcas e pegadas... os nomes de vocês talvez não estejam citados aqui, mas com certeza estão gravados no meu coração.

Muito Obrigada!

Se enxerguei mais longe foi por estar de pé sobre os ombros de gigantes"

Sir Isaac Newton

"Confie no SENHOR de todo o seu coração e não se apoie na sua própria inteligência. Lembre de DEUS em tudo o que fizer, e Ele lhe mostrará o caminho certo."

(Provérbios 3.5-6)

RESUMO

Agressões nutricionais, no período neonatal, interferem com a programação de mecanismos funcionais dos macrófagos, provocando alterações duradouras, detectáveis no organismo adulto mesmo após reposição nutricional. Sabe-se que a desnutrição e infecção por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) multirresistentes estão associadas a altas taxas de mortalidade, porém poucas são as pesquisas que avaliam a sua interação. Em virtude disto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da desnutrição neonatal sobre sinalização intracelular, função microbicida e viabilidade de macrófagos alveolares infectados, *in vitro*, com *S. aureus* meticilina sensível (MSSA) e meticilina resistente (MRSA). Metodologia: Ratos machos Wistar (n=48) foram divididos em dois grupos distintos: Nutrido (dieta com 17% de caseína) e Desnutrido (à dieta com 8% de caseína), seguidos de reposição nutricional. Aos 90-120 dias de vida, os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico de traqueostomia para coleta de macrófagos (MØ). Após o isolamento dos MØ, foram padronizados 4 sistemas: controle negativo, composto apenas por MØ em cultura; controle positivo, MØ adicionados a 10µL Lipopolissacarídeo (LPS); e dois sistemas teste, MØ mais *S. aureus* sensível e resistente a meticilina. As células foram incubadas por 24h à 37ºC, com atmosfera úmida e 5% de CO2. Transcorrido este período, foram realizados ensaios para análise da expressão gênica dos receptores TLR-2, TLR-4, NLRP-3, das enzimas iNOS e caspase-1, produção de radicais livres e viabilidade dos macrófagos infectados *in vitro*. Na análise estatística, utilizou-se teste t *Student* e análise de variância (ANOVA), admitindo-se $p<0,05$. O modelo de desnutrição neonatal adotado promoveu redução do crescimento ponderal dos animais, da expressão dos receptores TLR-2, TLR-4, NLRP3, das enzimas iNOS e caspase -1, do estresse nitrosativo e da taxa de macrófagos viáveis. Entretanto, a interação *Staphylococcus aureus* versus macrófagos promoveu maior expressão dos receptores, das enzimas analisadas e do ânion superóxido. Pode-se concluir que a desnutrição neonatal comprometeu a expressão dos receptores de reconhecimento padrão, produção de óxido nítrico e o percentual de células viáveis. Entretanto, a exacerbação da resposta oxidativa, do receptor NLRP3 e da enzima caspase-1, após infecção por MRSA, pode favorecer o surgimento de lesões teciduais que permitam a permanência e a disseminação destas bactérias. Desta forma, há um maior risco para aquisição de quadros inflamatórios desregulados em infecções por *S. aureus* multirresistentes em indivíduos desnutridos no período neonatal.

Palavras Chaves: Desnutrição. Imunidade. Macrófago. *Staphylococcus aureus.* Meticilina.

ABSTRACT

Nutritional aggression, in the neonatal period, interfere with the programming of functional mechanisms of macrophages, causing lasting changes, detectable in the adult organism even after nutritional replacement. It is known that malnutrition and infection by *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) multiresistant are associated with high mortality rates, but there are few studies that assess their interaction. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of neonatal malnutrition on intracellular signaling, microbicidal function and viability of alveolar macrophages infected in vitro with methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) and methicillin-resistant (MRSA). Methods: Male Wistar rats (n = 48) were divided into two distinct groups: Nourished (diet with 17% casein) and Malnourished (diet with 8% casein), followed by nutritional replacement. At 90-120 days of age, the animals underwent a surgical tracheostomy procedure for collection of macrophages (MO). After isolation of Mo, four systems were standardized: negative control, consisting only of Mo in culture; positive control, Mo added to 10μL lipopolysaccharide (LPS); and two test systems, mo more sensitive S. aureus and methicillin-resistant. Cells were incubated for 24h at 37 ° C, with a humid atmosphere and 5% CO2. Elapsed this period, tests for the analysis of gene expression of TLR-2, TLR-4, NLRP-3 receptors, the iNOS-1 and caspase enzymes, free radical production and viability of infected macrophages in vitro were performed. In the statistical analysis, we used the Student t test and analysis of variance (ANOVA), assuming $p < 0.05$. The model adopted neonatal malnutrition promoted reduction of the animals' body weight, the expression of TLR-2, TLR-4, NLRP3 receptor, enzyme iNOS and caspase-1, the nitrosative stress and the rate of viable macrophages. However, *Staphylococcus aureus* interaction versus macrophages promoted greater expression of receptors, analyzed enzymes and the superoxide anion. It can be concluded that the neonatal malnutrition impaired the expression of pattern recognition receptors, nitric oxide, and the the percent of viable cells. However, exacerbating oxidative response, the NLRP3 receptors and caspase-1 enzyme after MRSA infection can lead to the development of tissue injury which allow the permanence and dissemination of these bacteria. Thus, there is a greater risk of acquiring dysregulated inflammatory conditions in multiresistant *S. aureus* infections in malnourished individuals in the neonatal period.

Index terms: Malnutrition. Immunity. Macrophage. *Staphylococcus aureus*. Methicillin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔCt	*Diferença dos valores dos Ct;*
AP-1	*Ativação da proteína-1;*
ASC	*Proteína adaptadora;*
ATCC	*American Type Culture Collection**;***
CARD/PYR	*Caspase recruitment domain (domínio de recrutamento da caspase);*
Ct	*Cycle threshold;*
D	*Desnutrido;*
DAMP	*Damage-associated molecular pattern (padrões moleculares associados a dano);*
FAD	*Flavin adenine dinucleotide (flavina adenina dinucleotídeo);*
FMN	*Flavin Mononucleotide (flavina mononucleotídeo);*
H_2O_2	*Peróxido de hidrogênio;*
IFN-γ	*Interferon-gama;*
IgA	*Imunoglobulina A;*
IKK	*Inhibitor of NF-kβ kinase (quinase inibidora de kβ);*
IL	*Interleucina;*
IFN	*Interferon;*
iNOS	*Enzima óxido nítrico sintase induzida;*
IRAK	*IL-1R associated kinase (quinase associada ao IL1-R);*
IRF	*IFN-regulatory fator (fator regulado por interferon);*
JNK	*c-Jun N-terminal kinase (c-Jun N-terminal quinase);*

LBA	*Lavado broncoalveolar;*
LPS	*Lipopolissacarídeo;*
LRR	*Domínio extracelular rico em leucina;*
MAL	*MyD88 adaptador-like;*
MAPK	*Mitogen-activated protein kinases (proteinoquinase ativada por mitógeno);*
MØ	*Macrófagos;*
MRSA	*Staphylococcus aureus resistente à meticilina;*
MSSA	*Staphylococcus aureus meticilina sensível;*
MyD88	*Myeloid differentiation fator 88;*
N	*Nutrido;*
NADPH	*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato);*
NF-kβ	*Nuclear factor kappa B (fator nuclear kB);*
NK	*Células Natural killer;*
NLR	*Receptores Nod-Like;*
NO	*Óxido nítrico;*
NTC	*Non template control (Controle negativo da reação);*
O_2^-	*Ânion superóxido;*
OPN	*Osteopontina;*
$P2X_7$	*Receptores purinérgicos;*
p38	*Proteína p38;*
PAMP	*Patterns-associated molecular pathogens (padrões moleculares*

	associados à patógenos);
Pb	*Pares de base;*
PBP	*Proteína de ligação à penicilina;*
PBP2a	*Proteína ligadora de penicilina 2a;*
PBS	*Phosphate buffer saline (solução salina tamponada com fosfato);*
PRR	*Pattern recognition receptors (receptores de reconhecimento padrão);*
PVL	*Panton- Valentine leukocidin (leucocidina Panton- Valentine);*
qPCR	*Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real;*
RLR	*Receptores RIG-I-like;*
ROS	*Espécies reativas de oxigênio;*
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura – série 1640);*
RQ	*Quantidade relativa de mRNA;*
S. aureus	*Staphylococcus aureus;*
SARM	*Sterile α- and armadillo-motif containing protein;*
SCCmec	*Cassete cromossômico mec;*
SOD	*Superóxido dismutase;*
TAK1	*TGF – transforming growth fator – β-activated kinase 1;*
Th1	*Linfócitos T auxiliares tipo 1;*
Th2	*Linfócitos T auxiliares tipo 2;*
Th17	*Linfócitos T auxiliares tipo 17;*
TIR	*Receptor-Toll da Interleucina-1;*
TIRAP	*TIR domain-containing adaptor protein;*

TLR	Receptores *Toll-like;*
Tm	*Temperatura de melting;*
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa;
TRAF6	*TNF – tumour necrisus fator –receptor associated fator 6;*
TRAM	*TRIF-related adaptor molecule*;
TRIF	*TIR-domain-containing adaptor inducing IFN-β*;
TSB	*Tryptic Soy Broth;*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática dos receptores Toll-like. Fonte: Becker, O'Neill, 2007. 26

Figura 2: Representação esquemática das vias de sinalização dos PRR. Fonte: Modificado de Werst *et al.*, 2006. 27

Figura 3: Representação esquemática do receptor NLR. Fonte: Modificado de Bauernfeind, Hornung, 2013. 30

Figura 4: Representação esquemática do inflamassoma. Fonte: Modificado de Bauernfeind, Hornung, 2013. 31

Figura 5: Secreção da citocina IL-1β através do inflamassoma NLRP3. Fonte: Modificado de Netea *et al*., 2010. 33

Figura 6: Os dois sinais responsáveis pela ativação da caspase-1 e subsequente secreção de IL-1β. Fonte: Modificado de Netea *et al*., 2010. 35

Figura 7: Processo de maturação e ativação de macrófagos. Fonte: Adams, 1994. 36

Figura 8: Produção de ânion superóxido. Fonte: Modificado de Roitt, 2013. 39

Figura 9: Produção de óxido nítrico. Fonte: Modificado de Roitt, 2013. 40

Figura 10: Estágios morfológicos que caracterizam o fenômeno de apoptose celular. Fonte: Modificado de Rafael Freitas, 2012. 42

Figura 11: Rato macho *Wistar*, primeiro dia de vida. Fonte: Arquivo pessoal. 56

Figura 12: Colônias de *Staphylococcus aureus* em Ágar Sangue e padronização do inoculo bacteriano. Fonte: Arquivo pessoal. 58

Figura 13: Anestesia e procedimento cirúrgico de traqueostomia nos ratos adultos (90-120 dias) para obtenção do lavado broncoalveolar. Fonte: Arquivo pessoal. 59

Figura 14: Coleta do lavado broncoalveolar. Fonte: Arquivo pessoal. 60

Figura 15: Centrifugação, ressuspenção e contagem dos macrófagos em câmara de Neubauer. Fonte: Arquivo pessoal. 60

Figura 16: Placa de cultura tipo Falcon e incubadas a 37°C e 5% CO_2. Fonte: Arquivo pessoal. 61

Figura 17: Organograma geral da distribuição dos sistemas. 61

Figura 18: Curva padrão de cDNA do alvo TLR-2. Fonte: Arquivo pessoal. 65

ARTIGO I

Figura 1- Evolução da curva ponderal durante a desnutrição neonatal (21 dias) e reposição nutricional (23-90 dias) dos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido). Teste t de *Student*. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados pelo símbolo * 77

Figura 2: *Plot* de amplificação da curva-padrão de cDNA do controle positivo da iNOS (LPS) (nas concentrações de 1fg a 1ng) e em sequência a eficiência dos sistemas de *primers*. 78

Figura 3- Expressão relativa da enzima iNOS nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (C – Controle negativo, MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina). Teste ANOVA e Tukey. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados pelo símbolo * 79

Figura 4- Níveis de nitrito no sobrenadante das culturas dos macrófagos alveolares nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (C – Controle negativo, MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina). Teste ANOVA e Tukey. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados pelo símbolo * 80

Figura 5- Níveis de ânion superóxido no sobrenadante das culturas dos macrófagos alveolares nos grupos (grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido), nos sistemas (C – Controle negativo, MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) e nos tempos de incubação (1, 2 e 24h). Teste ANOVA e Tukey. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram 81

representados pelo símbolo *

Figura 6- Taxa de viabilidade, apoptose e necrose nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (C – Controle negativo, MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) e nos tempos de incubação (1, 2 e 24h). Teste ANOVA e Tukey. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados pelo símbolo * 82

ARTIGO II

Figura 1- Evolução da curva ponderal durante a desnutrição neonatal (21 dias) e reposição nutricional (23-90 dias) dos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido). Teste t de *Student*. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados pelo símbolo * 97

Figura 2: *Plot* de amplificação da curva-padrão de cDNA dos controles positivos, nas concentrações de 1fg a 1ng. Legenda: **A -** TLR-2, **B-**TLR-4, **C-** NLRP3, **D-** Caspase-1. 98

Figura 3: Eficiência dos sistemas de *primers* a partir de diluições seriadas (fator 10) de cDNA dos controles positivos, nas concentrações de 1fg a 1ng. Legenda: **A-** TLR-2, **B-** TLR-4, **C-** NLRP3, **D-** Caspase-1. 99

Figura 4- Expressão relativa do receptor TLR-2 nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (CP – Controle positivo, MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina). Teste ANOVA e Tukey. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados pelo símbolo * 100

Figura 5- Expressão relativa do receptor TLR-4 nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (CP – Controle positivo, MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a 101

meticilina). Teste ANOVA e Tukey. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados pelo símbolo *

Figura 6- Expressão relativa do receptor NLRP3 nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (CP – Controle positivo, MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina). Teste ANOVA e Tukey. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados pelo símbolo * 102

Figura 7- Expressão relativa da enzima Caspase-1 nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (CP – Controle positivo, MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina). Teste ANOVA e Tukey. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados pelo símbolo * 103

ARTIGO III

Figura 1- Evolução da curva ponderal durante a desnutrição neonatal (21 dias) e reposição nutricional (23-90 dias) dos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido). Teste t de Student. Valores expressos como média±desvio padrão, n=40. Recife-PE, 2009. 118

*p<0,05 na comparação dos grupos Nutrido e Desnutrido.

Figura 2- Cinética da produção de óxido nítrico no sobrenadante das culturas dos macrófagos alveolares nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (C- Controle negativo, MSSA- *Staphylococcus aureus* sensível a metilina e MRSA- *Staphylococcus aureus* resistente a metilina). Teste ANOVA e Tukey. Valores expressos como média±desvio padrão, n=40. Recife-PE, 2009. 120

*p<0,05 na comparação dos grupos Nutridos e Desnutridos

Figura 3- Níveis de IL-1β no sobrenadante das culturas dos macrófagos alveolares nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (C- Controle 121

negativo, MSSA- *Staphylococus aureus* sensível a metilicina e MRSA- *Staphylococus aureus* resistente a metilicina). Teste ANOVA e Tukey. Valores expressos como média±desvio padrão, n=40. Recife-PE, 2011.

*p<0,05 na comparação dos grupos Nutrido e Desnutrido.

Figura 4- Níveis de IL-18 no sobrenadante das culturas dos macrófagos alveolares nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (C- Controle negativo, MSSA- *Staphylococus aureus* sensível a metilicina e MRSA- *Staphylococus aureus* resistente a metilicina). Teste ANOVA e Tukey. Valores expressos como média±erro padrão, n=40. Recife-PE, 2011.

*p<0,05 na comparação dos grupos Nutrido e Desnutrido.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da dieta Caseína a 8% e a 17%, utilizada na alimentação das ratas no período de aleitamento materno. 56

Tabela 2: Composição da dieta padrão Labina® utilizada na alimentação dos ratos, após o período neonatal, para reposição nutricional. 57

Tabela 3: Características das cepas *Staphylococcus aureus* meticilina sensível e meticilina resistente. 57

Tabela 4: Curva Padrão de $NaNO_2$. 62

Tabela 5: Característica dos *primers* desenhados para análise da expressão gênica dos receptores TLR-2, TLR-4, NLRP3 e da enzima iNOS, em ensaios de PCR tempo real. 64

Tabela 6: Características do produto amplificado (amplicon) após expressão gênica dos receptores TLR-2, TLR4, NLRP3, da enzima iNOS e Caspase-1, em ensaios de PCR tempo real. 66

ARTIGO I

Tabela 1– Valores absolutos para a produção de superóxido nos grupos (N-Nutrido e D- Desnutrido), nos sistemas (C – Controle negativo, MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) e nos tempos de incubação (1 e 2h). Teste ANOVA e Tukey. Valores expressos como média±desvio padrão, n=40. Recife-PE, 2009. 119
*p<0,05 na comparação dos grupos Nutrido e Desnutrido;
#p<0,05 na comparação 1h e 2h.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO ..... - 22 -
2 REVISÃO DA LITERATURA ..... - 24 -
2.1 Sistema Imunológico ..... - 24 -
2.2 Receptores Toll-like - TLR ..... - 25 -
2.3 TLR-2 ..... - 28 -
2.4 TLR-4 ..... - 28 -
2.5 Receptores Nod-like - NLR ..... - 29 -
2.6 Inflamassoma NLRP3 ..... - 31 -
2.7 Caspase-1 ..... - 33 -
2.8 Macrófagos ..... - 36 -
2.9 Radicais Livres ..... - 38 -
2.9.1 Ânion superóxido ..... - 38 -
2.9.2 Óxido Nítrico ..... - 40 -
2.10 Morte celular ..... - 41 -
2.11 Infecção bacteriana ..... - 43 -
2.12 Staphylococcus aureus ..... - 44 -
2.13 Resposta imunológica na infecção pelo Staphylococcus aureus ..... - 46 -
2.14 Resistência bacteriana ..... - 47 -
2.15 Desnutrição ..... - 49 -
2.16 Desnutrição e imunidade ..... - 51 -
3 HIPÓTESES ..... - 53 -
4 OBJETIVOS ..... - 54 -
4.1 Objetivo Geral ..... - 54 -
4.2 Objetivos Específicos ..... - 54 -
5 METODOLOGIA ..... - 55 -
5.1 Desenho do Estudo ..... - 55 -
5.2 Animais, Estado Nutricional e Peso Corporal ..... - 55 -
5.3 Cepas de Staphylococcus aureus ..... - 57 -
5.4 Lavado Broncoalveolar ..... - 59 -
5.5 Cultura de Macrófagos Alveolares ..... - 60 -
5.6 Sistemas ..... - 61 -
5.7 Análise da produção do ânion superóxido (O_2^-) ..... - 62 -
5.8 Produção de Óxido Nítrico por Macrófagos Alveolares ..... - 62 -

5.9 Quantificação da IL-1β e Il-18 ..... - 63 -
5.10 Obtenção dos macrófagos aderidos na placa de cultura celular ..... - 63 -
5.11 Extração de RNA dos macrófagos congelados em Trizol ..... - 63 -
5.12 Ensaios de transcrição reversa ..... - 64 -
5.13 Primers ..... - 64 -
5.14 Avaliação da sensibilidade, eficiência e especificidade dos sistemas desenvolvidos ..... - 65 -
5.15 Quantificação da expressão do TLR-2, TLR-4, NLRP3, iNOS e caspase-1 ..... - 65 -
5.16 Sequenciamento ..... - 67 -
5.17 Viabilidade dos Macrófagos Alveolares ..... - 67 -
5.18 Análise Estatística ..... - 67 -
5.19 Considerações Éticas ..... - 67 -
6 EFEITO DA DESNUTRIÇÃO NEONATAL NA EXPRESSÃO DA ENZIMA ÓXIDO NITRICO SINTASE INDUZIDA, PRODUÇÃO DE RADICAIS LIVRES E VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES INFECTADOS *in vitro* COM *Staphylococcus aureus* METICILINA SENSÍVEL E METICILINA RESISTENTE ..... - 68 -
7 EXPRESSÃO DOS RECEPTORES TLR-2, TLR-4, NLRP3 E DA ENZIMA CASPASE-1 NOS MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NEONATAL E INFECTADOS *in vitro* COM *Staphylococcus aureus* METICILINA SENSÍVEL E METICILINA RESISTENTE ..... - 86 -
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS ..... - 105 -
REFERÊNCIAS ..... - 108 -
APÊNDICES ..... - 117 -
APÊNDICE A - Planilha De Evolução Ponderal ..... - 117 -
APÊNDICE B – EFEITOS TARDIOS DA DESNUTRIÇÃO NEONATAL NA RESPOSTA MICROBICIDA, PRODUÇÃO DE CITOCINAS E VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS NA INFECÇÃO POR Staphylococcus aureus SENSÍVEL/RESISTENTE A METICILINA[1] ..... - 119 -
APÊNDICE C: Versão em inglês do ARTIGO II ..... - 137 -
APÊNDICE D – Versão em inglês do ARTIGO II ..... - 157 -
ANEXOS ..... - 179 -
ANEXO A- Comitê de Ética ..... - 179 -
ANEXO B –Comprovante de submissão –European Journal Nutrition ..... - 180 -
ANEXO C –Instruções para autores –European Journal Nutrition ..... - 181 -
ANEXO D – Comprovante de submissão – British Journal of Nutrition ..... - 188 -
ANEXO E– Instruções para autores – British Journal of Nutrition ..... - 189 -
ANEXO F – Carta de aprovação –Revista Brasileira de Nutrição ..... - 204 -
ANEXO G - Instruções para autores –Revista Brasileira de Nutrição ..... - 205 -

1 INTRODUÇÃO

O crescimento e o desenvolvimento do indivíduo são marcados por períodos de rápida proliferação e diferenciação celular (como gestação, lactação e primeira infância) (MACEDO *et al*., 2010). Estes períodos são críticos para o desenvolvimento do organismo, nos quais órgãos e sistemas são vulneráveis às alterações ambientais. Em resposta a estímulos ou agressões ambientais, a plasticidade fenotípica possibilita a ocorrência de mudanças comportamentais, estruturais e metabólicas no indivíduo (BENTO-SANTO *et al.*, 2012).

A desnutrição perinatal é um dos fatores ambientais mais bem estudados como indutor de plasticidade fenotípica. Agressões nutricionais parecem interferir com a programação de mecanismos funcionais dos macrófagos, provocando modificações duradouras, detectáveis no organismo adulto, mesmo após longa recuperação nutricional (CHANDRA, 2004). Costa *et al.* (2012), verificaram que a desnutrição neonatal reduziu a produção de interleucina 12 (IL-12) e interferon-gama (IFN-γ) por macrófagos e linfócitos, importantes citocinas para promoção da ativação fagocítica e assim, a resolução de um processo infeccioso.

Alterações no aporte de determinados nutrientes poderiam provocar distúrbios irreversíveis em vários alvos da resposta microbicida. Evidências clínicas e experimentais revelam que defeitos nos receptores de reconhecimento padrão (Toll-like - TLR e Nod-like - NLR) ou em suas vias de sinalização deixam o organismo suscetível a vários tipos de infecção. Lamkanfia e Kannegantic (2010) verificaram que MØ de pacientes com dermatite atópica causada por *Staphylococcus aureus* expressam baixos níveis de TLR-2 e reduzida capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e interleucina 1β (IL-1β), quando comparados a macrófagos de pacientes normais.

Os NLR regulam a ativação da caspase-1, secreção de IL-1β e interleucina 18 (IL-18), através da formação de um complexo de multiproteínas, denominado inflamassoma (MARIATHASAN, MONACK, 2007*)*. Segundo Martionon e Tschopp (2005), alterações genéticas nos inflamassomas (NLRP1 e NLRP3) estão associadas com doenças auto-imunes e susceptibilidade a infecções microbianas. Mariathasan *et al.* (2006) verificaram que macrófagos deficientes no NLRP3 ao serem infectados com bactérias Gram-positivas, como *S. aureus* e *Listeria monocytogenes,* não conseguiram ativar a caspase-1, além de secretar baixos níveis de IL-1β quando comparado a camundongos normais.

Apesar de existirem alguns estudos sobre expressão dos receptores de reconhecimento padrão e susceptibilidade a infecções (LAMKANFIA, KANNEGANTIC, 2010;

MARIATHASAN, MONACK, 2007; SCHRODER, TSCHOPP, 2010), são escassos os trabalhos que avaliam os efeitos da desnutrição neonatal sobre a sinalização intracelular e a resposta microbicida dos macrófagos.

A invasão do organismo por patógenos pode causar desregulação na resposta microbicida das células do sistema imune. Este mecanismo é desencadeado por várias bactérias, como *S. aureus*, por facilitar o desenvolvimento do processo infeccioso e propiciar maior tempo de sobrevivência no hospedeiro (MORAIS *et al*., 2013). Desde a década de 60, a infecção por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) constitui grave problema para a saúde pública mundial por estar relacionada a altas taxas de morbidade e mortalidade. Inúmeros estudos clínicos indicam que o MRSA é mais virulento que o *S. aureus* meticilina sensível (MSSA). Contudo, estudos laboratoriais que avaliam a presença e magnitude de mecanismos patogênicos das cepas de MSSA e MRSA obtiveram resultados conflitantes (COSTA *et al.*, 2012; COIA *et al.*, 2006; MORAIS *et al*., 2013).

Em virtude disto, o presente estudo foi delineado para analisar o efeito da desnutrição neonatal sobre a sinalização intracelular, ativação e viabilidade dos macrófagos alveolares infectados, *in vitro,* com *Staphylococcus aureus* meticilina sensível e meticilina resistente. Dentro deste contexto, a experimentação com animais poderá contribuir para o esclarecimento das alterações morfofuncionais ocorridas no início da vida, e sua íntima relação com modificações na resposta microbicida das células fagocíticas, surgimento e evolução de doenças infecciosas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Sistema Imunológico

O sistema imunológico é constituído por uma rede interligada de órgãos, células e moléculas, e tem por finalidade manter a homeostase do organismo (CRUVIEL *et al.*, 2010). Desempenha papel crítico na defesa contra agentes infecciosos e é considerado o principal mecanismo para impedir a ocorrência de infecções disseminadas (BÁRTHOLO RM, BÁRTHOLO TP, 2009). A função imunológica possui duas respostas distintas, porém interligadas, a imunidade inata e a adaptativa (COELHO-CASTELO *et al.*, 2009).

A imunidade inata caracteriza-se pelo reconhecimento rápido, entretanto de baixa especificidade, devido a sua natureza estereotípica (ação similar contra todos os antígenos) (CRUVIEL *et al.*, 2010). Esta resposta está presente em todos os indivíduos, independente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores, e não se altera após o contato. A imunidade adaptativa consiste em reações antígeno-anticorpo específica através de linfócitos T e B. É apenas ativada após o primeiro contato com agente estranho ao organismo, quando então se desenvolve a memória imunológica. Portanto, exposições subsequentes induzem respostas mais rápidas e intensas, mas não imediatas (CARPENTER *et al.*, 2014).

A invasão do organismo por micro-organismos ativa primeiramente a imunidade inata, a qual é constituída por barreiras físicas e químicas, tais como epitélios e substâncias antimicrobianas, por célula fagocíticas (macrófagos, monócitos e neutrófilos), células liberadoras de mediadores (basófilos, mastócitos e eosinófilos) e células *Natural killer* (NK). Os componentes moleculares desta resposta incluem por sua vez, o sistema complemento e as proteínas da fase aguda (proteína C reativa, histamina e serotonina) (BÁRTHOLO RM, BÁRTHOLO TP, 2009).

Os macrófagos são considerados as células sentinelas do sistema imunológico, por estarem distribuídos em diferentes tecidos, e possuírem a habilidade de reconhecer padrões moleculares associados à patógenos (PAMP) (TIZARD, 2011). Os PAMP incluem vários componentes da parede celular microbiana, como o LPS, peptideoglicanos, lipopeptídeos, flagelina, ácido desoxirribonucleico (DNA) bacteriano e ácido ribonucléico (RNA) viral de fita dupla. A estratégia da imunidade inata baseia-se neste reconhecimento de estruturas essenciais presentes em muitos tipos de micro-organismos e ausentes em células hospedeiras (CARPENTER *et al.*, 2014).

O sistema imunológico detecta ameaças exógenas (PAMP) ou estresse endógeno (padrões moleculares associados a lesão – DAMP) através de uma especializada rede de

receptores de reconhecimento padrão (PRR) que estão presentes em diferentes compartimentos celulares (OH, LEE, 2014). Esta interação receptor–patógeno é responsável por diversos mecanismos celulares como fagocitose e ativação das vias de sinalização intracelular que acarretam indução de citocinas inflamatórias, quimiocinas, interferons e regulação de moléculas co-estimulatórias (BÁRTHOLO RM, BÁRTHOLO TP, 2009).

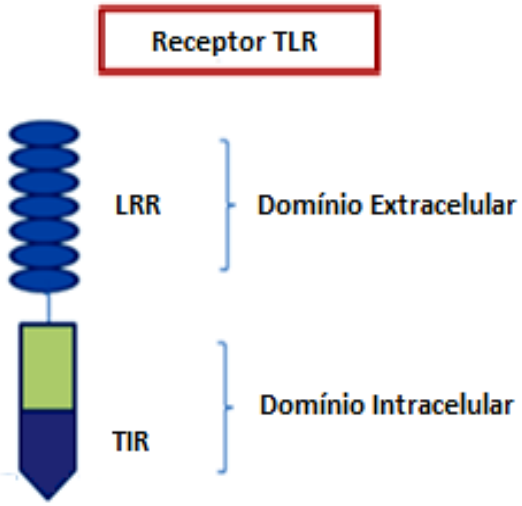
Dentre os receptores de ativação celular destacam-se os receptores do tipo Toll (Receptores *Toll-like* – TLR), que são encontrados na membrana plasmática ou endossomal, receptores NLR (*nucleotide-binding oligomerization domain like receptors*) e *RLR* (*retinoic acid-inducible gene like receptors – RIG-I-like*) que possuem localização citosólica (DURÁN, ALVAREZ-MON, VALERO, 2014).

2.2 Receptores Toll-like - TLR

A proteína Toll foi descrita pela primeira vez na *Drosophilla melanogaster*, em meados dos anos 80, por Eric Wieschaus e Christiane Nusslein-Volhard, com papel importante no desenvolvimento dorsoventral dos embriões dessas moscas. Em 1996, Lemaitre *et al.* observaram associação desta proteína na defesa antimicrobiana da *D. melanogaster*. Nesta pesquisa, moscas deficientes em Toll sucumbiram rapidamente à infecção por conídios de *Aspergillus fumigatus*. Medzhitov *et al.* (1997) identificaram a presença de receptores semelhantes à Toll no genoma humano e os denominaram de receptor Toll-like.

Os TLR desempenham papel essencial na imunidade contra vários agentes infecciosos, foram identificados 15 em humanos e 13 em camundongos (BÁRTHOLO RM, BÁRTHOLO TP, 2009; MCGETTRICK, O´NEILL, 2010). Os membros da família TLR são caracterizados pela presença de um domínio extracelular rico em leucina (LRR) e um domínio intracelular que medeia as interações com moléculas de sinalização, o receptor-Toll da interleucina-1 (TIR) (DURÁN, ALVAREZ-MON, VALERO, 2014) (Figura 1).

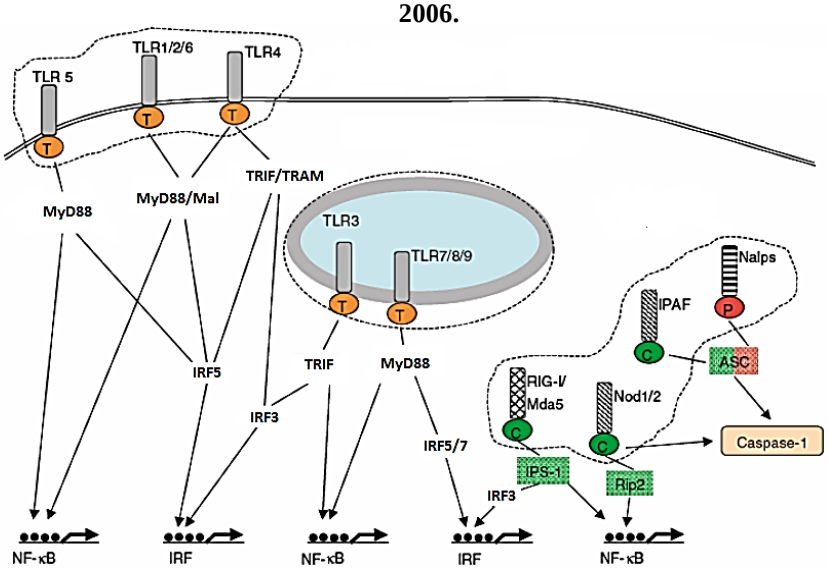
Figura 1: Representação esquemática dos receptores Toll-like. Fonte: Becker, O'Neill, 2007.



Após o reconhecimento dos PAMP pelos TLR, esses receptores se homo ou heterodimerizam e sofrem mudanças conformacionais que permitem o recrutamento das moléculas adaptadoras para o domínio TIR. Logo em seguida, inicia-se uma cascata de sinalização intracelular que resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6, IL-12 e INF-δ) e no aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras nas células apresentadoras de antígeno. Esta característica de induzir uma série de citocinas inflamatórias é resultado da ativação de fatores de transcrição (NF-kβ: *Nuclear Factor kappa B*; MAPKs: *Mitogen-activated protein kinases*; p38: proteína p38; JNK: *c-Jun N-terminal kinase* e membros da família IRF: *IFN-regulatory fator*) (BÁRTHOLO RM, BÁRTHOLO TP, 2009*)*.

A sinalização pelos receptores do tipo Toll é iniciada através da interação desses receptores com proteínas citoplasmáticas adaptadoras e co-adaptadoras, incluindo MyD88 (*Myeloid differentiation fator 88*), MAL (*MyD88 adaptador-like*)/TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*), TRIF (*TIR-domain-containing adaptor inducing IFN-β*) e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) (OH, LEE, 2014). A utilização destas moléculas adaptadoras e co-adaptadoras culmina na ativação de NF-kβ, com exceção de SARM (*Sterile α- and Armadillo-motif containing protein*) que está envolvida na regulação negativa da sinalização de TLR. Não se sabe exatamente como SARM exerce o seu papel, mas parece que SARM inibe TRIF através da sua interação direta com a molécula. A via de sinalização de TLR dependente de MyD88 é compartilhada por todos os receptores com exceção do TLR-3, cuja molécula adaptadora envolvida é TRIF (BÁRTHOLO RM, BÁRTHOLO TP, 2009*)* (Figura 2).

Figura 2: Representação esquemática das vias de sinalização dos PRR. Fonte: Modificado de Werst *et al.*, 2006.



O domínio TIR do receptor TLR-4 interage com a molécula adaptadora MyD88, que recruta membros da família IRAK (*IL-1R associated kinase*), como a IRAK-4. IRAK-4 fosforila IRAK1 formando um complexo MyD88-IRAK. Uma vez fosforiladas, as IRAK são liberadas desse complexo e interagem com TRAF6 (*TNF – tumour necrisus fator –receptor associated fator 6*), ativando-a. TRAF6 ativa TAK1 (*TGF – transforming growth fator – β-activated kinase 1*) que ativa duas vias de sinalização, uma envolvendo o complexo IKK (*inhibitor of NF-kβ kinase*) e outra os membros da família das MAPK (p38 e JNK). O complexo IKK é composto por duas quinases (Ik-α e Ik-β) e uma subunidade regulatória IkKy/NEMO. O IKK fosforila Ikβ, uma proteína citoplasmática que inibe o fator de transcrição NF-kβ, no citoplasma. O Ikβ fosforilado se dissocia do complexo com NF-kβ, permitindo sua entrada no núcleo e a ativação de diversos genes envolvidos na síntese de citocinas pró-inflamatórias. Além da via dependente de MyD88, o TLR-4 também pode ativar o NF-kβ através da via dependente de TRIF. Porém, quando utiliza essa última via necessita de uma molécula co-adaptadora denominada TRAM (BÁRTHOLO RM, BÁRTHOLO TP, 2009; CARPENTER *et al.*, 2014; DURÁN, ALVAREZ-MON, VALERO, 2014).

O NF-kβ é um fator de transcrição central da resposta inflamatória em células imunocompetentes que desempenha um papel crítico na coordenação de ambas as respostas imunes inatas e adaptativas nas infecções, por regular a expressão genética de muitos mediadores celulares (BÁRTHOLO RM, BÁRTHOLO TP, 2009*)*. A ativação por estímulos inflamatórios culmina na repressão ou transcrição de vários genes, induzindo as células a um estado ativado pronto para responder a injuria e para sintetizar proteínas, que na fase anti-inflamatória, induzem a finalização adequada do processo (HENNESSY *et al.*, 2010).

Os receptores Toll-like são divididos em duas categorias de grupos de receptores de membrana. Os receptores tipo TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-10, TLR-11, TLR-12 e TLR-13 são tipicamente associados a membrana da superfície celular. Por outro lado, os receptores tipo TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9 estão localizados primariamente nas membranas endossômicas (MCGETTRICK, O´NEILL, 2010). O TLR-2 é responsável pelo reconhecimento de peptideoglicano, ácido lipotecóico, micobactérias, protozoários, lipoproteínas, glicoproteínas e glicolipídeos; TLR-3 reconhecem fragmentos de RNA viral de fita dupla; TLR-4 além do lipopolissacarídeo (LPS) reconhecem também a proteína de fusão do vírus sincicial respiratório e o zimosan, presente na superfície de leveduras; TLR-5 para respostas contra flagelina (componente das bactérias flageladas), TLR-9 para identificar DNA

bacteriano CpG (DURÁN; ALVAREZ-MON; VALERO, 2014) e o TLR-11 é o principal receptor de reconhecimento padrão identificação do *Toxoplasma gondii* e de outros parasitas do Filo Apicomplexa (BÁRTHOLO RM, BÁRTHOLO TP, 2009).

2.3 TLR-2

O TLR-2 é considerado mediador fundamental na resposta microbicida do hospedeiro contra bactérias Gram-positivas. O perfil de expressão de TLR-2 varia nas células e tecidos a depender da importância desses na defesa do organismo. A maior expressão do TLR-2 é restrita a alguns tipos celulares, como as derivadas do sistema hematopoiético (monócito, macrófagos, granulócitos, células dendríticas, células B e T), endoteliais, vasculares, intestinais, adipócitos, miócitos cardíacos, esplênicas e pulmonares (BÁRTHOLO RM, BÁRTHOLO TP, 2009).

A ligação de ácidos lipoprotéicos com o receptor TLR-2 estimula uma cascata de sinalização intracelular que ativará o NF-kβ e a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1 (IL-1), IL-12 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) (CRUVIEL *et al.*, 2010). Entretanto, este perfil de resposta pode ser diferente a depender do tipo de PAMP que interage com este receptor. A parede celular do *S. aureus* contém ligantes do TLR-2 que desencadeiam respostas imunitárias pró-inflamatórias, mas também podem atuar como moduladores anti-inflamatórios. Esta interação bactéria-fagócito demonstra o grau de patogenicidade deste micro-organismo (MELE, MADRENAS, 2010).

Existe uma importante associação entre déficit no TLR-2 – *Staphylococcus aureus* – processos infecciosos (JANN *et al.*, 2011). Nieters e colaboradores (2006) através de um estudo *in vitro* verificaram que macrófagos de camundongos deficientes TLR-2 produzem citocinas pró-inflamatórias em resposta ao lipopolissacarídeo mas, não desenvolvem resposta ao peptideoglicano do *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes.* Este fato demonstra a importância do TLR-2 na identificação do peptideoglicano, principal PAMP da parede celular de bactérias Gram-positiva.

2.4 TLR-4

O TLR-4 pode ser ativado por ligantes endógeno, produtos de células eucarióticas, fragmentos de fibronectina, componentes da matriz extracelular e por diversos PAMP, como LPS encontrado na parede celular das bactérias Gram-negativas e o ácido lipotecóico, nas

Gram-positivas. O LPS é um potente imunomodulador, entretanto, devido à sua extrema toxicidade, como a indução de sintomas de sepse, a sua utilização clínica é limitada (MIFSUD, TAN, JACKSON, 2014). O ácido lipotecóico e o peptideoglicano são descritos como os responsáveis pela produção do óxido nítrico (NO), choque séptico e falência múltipla de órgãos provocados nas infecções por *S. aureus* (SEO *et al.*, 2008).

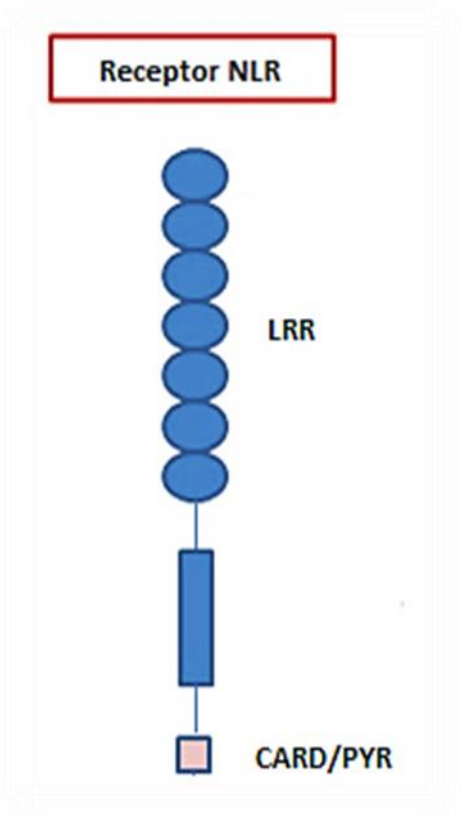
Os diversos componentes da parede celular dos micro-organismos interagem com diferentes tipos TLR, e modulam a expressão de vários padrões de citocinas, após o contato entre o patógeno e a célula hospedeira (CRUVIEL *et al.*, 2010). A estimulação por bactérias e fungos através do TLR-4 é capaz de mediar à indução de citocinas pró-inflamatórias, enquanto o reconhecimento desses micro-organismos por TLR-2 pode conduzir à liberação de mediadores anti-inflamatórios (AKIRA, UEMATSU, TAKEUCHI, 2006).

A ativação de TLR-4 inicia uma sinalização intracelular com transcrição NF-kβ, ativação da proteína-1 (AP-1), síntese e liberação de citocinas, como TNF-α e IL-1β, assim como o óxido nítrico, que está associado a lesão de tecidos e choque séptico. Entretanto, o papel do TLR-4 na imunidade inata ainda é alvo de extensivos estudos (MIFSUD, TAN, JACKSON, 2014). Segundo Chen, Gordon, Laskin, (2007), ratos *knockout* para TLR-4 tornam-se hiporreativo, produzindo baixos níveis de mediadores inflamatórios. Na ausência do receptor TLR-4 e diante do LPS, há baixa produção de TNF-α e de espécies reativas de oxigênio. Desta forma, a baixa expressão do TLR-4 poderia favorecer a instalação de processos infecciosos bacterianos (ZOU *et al.*, 2008).

2.5 Receptores Nod-like - NLR

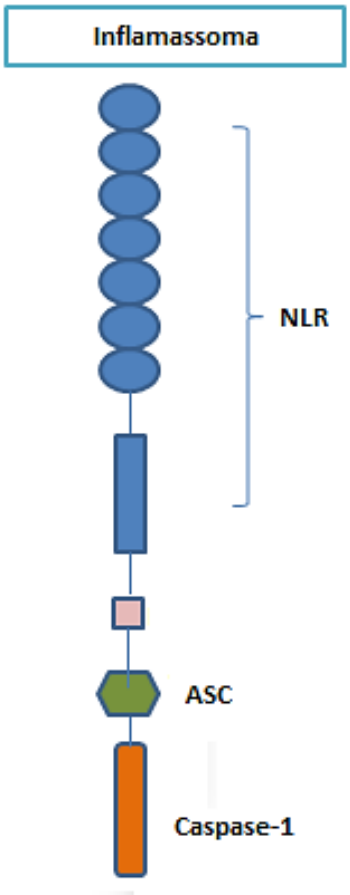
O NLR compreende uma família de proteínas intracelulares que incluem: um domínio de interação proteína-proteína amino-terminal do tipo CARD (*caspase recruitment domain*) ou pirina (PYR); um domínio intermediário NOD, o qual é necessário para ligação a nucleotídeos e auto-oligomerização; e um número variável de motivos de repetição ricos em leucina – LRR, na porção carboxiterminal (LAMKANFIA, KANNEGANTIC, 2010) (Figura 3). O domínio LRR tem sido implicado na sensibilidade de ligantes e na auto-regulação dos NLR, mas os mecanismos do LRR no NLR para reconhecimento dos seus ligantes são pouco conhecidos (MARTINON, MAYOR, TSCHOPP, 2009).

Figura 3: Representação esquemática do receptor NLR. Fonte: Modificado de Bauernfeind, Hornung, 2013.



Baseado na distribuição filogenética, a família NLR contém 22 membros incluindo os receptores NLRP, NLRC, NAIP, NLRX CIITA, entre outros. Os NLRP representam uma subfamília dos NLR contendo 14 membros, como NLRP1, NLRP2 e NLRP3 (MARTINON, MAYOR, TSCHOPP, 2009). Quando estimulados os receptores NLPR1, NLRP3 e NLRC4 orquestram a montagem de um complexo macromolecular. Este complexo multiproteico é denominado inflamassoma (LAMKANFIA, KANNEGANTIC, 2010). O inflamassoma é composto pelo receptor NLR, pela proteína adaptadora (ASC) e a enzima caspase-1 (PAIVA-OLIVEIRA *et al.*, 2012) (Figura 4).

Figura 4: Representação esquemática do inflamassoma. Fonte: Modificado de Bauernfeind, Hornung, 2013



O inflamassoma é um complexo de sinalização que ativa pró-caspase-1 e induz a secreção de citocinas IL-1β e IL-18 (CRAVEN *et al.*, 2009). Os ativadores do inflamassoma são grupados em estéreis (DAMP, como adenosina trifosfato exógeno- ATP), patogênicos (PAMP) e ambientais (alumínio, sílica). Até o momento foram descritos seis inflamassomas distintos: NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRP6, NLRP12 e AIM2 (BAUERNFEIND, HORNUNG, 2013).

2.6 Inflamassoma NLRP3

O inflamassoma NLRP3 pode ser ativado por uma infinidade de agonistas endógenos, exógeno, estéreis ou derivados de patógenos. A ativação deste inflamassoma é muito complexa e requer múltiplos sinais que aparecem de forma coordenada. Potentes sinais de perigo no ambiente da matriz extracelular e tecidual podem ser resultado da morte de células,

de elevados níveis metabólicos, e de agregado ou material cristalino, como cristais de ácido úrico (HORVATH *et al.*, 2011).

Em macrófagos inativos, os níveis de expressão do NLRP3 são baixos, incapazes para promover a ativação do inflamassoma. Segundo Mankan, Kubarenko e Hornung (2011) existem três mecanismos distintos para ativação do inflamassoma NLRP3: desintegração dos lisossomos com liberação do seu teor para o espaço extracelular, espécies reativas de oxigênio (ROS) e efluxo de potássio para espaço extracelular.

Halle *et al.* (2008) observaram que a ruptura lisossomal coincidiu com ativação do inflamassoma e que a inibição de enzimas lisossomais (catepsina B) impediria a ativação do inflamassoma NLRP3. Cruz *et al.* (2007) propôs a existência de uma ligação entre a produção de ROS e ativação da pró-caspase-1. Os autores demonstraram que o contato de macrófagos com ATP extracelular resultou na produção de ROS e consequente desencadeamento de vias intracelulares que culminaram com a ativação da pró-caspase-1, com consequente liberação de IL-1β.

Segundo Mankan, Kubarenko e Hornung (2011) elevados níveis de ATP extracelular é considerado um potente indutor para o processamento de IL-1β e efluxo de potássio. O efluxo de potássio para o espaço extracelular consiste em um importante fator para ativação do inflamassoma NLRP3. Petrilli *et al.* (2007) observaram que o aumento da concentração extracelular de potássio inibe a ativação do inflamassoma NLRP3, por ocorrer o bloqueio do efluxo de potássio.

O inflamassoma NLRP3 é essencial para o desencadeamento da resposta imune contra patógenos bacterianos, virais, fúngicos e no surgimento de doenças auto-inflamatórias (SUTTERWALA *et al.*, 2007). Estudos utilizando macrófagos *knockout* para NLRP3 demonstram que após infecção com bactérias Gram-positivas não houve secreção de IL-1β e IL-18 (LAMKANFIA, KANNEGANTIC, 2010; MARTINON, MAYOR, TSCHOPP, 2009). O inflamassoma NLRP3 desempenha papel crítico nas respostas contra o vírus *Influenza*, o fungo *Candida albicans* e a bactéria *Staphylococcus aureus*. Também direciona respostas inflamatórias nos queratinócitos após exposição a várias moléculas irritantes, como radiação ultravioleta, induzindo reações de hirpersensibilidade (LAMKANFI, KANNEGANTI, 2010).

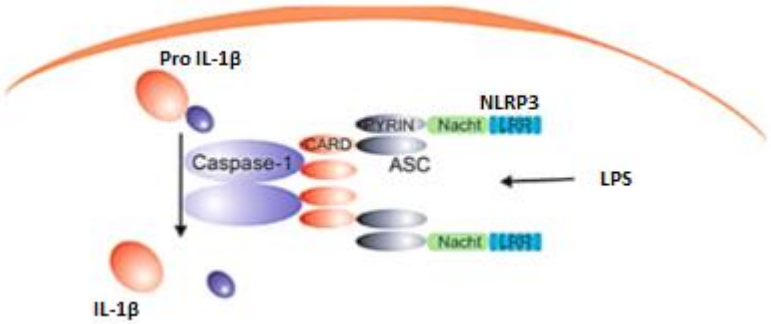
Estudos experimentais verificaram que animais deficientes na proteína adaptadora ASC tornaram-se mais suscetíveis a infecções por algumas bactérias como a *Staphylococcus aureus*, bem como para o vírus *Influenza*, o que demonstra a sua importância nos mecanismos

de defesa do hospedeiro (ICHINOHE *et al.*, 2009; MILLER *et al.*, 2007). Lamkanfi e Kanneganti (2009) verificaram que *Staphylococcus aureus* ativa o inflamassoma NLRP3 através das suas toxinas (α, β, δ hemolisina). Entretanto, Latz (2010) sugeriu que existem outros mecanismos de ativação mediados pelo *S. aureus*, uma vez que não houve redução nos níveis da caspase-1 em cepas deficientes nas hemolisinas. Segundo Craven *et al.* (2009), na infecção pelo *S. aureus*, ocorre a formação do inflamassoma NLRP3 através da α-hemolisina e de outros derivados da parede celular, induzindo o desencadeamento da ativação da caspase-1 e consequente necrose tecidual.

2.7 Caspase-1

A caspase-1 é uma cisteíno-protease expressa como um zimógeno inativo. A associação da pró-caspase-1 com o complexo inflamassoma permite o seu processamento e ativação. Assim, após recrutamento para o interior da estrutura do inflamassoma, a pró-caspase-1 sofre auto-ativação por clivagem proteolítica tornando-se um heterodímero enzimaticamente ativo. A caspase-1 medeia o processamento e ativação das citocinas pró- IL-1β e IL-18, que são sintetizadas no citosol na forma de precursores inativos (SUTTERWALA *et al.*, 2006) (Figura 5).

Figura 5: Secreção da citocina IL-1β através do inflamassoma NLRP3. Fonte: Modificado de Netea *et al.*, 2010.



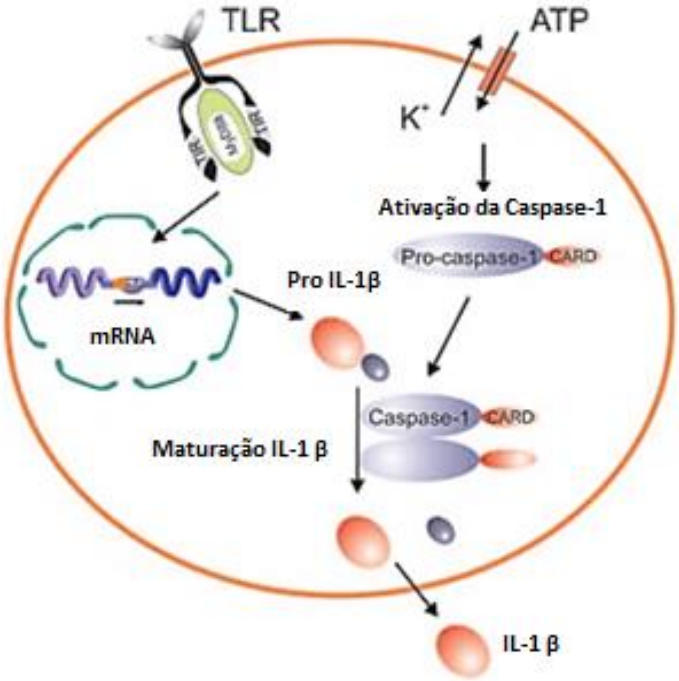
Assim que a IL-1β e a IL-18 se tornam biologicamente ativas são liberadas para o meio extracelular. Geralmente, este processo ocorre após a indução de morte celular intrinsecamente pró-inflamatória, denominado piroptose. Esta via pró-inflamatória de morte celular é exclusivamente dependente de caspase-1 e induz rápida lise celular com liberação do conteúdo citoplasmático. As citocinas IL-1β e IL-18 são responsáveis pela ampla resposta inflamatória que acompanha este processo (LATZ, 2010).

As citocinas pró-inflamatórias da família da IL-1 (IL-1α e IL-1β) tem um papel importante para defesa do hospedeiro. IL-1α e IL-1β interagem sinergicamente no mesmo receptor e promovem a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF e IL-6, além de ativar os linfócitos T auxiliares tipo 17 (T *helper* 17 - Th17). A IL-1β é um potente pirógeno endógeno, estimulador da febre, da migração de leucócitos para os tecidos, da expressão de citocinas, quimiocinas, de proteína c reativa, da anorexia e da sonolência (NETEA *et al.*, 2010). A IL-18 induz a produção de IFN-δ que é importante para ativação de linfócitos T auxiliares tipo 1 (T *helper* 1 - Th1), além de macrófagos e outros tipos celulares (LAMKANFIA, KANNEGANTIC, 2010).

A IL-1β é um importante mediador para defesa contra o *Staphylococcus aureus*. Na infecção por *S. aureus*, a produção de IL-1β atua no recrutamento de neutrófilos e a consequente degradação da parede celular bacteriana, através da enzima lisozima. A lisozima, por sua vez, retroalimenta a via de secreção de IL-1β. Entretanto, *S. aureus* possui uma enzima a O-acetiltransferase que torna a parede celular resistente à ação da lisozima e assim, suprime a ativação do inflamassoma (SHIMADA *et al.*, 2010). Além disto, *S. aureus* pode modificar sua parede celular (componentes do peptidoglicano), para evitar o reconhecimento e ativação do inflamassoma NLRP3 (SAHOO, CEBALLOS-OLVERA, RE, 2011).

Segundo Latz (2010), existem dois sinais distintos para secreção de IL-1β. O primeiro sinal atua na indução da transcrição do NLRP3 para níveis suficientes para a sua ativação. Este sinal pode ser promovido pelos receptores imunes inatos (TLR), receptores de citocinas ou outros sinais. Ao mesmo tempo, o substrato para caspase-1, isto é, pró-IL-1β também é transcrito (MARIATHASAN, MONACK, 2007). O segundo sinal pode ser derivado da ativação na superfície de receptores purinérgicos ($P2X_7$), cujo principal fator endógeno é ATP extracelular, que pode surgir após a desintegração celular (HORVATH *et al.*, 2011; SCHRODER, TSCHOPP, 2010) (Figura 6). Mariathasan e Monack (2007) verificaram que camundongos deficientes no receptor $P2X_7$ não produzem IL-1β em resposta ao ATP exógeno (MARIATHASAN, MONACK, 2007).

Figura 6: Os dois sinais responsáveis pela ativação da caspase-1 e subsequente secreção de IL-1β. Fonte: Modificado de Netea *et al.*, 2010.



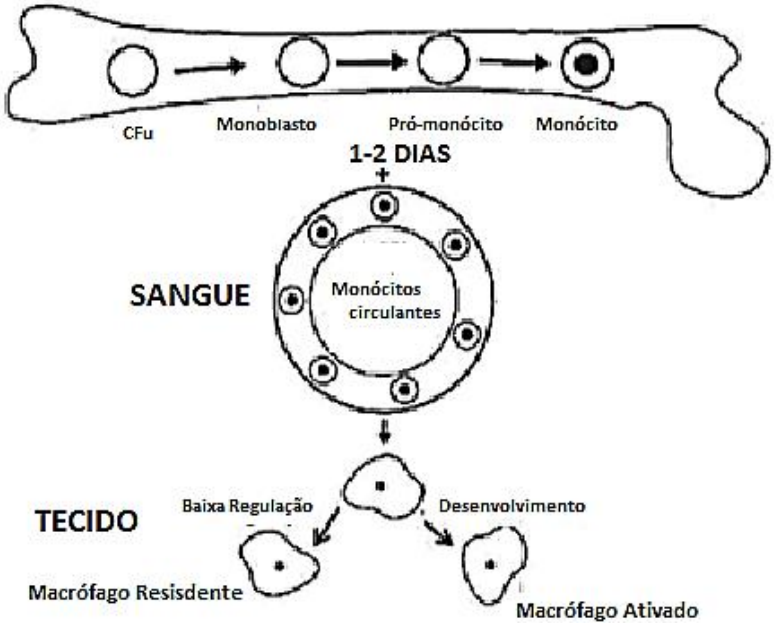
Martinon e colaboradores (2009) afirmaram que os receptores TLR e $P2X_7$ estimulam à formação do inflamassoma NLRP3 e que este por sua vez, desenvolve papel central na ativação da caspases-1 em resposta a estimulação combinada ao TLR (MARTINON, MAYOR, TSCHOPP, 2009). Desta forma, verifica-se a importância da ação conjunta dos receptores TLR e NLR para transcrição de genes e ativação de enzimas essenciais para eliminação do patógeno invasor. O fato de receptores extra e intracelulares compartilharem os mesmos ligantes pode sugerir uma cooperação no sentido de otimizar a ativação celular frente a determinadas infecções (LATZ *et al.*, 2010).

Apesar de inúmeros estudos sobre o perfil da resposta imune via receptores de reconhecimento padrão nas infecções, ainda existem muitas lacunas sobre à interação *S. aureus* e os receptores TLR e NLR. Em virtude da importância destes componentes para reposta microbicida, quanto maior for o entendimento do seu papel na imunidade inata maior será a possibilidade do surgimento de novas alternativas de diagnóstico e terapêutica. Estes poderão auxiliar no planejamento de estratégias em saúde pública voltadas para populações mais suscetíveis a adquirir determinadas infecções, com a finalidade de reduzir os índices de morbidade e mortalidade em quadros infecciosos bacterianos graves.

2.8 Macrófagos

O sistema mononuclear fagocítico é constituido por células que se originam na medula óssea, são transportadas pela circulação sanguínea e se localizam em diversos tecidos. O macrófago é um dos componentes do sistema fagocítico mononuclear, pertence à linhagem mielóide, derivado de uma célula hematopoiética multipotente que se diferencia em monoblasto, pró-monócito e monócito (TORRACA *et al.*, 2014). Após sua diferenciação, os monócitos caem na corrente sanguínea (3% a 8 % dos leucócitos circulantes) e permanece cerca de ½ a 17h. Os monócitos, sob a influência das moléculas quimiotáticas, migram para os tecidos e transformam-se em MØ. Estes macrófagos poderão ser divididos em: ativados (quando ocorre um processo inflamatório) ou residentes (macrófagos sentinelas presentes em sítios orgânicos específicos) (COELHO-CASTELO *et al.*, 2009) (Figura 7).

Figura 7: Processo de maturação e ativação de macrófagos. Fonte: Adams, 1994.



Os macrófagos são células 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 (TORRACA *et al.*, 2014). Os monócitos e macrófagos são fagócitos eficientes, engolfando patógenos e *debris* celulares. Ao contrário dos neutrófilos, os macrófagos podem permanecer no tecido por meses a anos, atuando como verdadeiras sentinelas. Além de seu papel na imunidade inata, processam e apresentam antígenos via

moléculas de MHC e desta forma, iniciam a resposta mediada por linfócitos T (TEGNÉR *et al.*, 2007).

Populações representativas de macrófagos estão presentes no fígado (células de *Kupffer*), pulmão (macrófagos alveolares), tecido conjuntivo (histiócitos), rim, linfonodos, baço, medula óssea, fluidos serosos (macrófagos pleurais e peritoneais), pele (histiócitos e células de Langerhans) e cérebro (micróglias) (NATHAN, 2008). O trato respiratório é frequentemente exposto a micro-organismos e partículas presentes no ar (área de contato de 50-100m^2 da superfície epitelial do pulmão), defende-se de eventuais efeitos prejudiciais, através de mecanismos microbicidas associados ou não à fagocitose, efetuados por macrófagos alveolares (HUME, 2006).

Os macrófagos quando ativados apresentam uma série de diferenças morfológicas, funcionais e metabólicas quando comparadas às células não ativadas. Neste processo, os macrófagos podem apresentar alterações, tais como aumento de tamanho, de aderência, da velocidade de deslocamento e da atividade fagocítica (CRUVIEL *et al.*, 2010). A potente atividade secretória dos macrófagos determina sua multifuncionalidade e sua participação em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos (TEGNÉR *et al.*, 2007).

Existem três subpopulações de macrófagos: macrófagos ativados, de reparo tecidual e reguladores. Os primeiros seriam a ativação dos macrófagos clássicos. O termo ativação clássica é designado para macrófagos efetores, que são produzidos na resposta imune mediada por células. A ativação de macrófagos clássica depende de produtos de linfócitos Th1 e células NK, em particular IFN-γ. Os MØ ativados secretam grandes quantidades de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, apresenta atividade microbicida e tumoricida. O segundo tipo, é ativado pela via alternativa que é induzida por interleucina 4 e 13 (IL-4 e IL-13), sintetizadas na resposta dos linfócitos T auxiliares tipo 2 (T *helper* 2 - Th2). Estes macrófagos estariam envolvidos no reparo tecidual, estimulando fibroblastos e promovendo deposição de matriz extracelular. O terceiro tipo de MØ exerceria atividade reguladora mediante liberação de interleucina 10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória (MOSSER *et al.*,2008).

Em resposta a inflamação e a estimulação imunológica, monócitos são recrutados ao sítio local, onde disparam diferentes fenótipos, ou os MØ residentes adaptam seu microambiente local e torna-se ativados. O início da resposta imunológica é a fagocitose exercida pelos macrófagos, que se constitui de várias etapas: aderência ao substrato, quimiotaxia, ingestão do substrato, produção de radicais livres de oxigênio e de nitrogênio

(CRUVIEL *et al.*, 2010). O macrófago ativado sofre um espraiamento, com alteração da forma (arredondada para achatada), e consequente aumento da área de contato da membrana plasmática com o substrato a ser fagocitado e redistribuição das organelas citoplasmáticas (TEGNÉR *et al.*, 2007).

Durante a aderência, ocorre ativação de receptores para moléculas de adesão, como fibronectina, vibronectina e laminina, entre outras, ocasionando rearranjo do citoesqueleto celular. Após a internalização da partícula, a actina-F que envolve o fagossomo é despolimerizada. Por meio de uma série de eventos de fusão, a membrana vacuolar e seu conteúdo fusionam-se ao lisossomo, para formar o fagolisossoma. A taxa de fusão fagossomo-lisossomo varia dependendo da natureza da partícula ingerida (STUART, EZEKOWITZ1, 2005).

Posteriormente à formação do fagolisossomo, os macrófagos ativados convertem o oxigênio molecular em intermediários reativos do oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (TEGNÉR *et al.*, 2007). Além dos ROS, os macrófagos produzem intermediários reativos do nitrogênio, principalmente o óxido nítrico. O óxido nítrico e o ânion superóxido são radicais efetores do sistema imune que inibem diretamente a replicação de patógenos (VANCINI *et al.*, 2012).

2.9 Radicais Livres

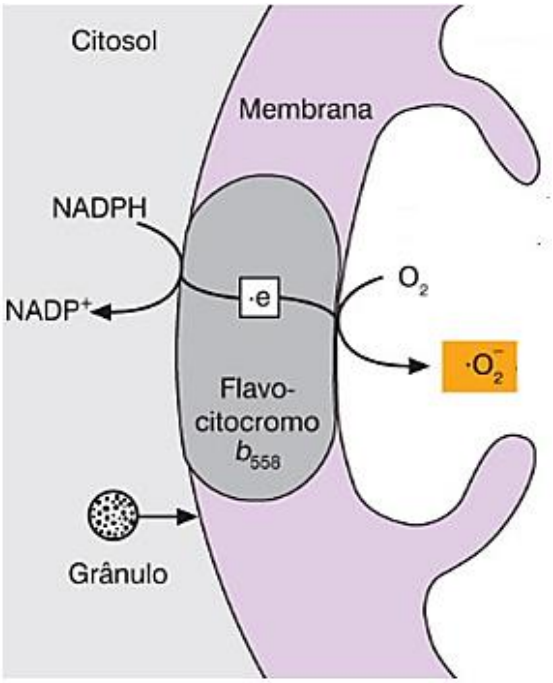
Radical livre é definido como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados nas suas camadas de valência (HALLIWELL, 2006). A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos. Exemplos de radicais livres são: radical hidroxil, ânion superóxido, radical peroxil, radical alcoxil e óxido nítrico (MURPHY *et al.*, 2011).

2.9.1 Ânion superóxido

A ativação dos macrófagos por contato com partículas estranhas é acompanhada por aumento do consumo de oxigênio seguido de redução unieletrônica, induzindo à formação de ROS, em um processo denominado explosão oxidativa (MURPHY *et al.*, 2011). Estes produtos tóxicos do oxigênio também funcionam como segundos mensageiros e moduladores do sistema imunitário. O processo de formação dos ROS ocorre após à ativação da via da hexose monofosfato, que forma nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzido

(NADPH). Os elétrons são transferidos do NADPH para uma flavoproteína da membrana que contem flavina-adenina dinulceotídio (FAD), através da enzima flavocitocromo-oxidase (NADPH oxidase). Em seguida, para um citocromo singular presente na membrana plasmática (citocromo b_{558}). Esse citocromo tem potencial redox médio muito baixo (-245mV), que permite reduzir diretamente o oxigênio molecular em ânion superóxido (KÖHLER *et al.*, 2011) (Figura 8).

Figura 8: Produção de ânion superóxido. Fonte: Modificado de Roitt, 2013.



O ânion superóxido produzido é liberado para o meio extracelular ou para o interior do vacúolo fagocítico. Em seguida, é convertido em peróxido de hidrogênio, por ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Na presença de sais de ferro, peróxido de hidrogênio é convertido em radicais hidroxilas, que é considerado um radical altamente reativo e tóxico (HALLIWELL, 2006). Por causa de suas potentes propriedades antibacterianas, como a capacidade de oxidar membranas celulares e de formar pontes de dissulfeto entre os aminoácidos cisteína de diversas proteínas estruturais, participam da morte de diversos micro-organismos. Além disso, a combinação do H_2O_2, da mieloperoxidase e dos íons halidas forma um sistema halogenador capaz de destruir bactérias e vírus. Embora o peróxido e os

compostos halogenados não serem tão reativos quanto os radicais livres, possuem maior estabilidade, e assim, difundem-se a longas distâncias. (MACEDO *et al.*, 2010).

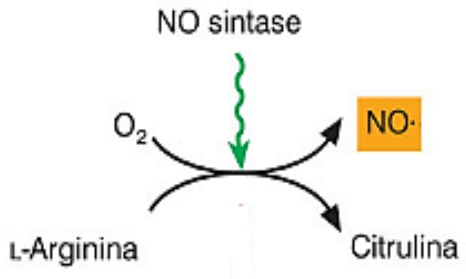
Alterações em genes dos componentes do sistema de oxidases presentes na membrana do fagolisossomo promovem incapacidade na explosão oxidativa. A ausência dos ROS determina deficiência grave na capacidade destrutiva dos fagócitos e é responsável por uma importante imunodeficiência primária, denominada doença granulomatosa crônica (CRUVIEL *et al.*, 2010).

2.9.2 Óxido Nítrico

O gás NO é um radical livre que tem capacidade de se difundir através de membranas biológicas; funciona como um agente microbicida produzido por macrófagos ativados a partir do aminoácido L-Arginina. Esta reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (FÖRSTERMANN, SESSA, 2012). O NO interage com muitas vias metabólicas requeridas para sobrevivência do patógeno, mas pode paradoxalmente causar danos ao tecido hospedeiro. Há indícios que a produção de NO seja o mecanismo antimicrobiano mais acentuado dos macrófagos (MURPHY *et al.*, 2011).

Existem três principais isoformas de NOS em mamíferos: a NOS neuronal (nNOS), a NOS endotelial (eNOS) e a NOS induzida (iNOS). A eNOS e a nNOS são constitutivas. A iNOS é uma enzima que contém um domínio C-terminal redutor, que liga NADPH transferindo elétrons para FAD e então para FMN (flavina mononucleotídeo) (YANG, MING, 2013). Ao contrário das outras isoformas, a iNOS é independente de cálcio para sua ativação. A iNOS utiliza oxigênio e elétrons da NADPH para oxidar o substrato L-arginina em um intermediário OH-L-arginina, que é então oxidado resultando na liberação de NO e L-citrulina (FORTIN *et al.*, 2010) (Figura 9).

Figura 9: Produção de óxido nítrico. Fonte: Modificado de Roitt, 2013.



Uma variedade de estímulos extracelulares podem ativar diferentes vias de sinalização que convergem para iniciar a expressão da iNOS. As citocinas pró-inflamatórias e componentes da parede celular de bactérias e fungos podem disparar cascatas de sinalização, induzindo a expressão da iNOS (MCGETTRICK, 2010). A transcrição de iNOS é controlada pela proteína osteopontina (OPN), um potente repressor da expressão da iNOS. A concentração de OPN aumenta quando há ativação do fagócito. Em modelos de macrófagos murinos, estimulados com LPS, a OPN aumenta a ubiquitinação de ativadores da transcrição (como, a STAT1) e sua subsequente degradação pela subunidade 26 do proteossomo, para então inibir a atividade do promotor da iNOS, sua transcrição e expressão (GAO *et al.*,2007).

O NO apresenta um papel dúbio, às vezes benéfico, outras vezes prejudicial ao organismo. Assim, quando a resposta inflamatória é parte de uma resposta adaptativa (infecção ou sepse), a expressão de iNOS é benéfica, resultando em inibição do crescimento de patógenos microbianos. Porém, quando a expressão da iNOS é parte da inflamação anormal (não adaptativa), a expressão de iNOS pode ser nociva (MCGETTRICK, O´NEILL, 2010).

A citotoxicidade do óxido nítrico resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório. A base bioquímica para a ação direta do oxido nítrico consiste na sua reação com metais presentes nas enzimas, principalmente o ferro. Desta forma, enzimas cruciais para o ciclo de Krebs, para a cadeia transportadora de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular tornam-se inativas (MCGETTRICK, O´NEILL, 2010). A ação citotóxica indireta consiste na sua reação com os intermediários reativos de oxigênio, como a reação entre o óxido nítrico e o ânion superóxido que resulta na formação do peroxinitrito, um poderoso oxidante de proteínas. O peroxinitrito posteriormente, protonar-se na presença de íon hidrogênio, originando o radical hidroxil e o dióxido de nitrogênio (MURPHY *et al.*, 2011).

2.10 Morte celular

A célula, dentro de certos limites pode compensar alterações e retornar ao seu estado normal, mas quando o estímulo nocivo ultrapassa o limiar da lesão irreversível ocorre à morte celular. Uma célula pode morrer por mecanismos apoptóticos e não-apoptóticos. Se o dano é muito violento (ausência de oxigênio, agentes químicos, agentes infecciosos, reações

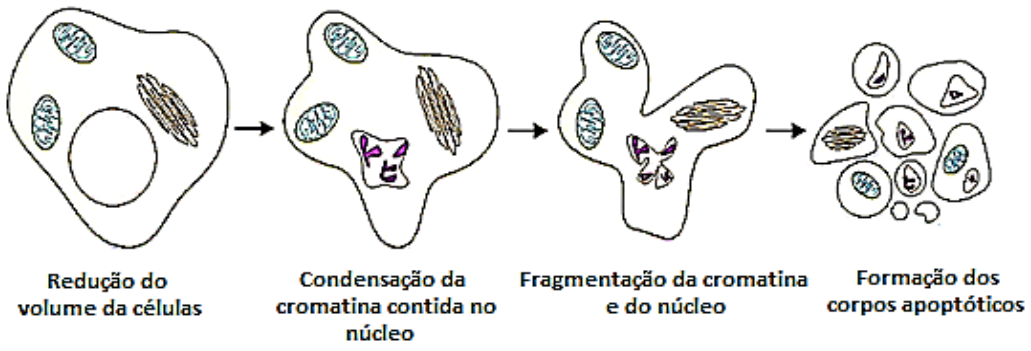
imunológicas e distúrbios genéticos), a célula não tem escolha a não ser sofrer uma morte necrótica, não geneticamente controlada (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007).

Na necrose ocorre à perda imediata da integridade da membrana, com agrupamento irregular da cromatina, aumento do volume celular, devido ao acúmulo de água e eletrólitos, ruptura da membrana plasmática e das organelas celulares. Este processo induz uma reação inflamatória secundária em resposta aos *debris* celulares, resultando em lesão tecidual extensa (ANAZETTI, MELO, 2007).

Por outro lado, se o dano é mais sutil (como resolução de processos infecciosos, desequilíbrios nutricionais), a morte normalmente ocorre por apoptose. Em resposta a eventos apoptóticos, pró-caspases são processadas por clivagem enzimática tornando-as ativas. Com exceção da enzima caspase-1, que está envolvida com inflamação, as enzimas caspases ativadas são vistas como marcadores característicos da apoptose (LALOR *et al.*, 2011).

A apoptose é caracterizada por uma série de eventos morfológicos, como redução do tamanho da célula, condensação nuclear, segregação da cromatina, brotamento da membrana, fragmentação em corpos apoptóticos, seguida de rápida fagocitose pelas células vizinhas (Figura 10). A característica bioquímica da apoptose é a degradação do DNA por DNases endógenas, que cortam as regiões internucleossomais em fragmentos de DNA dupla-fita com 180-200 pares de bases (pb) (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007). O processo apoptótico não é um evento raro. A maioria da morte celular que ocorre durante a vida de um organismo envolve esse processo, porém é raramente vista *in situ* devido à rápida remoção das células apoptóticas, através de fagocitose, pelas células vizinhas (ANAZETTI, MELO, 2007).

Figura 10: Estágios morfológicos que caracterizam o fenômeno de apoptose celular. Fonte: Modificado de Rafael Freitas, 2012.



Na apoptose, a membrana citoplasmática permanece intacta. Em seus estágios precoces ocorrem mudanças na superfície celular, uma destas alterações é a translocação da fosfatidilserina, um fosfolipídeo carregado negativamente, do interior para o exterior da membrana citoplasmática. Esta translocação da fosfatidilserina medeia o reconhecimento e fagocitose dos corpos apoptóticos pelas células vizinhas (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007).

A apoptose de macrófagos é considerada como um importante mecanismo para a resolução do processo inflamatório (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007). O óxido nítrico pode atuar como indutor ou inibidor da apoptose, dependendo das condições do microambiente e da presença ou ausência de certas moléculas co-estimulatórias. A produção de NO em altas concentrações (100-200μM) induz à apoptose destas células. Este evento é considerado benéfico por eliminar as células desnecessárias evitando a morte necrótica destas, o que levaria à liberação do conteúdo celular, potencialmente tóxico para o meio extracelular (ANAZETTI; MELO, 2007).

Os ROS podem também induzir ou inibir apoptose de várias células do sistema imune. Células NK humanas foram rapidamente mortas pelo H_2O_2 produzido por monócitos, enquanto que as células T humanas foram de duas até cinco vezes mais resistentes à apoptose induzida pelo peróxido de hidrogênio. Em macrófagos de camundongos, a produção endógena de O_2^- contribui para a resistência à apoptose mediada pelo NO, indicando que o balanço de ROS e NO pode determinar a sobrevivência ou apoptose dos macrófagos (MACEDO *et al.*, 2010).

A morte celular, que é o efeito mais comum durante a infecção, é um processo adicional importante das interações patógeno-hospedeiro. Várias formas de morte celular foram descritas e a escolha do modo de morte parece depender de diversos fatores como a natureza do patógeno, a carga do patógeno e o local da infecção. A morte de células infectadas, consequentemente a morte do agente infectante, pode promover uma eficiente eliminação do patógeno (DELEO, DIEP, OTTO, 2009).

2.11 Infecção bacteriana

As bactérias são micro-organismos unicelulares, que podem causar diversas doenças nos seres humanos. Os principais mecanismos envolvidos na infecção bacteriana são: a) contato com as células do hospedeiro; b) proliferação; c) invasão do tecido e d) indução de

lesões teciduais principalmente por liberação de toxinas. Do ponto de vista da resposta imune, as bactérias são classificadas em duas categorias conforme sua localização: 1- Bactérias intracelulares ou intracelulares obrigatórias, que são capazes de se replicar no interior das células do hospedeiro (citoplasma e fagossomos); 2- Bactérias extracelulares, que se replicarem fora das células do hospedeiro (na circulação, no lúmen intestinal, vias aéreas) (COELHO-CASTELO *et al*., 2009).

Com base nesta localização, os mecanismos imunológicos envolvidos no combate as infecções bacterianas também variam. De modo geral, as bactérias intracelulares são eliminadas por mecanismos mediados por célula, já as extracelulares pelo sistema complemento e anticorpos que opsonizam as células bacterianas e neutralizam as toxinas liberadas. Para muitos agentes bacterianos, o sistema imune do hospedeiro elimina com sucesso invasores. Entretanto, em certos tipos de infecções, bactérias resistem a ação da resposta microbicida e persistem dentro do hospedeiro (GRANT, HUNG, 2013).

Apesar de ser considerada uma bactéria extracelular, o *Staphylococcus aureus* é capaz de invadir uma variedade de células e de sobreviver a endocitose dos fagócitos profissionais, tais como neutrófilos e monócitos. Em ambos os tipos de células, o *S. aureus* pode conseguir se evadir dos fagossomos e proliferar dentro do citoplasma, o que induz rapidamente à morte de células hospedeiras (KUBICA *et al.*, 2008).

2.12 Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus é considerado um dos principais patógenos causadores de infecções no ambiente hospitalar. As manifestações clínicas variam desde infecções traumáticas até septicemias. É uma bactéria pertencente à família Micrococcaceae, cocos Gram-positivos, catalase-positivos, com 0,5 a 1,5μm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e não-encapsulados (SANTOS, 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 superior de 73% da população em geral, permanecendo sem causar doença em condições normais. Pode ser também encontrado em outras regiões úmidas do corpo como axilas, períneo, vagina e reto (SHIBABAW, ABEBE, MIHRET, 2014). A infecção e propagação por contato tem maior importância nos hospitais, uma vez que grande parte da equipe e dos pacientes (30 a 50%) abrigam cepas resistentes nas fossas nasais e na pele. Estas

infecções podem ser causadas por bactérias do próprio indivíduo (infecções endógenas) ou por amostras adquiridas de outras pessoas (infecções exógenas) (RYU *et al.*, 2014).

Alguns fatores relacionados as condições do hospedeiro predispõem às infecções por *S. aureus*, como a idade, presença de doenças crônicas, uso de cateteres intravenosos e tempo prolongado de hospitalização (SHIBABAW, ABEBE, MIHRET, 2014). É interessante ressaltar que em casos de administração de nutrição parenteral, realizada para debelar a desnutrição, os componentes nutricionais da solução nutritiva constituem justamente um fator adicional para o crescimento bacteriano no cateter (QIANG *et al.*, 2014).

No último século, *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 (RYU *et al.*, 2014). Esta bactéria é responsável por uma variedade de infecções, como na 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, devido às toxinas produzidas e liberadas no organismo do hospedeiro (SIBBALD *et al.*, 2006).

A patogenicidade do *Staphylococcus aureus* é dada por um arsenal de fatores de virulência, dispostos na superfície da célula bacteriana ou secretados no meio externo. Os principais fatores de virulência do *S. aureus* são: coagulase, proteína A, proteína ligante de colágeno e fibronectina, fator *clumping*, ácido teicóico, ácido lipoteicóico, membrana plasmática, parede celular, peptideoglicano, cápsula e toxinas. Entre as toxinas se destacam algumas capazes de induzir lise, denominadas hemolisinas citotóxicas ou leucocidinas (PVL – *Panton- Valentine leukocidin*), as quais são capazes de produzir lesão das células alvo, através da formação de poros na membrana celular. O principal alvo das leucocidinas são os leucócitos e promovem a lise destas células, através da formação de poros na membrana celular. Tais mecanismos propiciariam um maior tempo de sobrevivência para o *S. aureus* no organismo, caracterizando o seu alto poder infeccioso (CARVALHO, BEREZIN, MIMICA, 2012; NIZET, 2007).

As toxinas superantigênicas também são relevantes fatores de virulência. Apesar de não possuírem ação lítica direta, causam lesões em decorrência da elevada produção de citocinas pelos linfócitos T e macrófagos ativados. As toxinas superantigênicas são classificadas em toxina 1 da síndrome do choque tóxico, enterotoxinas estafilocócicas (EE:

EEA, EEB, EEC, EED, EEE, EEG e EEH), hemolisinas (α-toxina, β, γ hemolisinas) e enterotoxinas. Estes superantígenos desencadeiam uma série de efeitos tóxicos, como a síndrome do choque tóxico e as intoxicações, que estão associadas a óbitos em neonatos e idosos (MARIANO *et al.*, 2007).

Segundo Craven *et al.* (2009), a α-hemolisina do *S. aureus* é o fator principal para induzir a sinalização inflamatória e morte celular. Entretanto, o mecanismo subjacente a estes eventos de sinalização ainda não foi compreendido (CRAVEN *et al.*, 2009). A patogenicidade desta bactéria deve-se tanto à absorção destas toxinas pré-formadas, quanto à poderosa capacidade invasiva do *S. aureus*, ao promover o surgimento de bacteremias e abscessos disseminados em todos os órgãos. A partir de qualquer foco, estes micro-organismos podem propagar-se através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea para outras partes do corpo (QIANG *et al.*, 2014).

2.13 Resposta imunológica na infecção pelo Staphylococcus aureus

Após transpor as barreiras físicas do organismo, tais como pele e mucosas, o *S. aureus* enfrenta a resposta microbicida dos fagócitos e do sistema complemento, além da imunidade específica. A infecção por *S. aureus* estimula uma resposta inflamatória acentuada envolvendo a migração de neutrófilos e macrófagos para o sítio da infecção. Estas células tentam internalizar e destruir estas bactérias com o auxílio de anticorpos e componentes do sistema complemento presentes no soro (COELHO-CASTELO *et al.*, 2009).

A resposta imune contra *S. aureus*, mediada por linfócitos B, envolve a produção de anticorpos específicos contra diversos fatores bacterianos (NIZET, 2007). A resposta imune mediada por linfócitos T envolve, linfócitos Th1, 2 e 17. Os linfócitos Th1 promovem respostas imunitárias mediadas por células (macrófagos), os Th2 respostas imunitárias mediadas por anticorpos, e os Th17 recrutam neutrófilos e formam abcessos (CRUVIEL *et al.*, 2010). Admite-se que infecção por *S. aureus* pode constituir fator de amplificação da reação alérgica. As enterotoxinas, que funcionam como superantígenos, estimulam os linfócitos Th2, com intensa produção de imunoglobulina E (IgE). A produção de IgE antiestafilococo induziria liberação de histamina que atuaria reduzindo o poder microbicida dos fagócitos (MARIANO *et al.*, 2007).

A fim de conseguir estabelecer uma infecção, *Staphylococcus aureus* tem desenvolvido vários mecanismos para resistir ao sistema imunológico. Estes fatores de

virulência são coordenadamente expressos durante os diferentes estágios da infecção. Os principais mecanismos de evasão descritos incluem: inibição de quimiotaxia de neutrófilos, liberação de toxinas, resistência à fagocitose, inativação do sistema complemento, liberação de moléculas imunossupressoras e mecanismos de resistência ao tratamento antimicrobiano (CARVALHO, BEREZIN, MIMICA, 2012; NIZET, 2007).

2.14 Resistência bacteriana

O desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos por diversos patógenos representa um grave problema à terapêutica. O perfil dos micro-organismos nosocomiais tem mudado com o passar dos anos, por causa da pressão seletiva do uso e abuso dos antibióticos. Fatores de risco para a aquisição de organismos resistentes incluem hospitalização prolongada e tratamento prévio com antibióticos (QIANG *et al.*, 2014).

No início da década de 1940, antes da introdução do primeiro antimicrobiano no tratamento das infecções ocasionadas por *Staphylococcus aureus*, a mortalidade dos pacientes infectados por esta bactéria atingiu aproximadamente 80%. A elevada mortalidade relacionada a infecções por *S. aureus* diminuiu apenas após o ingresso da penicilina no tratamento de infecções estafilocócicas. Entretanto, no final dos anos 40 surgiu a resistência à penicilina e cepas multirresistentes. A responsável pela resistência do *S. aureus* à penicilina é uma β-lactamase (penicilinase), enzima que hidrolisa o anel β-lactâmico presente na estrutura deste antibiótico (MATOUSKOVA, JANOUT 2008).

Os antibióticos β-lactâmicos são agentes antimicrobianos mais utilizados em todo mundo, dada a sua fraca toxicidade, características farmacocinéticas e atividade antimicrobiana. Na sua estrutura molecular, estes antibióticos possuem em comum o anel β-lactâmico e agem ligando-se a uma proteína transpeptidase presente na membrana celular dos *S. aureus*, chamada proteína de ligação à penicilina (PBP), que regula os estágios finais da biossíntese de peptideoglicanos da parede celular. Desta forma, comprometem a síntese da parede celular tornando inviável a sobrevivência bacteriana (MURPHY, WASLSHE, DEVOCELLE, 2008).

Apenas na década de 1960, ocorreu redução da incidência de *S. aureus* resistentes a penicilinas com o desenvolvimento da primeira penicilina semi-sintética resistente a penicilinase, a meticilina (quimicamente designada de 2,6-dimetoxifenilpenicilina) (REMONATTO *et al.*, 2007). Entretanto, seis meses após a sua introdução, surgiram os

primeiros isolados de *S. aureus* resistente a meticilina, cujo padrão de resistência estende-se a outros antibióticos beta-lactâmicos. Este tipo de resistência é consequência da expressão da proteína de ligação a penicilina subtipo 2a (PBP2a), a qual foi adquirida de outras espécies (MATOUSKOVA, JANOUT, 2008).

O MRSA tornou-se um problema internacional, estas cepas disseminaram-se por hospitais em todo o mundo, causando bacteremia, pneumonia, infecções de sítio cirúrgico e outras infecções nosocomiais. Infecções ocasionadas por MRSA representam uma preocupação tanto para o paciente como para os sistemas de saúde, devido a sua associação com alta morbidade, mortalidade e custos hospitalares (QIANG *et al*., 2014).

A resistência à meticilina pelo *Staphylococcus aureus* é determinada pelo gene mecA, o qual é carreado por um elemento móvel o cassete cromossômico mec (SCCmec) tipos I a VII. Os SCCmec tipos I, II e III estão presentes na maioria dos isolados hospitalares (HA-MRSA). Cepas de MRSA da comunidade (CA-MRSA) estão normalmente associadas ao SCCmec tipo IV e, menos frequentemente, aos tipos V e VII. Apesar do SCCmec tipo IV estar associado predominantemente ao CA-MRSA, existe o denominado clone pediátrico do MRSA, causador de infecções hospitalares. As cepas carreadoras de SCCmecIV produzem a toxina PVL, com exceção dos isolados pertencentes ao clone pediátrico (PEREZ, AZEVEDO, 2008).

Devido a pressões seletivas, existem diferenças entre isolados de HA-MRSA e CA-MRSA, como perfil de sensibilidade a antibióticos, patogênese, epidemiologia e manifestações clínicas. Os CA-MRSA apresentam maior sensibilidade aos antibióticos não β-lactâmicos quando comparados com isolados de HA-MRSA, normalmente multirresistentes (MILLER, KAPLAN, 2009). O espectro clínico das infecções por MRSA na comunidade são similares ao das infecções por MSSA, incluindo colonização assintomática, infecção de pele e tecidos moles e, com menor frequência, infecções invasivas (QIANG *et al*., 2014).

As manifestações clínicas mais comuns de CA-MRSA entre crianças e adultos são infecções de pele e tecidos moles, como abscessos, furúnculos e foliculites. Entretanto, em alguns casos, os processos infecciosos por CA-MRSA estão associado a infecções necrosantes pulmonares graves, como pneumonia necrosante e osteomielite hematogênica aguda. A α-hemolisina estafilocócica é um fator essencial de virulência em modelos de pneumonia necrosante por CA-MRSA em ratos. Estes quadros infecciosos estão associados a altas taxas de mortalidade, mesmo em pacientes previamente saudáveis (CRAVEN *et al.*, 2009).

Em decorrência do caráter endêmico do MRSA, inúmeras medidas de controle surgiram para tentar prevenir o desenvolvimento de estirpes resistentes de *S. aureus*, bem como reduzir a sua transmissão nosocomial. As recomendações variam desde as mais minimalistas e direcionadas (exceto na presença de um surto), até sistemas altamente elaborados envolvendo serviços para isolamento dos doentes, rastreios na admissão, exames periódicos nos profissionais, isolamento estrito, intervenções agressivas de descontaminação do ambiente e tentativas de descolonização de doentes e profissionais (FRANÇA *et al*., 2009; QIANG *et al.*, 2014).

Nos hospitais brasileiros, estima-se que isolados de MRSA sejam responsáveis por aproximadamente 37% das infecções por *S. aureus* (PEREZ, D'ÁZEVEDO, 2008). Segundo Ferreira *et al.* (2009), pacientes infectados com *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina possuem probabilidade de desfecho fatal até cinco vezes maior do que os não infectados. A desnutrição tem sido descrita como um dos principais fatores de risco de mortalidade na infecção com *S. aureus* resistentes a meticilina. É cada vez mais frequente o encontro do MRSA em aspirados traqueais e pulmonares de crianças desnutridas com pneumonia (FRANÇA *et al.,* 2009).

2.15 Desnutrição

Apesar do crescente interesse nos problemas nutricionais relacionados ao excesso de peso, a desnutrição infantil ainda é prevalente em diversos países. Associada à pobreza e às desigualdades sociais, é um fator expressivo de mortalidade de crianças nos países em desenvolvimento, a despeito dos esforços realizados nas últimas décadas para reduzir sua incidência (MACEDO *et al.*, 2010).

A desnutrição materno-infantil é uma das principais causas responsáveis pelo elevado índice de mortalidade infantil ainda registrado no nosso país. As crianças desnutridas apresentam deficiências no seu sistema imunológico e maior susceptibilidade a infecções. Pesquisas indicam que a dieta materna durante a gestação, bem como a nutrição peri-natal inadequada, podem afetar a organogênese e consequentemente, a função orgânica na maturidade (COSTA *et al.,* 2012; PEREIRA *et al.*, 2009).

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*,

1993). Durante estes estágios críticos, o sistema imune fica mais propenso a injúrias ambientais em razão dos processos implicados no seu desenvolvimento que ocorrem com muita rapidez (ROBINSON, FALL, 2012). Agressões ambientais precoces podem acarretar efeitos permanentes sobre estruturas e funções de sistemas orgânicos com repercussão na vida adulta (PALMER, 2011).

A desnutrição protéico-energética provoca uma deficiência de calorias e aminoácidos, essenciais na síntese de DNA e RNA, na produção de proteínas e enzimas. Dependendo da intensidade e da duração das alterações nutricionais, as consequências terão impacto maior ou menor sobre todo o organismo no futuro (SCHAIBLE, KAUFMANN, 2007). Desta forma, os efeitos da desnutrição são mais intensos e permanentes quanto mais precoce ocorrer a agressão (COSTA *et al.*, 2012). Em ratos, a dieta hipoprotéica (8% de caseína) no período neonatal parece provocar *déficits* no desenvolvimento do cérebro e dos rins, além de alterações morfológicas e funcionais no coração, músculo esquelético e nas células do sistema imunológico (PEREIRA *et al.*, 2009; MORAIS *et al.*, 2013).

Reduções seletivas de macro ou micronutrientes fazem correlação com a expressão de genes, o que induz mudanças no genótipo e consequente fenótipo. Este fato pode indicar bases subjacentes de mudanças no padrão fisiológico do indivíduo em resposta ao ambiente pós-natal (JONES; BERKLEY; WARNER, 2010). Ausência de nutrientes essenciais predispõe o indivíduo a uma cascata de reações adversas, eventos metabólicos que comprometem a capacidade do corpo de se adaptar, recuperar e sobreviver. O mecanismo associado a estes eventos é chamado de plasticidade fenotípica (PEREIRA *et al.*, 2009).

O termo “plasticidade fenotípica” refere-se à capacidade de mudança do fenótipo em resposta às alterações ambientais durante períodos críticos do desenvolvimento e às repercussões na vida adulta. A hipótese da plasticidade fenotípica, inicialmente chamada de “programação”, propõe que o risco de desenvolver uma doença é consequência da transição de um ambiente uterino ou pós-uterino adverso para um ambiente enriquecido. Dentre as inúmeras hipóteses elaboradas para explicar o mecanismo da programação, destaca-se a hipótese de fenótipo protetor de Hales e Baker (1992). Segundo estes autores, condição nutricional deficiente na vida precoce programa o fenótipo na vida adulta, de maneira que é benéfica para sobreviver sobre condições nutricionais pobres, em contrapartida, é prejudicial, quando a nutrição é abundante (PEREIRA *et al.*, 2009).

2.16 Desnutrição e imunidade

A desnutrição energético-proteica é definida como uma condição patológica resultante da baixa ingestão de macro e micronutrientes. A associação da desnutrição a infecções acomete frequentemente crianças menores de cinco anos. O êxito da resposta imune requer a participação e a coordenação de células não-específicas e específicas, que podem ser comprometidas pelo equilíbrio nutricional do microambiente (MACEDO *et al.*, 2010).

Os efeitos da deficiência de nutrientes sobre a resposta imune dependem da magnitude, duração e do período do agravo. Em humanos, eventos importantes para 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 (ROBINSON, FALL, 2012). Durante a vida fetal e a infância, quando se inicia a fase de desenvolvimento do sistema imune, há maior vulnerabilidade. Ao nascimento, o sistema imune é imaturo e seu desenvolvimento está diretamente relacionado aos nutrientes (SILVA *et al.*, 2007).

As alterações imunológicas resultantes da desnutrição afetam tanto a imunidade inata quanto a específica. A função das barreiras físicas epiteliais e mucosa, a primeira linha de defesa do hospedeiro é ineficiente, favorecendo a entrada de patógenos e inflamação sistêmica. Na mucosa intestinal é observada achatamento, hipotrofia das vilosidades, redução no número de linfócitos presentes nas placas de *Peyer* e redução na secreção de imunoglobulina A (IgA) (JONES; BERKLEY; WARNER, 2010).

A interação desnutrição neonatal e imunidade inata está associada a um déficit da resposta microbicida dos fagócitos. Melo *et al.* (2008) observaram comprometimento na defesa oxidante (produção de superóxido e o óxido nítrico) e antioxidante (enzima superóxido dismutase) de ratos adultos submetidos à desnutrição no período neonatal em relação ao grupo controle, mesmo após a recuperação nutricional.

A desnutrição proteica grave está claramente associada com atrofia dos órgãos linfoides primários (medula óssea e timo) em recém-nascidos e crianças até dois anos. A consequência imediata desta atrofia é a anemia, leucopenia, baixa relação CD4/CD8, aumento no número de células T imaturas no sangue periférico e desenvolvimento comprometido dos órgãos linfoides periféricos (JONES, BERKLEY, WARNER, 2010). O déficit proteico, energético ou ambos, determinam imunossupressão mais acentuada na resposta imune celular do que na humoral (WINTERGERST, MAGGINI, HORNIG, 2007).

Longos períodos de privação alimentar culminam em grande mobilização de aminoácidos que são utilizados na síntese de DNA, RNA, na produção de proteínas de fase aguda e de energia (gliconeogênese), agravando ainda mais o estado de desnutrição (SAKER, 2006). No sistema imune, pelo fato das células não-específicas e específicas apresentarem alta proliferação, os micronutrientes desempenham papel fundamental no processo de transcrição, tradução e replicação do DNA. Déficit de determinados nutrientes pode favorecer a morte de fagócitos. Os íons zinco e o cobre participam da estrutura da enzima SOD. Na desnutrição, observa-se atividade reduzida da SOD pela deficiência desses minerais, o que pode induzir excesso da produção de radicais livres, ocasionando danos no DNA nuclear e mitocondrial, na membrana lipídica celular e nas proteínas intracelulares, culminando com a morte celular (MACEDO *et al.*, 2010).

Apesar da existência de muitos estudos que analisam a associação entre a desnutrição e seus efeitos no sistema imune, são escassos os que investigam as repercussões tardias da desnutrição no início da vida sobre a resposta microbicida. A maioria das pesquisas relatadas é realizada em desnutridos sem infecção, uma vez que a infecção por si só pode levar a alterações na resposta imune. Em virtude disto, ainda existem muitas lacunas a serem esclarecidas sobre a estrutura e o desempenho dos componentes da defesa imune durante infecção por cepas patogênicas, como MSSA e MRSA, em organismos adultos que sofreram agressões ambientais precoces.

3 HIPÓTESES

A desnutrição neonatal induz alterações na expressão dos receptores de reconhecimento padrão (TLR-2, TLR-4, NLRP3), das enzimas (iNOS, caspase-1) na ativação e na viabilidade dos macrófagos alveolares frente ao *Staphylococcus aureus* meticilina sensível e meticilina resistente.

O perfil de mediadores pró-inflamatórios liberados pelos macrófagos alveolares infectados *in vitro* com *Staphylococcus aureus* meticilina resistente são reduzidos quando comparados à infecção por *Staphylococcus aureus* sensível.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Verificar o efeito da desnutrição neonatal seguida de reposição nutricional sobre a expressão dos receptores de reconhecimento padrão (TLR-2, TLR-4 e NLRP3), ativação e viabilidade dos macrófagos alveolares infectados, *in vitro*, com *Staphylococcus aureus* meticilina sensível e meticilina resistente.

4.2 Objetivos Específicos

Comparar, quantitativamente, em ratos submetidos ou não a desnutrição neonatal seguida de reposição nutricional a resposta à infecção *in vitro* dos macrófagos alveolares com MSSA e MRSA, através dos seguintes parâmetros:

1. expressão do TLR-2, TLR-4 e NLRP3;
2. expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida e da caspase-1;
3. produção de radicais livres (superóxido e o óxido nítrico);
4. níveis de IL-1β e IL-18;
5. viabilidade de macrófagos alveolares.

5 METODOLOGIA

5.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo experimental, a fim de avaliar o efeito da desnutrição neonatal seguida de reposição nutricional sobre a expressão dos receptores de reconhecimento padrão (TLR-2, TLR-4, NLRP3), das enzimas (iNOS, caspase-1), ativação e viabilidade dos macrófagos alveolares infectados, *in vitro*, *Staphylococcus aureus* meticilina sensível e meticilina resistente. A escolha deste desenho metodológico foi determinada pela grande comparabilidade entre os grupos em termos de variáveis de confundimento e facilidade na formação do grupo controle.

5.2 Animais, Estado Nutricional e Peso Corporal

Foram utilizados 48 ratos machos, albinos, da linhagem *Wistar*, provenientes do biotério 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 22±1^{o}C, em ciclo claro/escuro, com 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 (HARKNESS, 1993). O diagnóstico da prenhez foi realizado pela observação do crescimento do ventre. Um dia após o nascimento, a ninhada foi padronizada em seis filhotes machos por mãe (Figura 11). Este número parece conferir maior potencial lactotrófico (FISHBECK, RASMUSSEN, 1987). Neste mesmo dia, adotado como primeiro dia de vida do animal, as ninhadas foram divididas em dois grupos:

1) **Nutrido (N) -** constituído por filhotes amamentados por mães submetidas à dieta contendo 17% de proteína à base de caseína utilizada como fonte protéica (Tabela 1);
2) **Desnutrido (D) -** constituído por filhotes amamentados por mães submetidas à dieta contendo 8% de proteína à base de caseína utilizada como fonte protéica (Tabela 1).

Os animais dos dois grupos foram amamentados durante os primeiros 21 dias após o nascimento - período de aleitamento (HARKNESS, 1993). Neste período foram registrados diariamente (em balança eletrônica digital – Marte, modelo S-4000-com sensibilidade de

0,1g) os pesos corporais de cada animal, a fim de acompanhar o peso corporal durante a manipulação nutricional.

Figura 11: Rato macho *Wistar*, primeiro dia de vida. Fonte: Arquivo pessoal.

A partir do 22º dia de vida até o final do experimento, o peso corporal foi aferido duas vezes por semana, com o intuito de acompanhar a recuperação nutricional dos animais (Apêndice 1). Após o desmame, os animais foram separados de suas mães, mantidos em gaiolas coletivas contendo três ratos em cada gaiola, e passaram a consumir Labina ®, dieta padrão do biotério (Tabela 2).

Tabela 1: Composição da dieta Caseína a 8% e a 17%, utilizada na alimentação das ratas no período de aleitamento materno.

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.

Tabela 2: Composição da dieta padrão Labina® utilizada na alimentação dos ratos, após o período neonatal, para reposição nutricional.

Enriquecimento		**Enriquecimento**		**Níveis de garantia (%)**	
Vitamina A	20000UI	**Piridoxina**	6mg	**Umidade (máx)**	13
Vitamina D3	6000UI	**Biotina**	0,1mg	**Proteína (min)**	23
Vitamina E	30UI	**Colina**	2000mg	**Extrato Etéreo**	2,5
Vitamina K	6mg	**Manganês**	50mg	**Matéria Fibrosa (máx)**	9,0
Vitamina B2	10mg	**Iodo**	2mg	**Matéria Mineral (máx)**	8,0
Vitamina B2	8mg	**Ferro**	65mg	**Cálcio (máx)**	1.8
Pantetonato de Cálcio	24 mg	**Zinco**	35mg	**Fósforo (min)**	0,0
Niacina	95mg	**Cobre**	26mg		
Tiamina	4mg	**Antioxidante**	100mg		
Ácido Fólico	0,5mg				

Fonte: Agribrands do Brasil Ltda.

5.3 Cepas de Staphylococcus aureus

Foram utilizadas as cepas *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (ATCC 33591-*American Type Culture Collection*) e *S. aureus* metilicina sensível (ATCC 29213) pelo seu perfil distinto de resistência e por sua importância em termos de saúde pública (Tabela 3). 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 TSB (*Tryptic Soy Broth*) adicionado a 20% de glicerol e a uma temperatura de -20°C até a sua utilização.

Tabela 3: Características das cepas *Staphylococcus aureus* meticilina sensível e meticilina resistente.

Número ATCC®	**33591™**
Organismo	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach
Isolamento	Não informado

Nível de Biossegurança	2
Condições de crescimento	Ágar ou Caldo Nutriente, Temperatura: 37.0°C
Comentários	Resistente à Meticilina
Aplicação	Micro-organismo para testes de formulações para lavagem de mãos
Número ATCC®	**29213™**
Organismo	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* 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

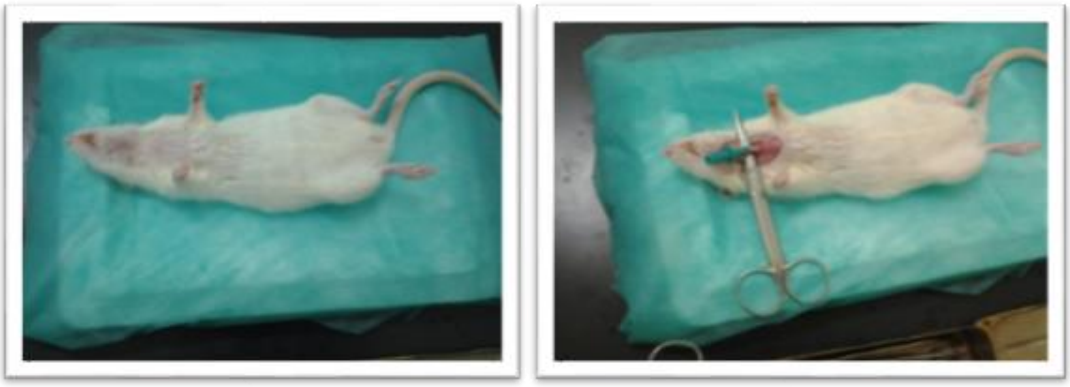
Vinte e quatro horas antes de cada experimento, as cepas foram semeadas em placas de Ágar Sangue (ágar suplementado com sangue de carneiro à 5%) e incubadas em estufa a 37ºC. No início do ensaio, algumas colônias foram transferidas para tubos contendo PBS (Phosphate Buffer Saline), de forma a obter, com auxílio de espectrofotômetro a 570nm, uma turbidez de 0,15nm. Segundo Lu e McEwan (2007) esta absorbância corresponde à concentração de 106 UFC/mL de PBS (Figura 12).

Figura 12: Colônias de *Staphylococcus aureus* em Ágar Sangue e padronização do inoculo bacteriano. Fonte: Arquivo pessoal.

5.4 Lavado Broncoalveolar

O lavado broncoalveolar (LBA) foi obtido de acordo com a técnica utilizada por De Castro *et al.* (1995). Sob efeito do anestésico, uretana 12,5% na proporção de 8mL/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, realizou-se assepsia do animal com álcool etílico a 70%. Em seguida, retiraram-se os pêlos e a pele na porção média do pescoço, abrindo e afastando as camadas musculares até obter acesso à traquéia. Utilizando uma pequena pinça, isolou-se a traquéia e foi realizado um pequeno orifício entre dois anéis traqueais na porção ventral da mesma. Na sequência, foi inserida uma cânula plástica acoplada a seringa contendo 5mL de solução de NaCl a 0,9% (soro fisiológico), à temperatura ambiente (Figura 13).

Figura 13: Anestesia e procedimento cirúrgico de traqueostomia nos ratos adultos (90-120 dias) para obtenção do lavado broncoalveolar. Fonte: Arquivo pessoal.



Várias alíquotas de soro fisiológico foram injetadas e imediatamente coletadas. O LBA recolhido foi depositado em tubo de centrífuga, tipo Falcon de 50mL. O procedimento de coleta do material foi realizado até obter cerca de 50mL do LBA. O LBA foi armazenado em banho de gelo e ao abrigo da luz, até o início da etapa seguinte (Figura 14).

Figura 14: Coleta do lavado broncoalveolar. Fonte: Arquivo pessoal.

5.5 Cultura de Macrófagos Alveolares

As amostras do LBA foram centrifugadas a 268g, por 15min. O precipitado que corresponde às células foi ressuspendido em RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) contendo 3% de soro bovino fetal. A contagem das células mononucleares foi realizada na câmara de Neubauer após diluição de 1:10 da suspensão de células com o corante Azul Tripan a 0,05% (Figura 15). O Azul Tripan é um corante vital utilizado para avaliar a viabilidade e ao mesmo tempo promover a contagem das células.

Figura 15: Centrifugação, ressuspenção e contagem dos macrófagos em câmara de Neubauer. Fonte: Arquivo pessoal.

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 de incubação a 37°C e 5% CO_2, desprezou-se o sobrenadante com as células não

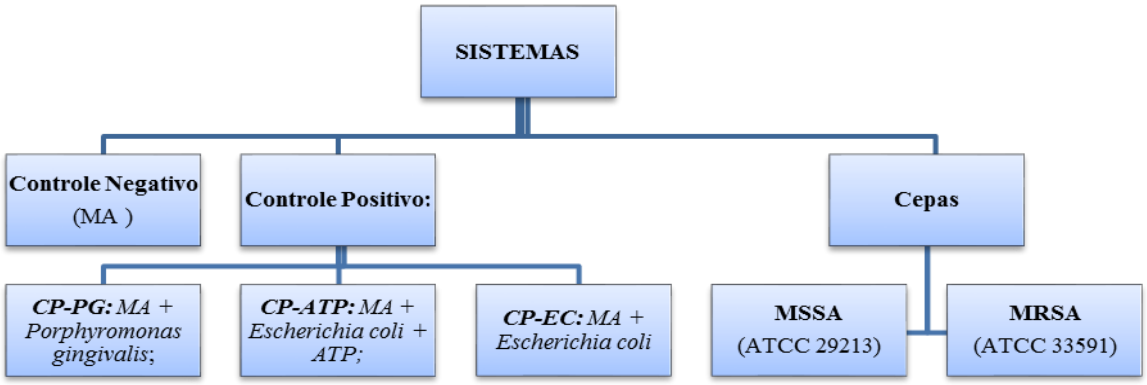
aderentes e adicionou-se RPMI. As culturas de células foram incubadas sob as condições anteriores para estabilização das células (Figura 16).

Figura 16: Placa de cultura tipo Falcon e incubadas a 37°C e 5% CO_2. Fonte: Arquivo pessoal.

5.6 Sistemas

Foram estabelecidos quatro sistemas: controle negativo (C), contendo apenas macrófagos alveolares; controle positivo para TLR-2 (CP-PG): macrófagos mais 10µL de lipopolissacarídeo (10µg/mL) do sorotipo da bactéria *Porphyromonas gingivalis*; controle positivo para NLRP3 e caspase-1 (CP-ATP): macrófagos mais 10µL de lipopolissacarídeo (10µg/mL) do sorotipo de *Escherichia coli* por 2 horas e posteriormente, com ATP (5mM) por 30 minutos; controle positivo para TLR-4, iNOS, NO e viabilidade de macrófagos (CP-EC): macrófagos mais 10µL de lipopolissacarídeo do sorotipo de *Escherichia coli*; MSSA, macrófagos mais 100µL de inoculo bacteriano referente à cepa sensível (ATCC 29213) e MRSA, macrófagos mais 100µL de inoculo bacteriano da cepa resistente (ATCC 33591). As placas foram incubadas por 24horas, à 37ºC, com atmosfera úmida e 5% de CO_2 (De CASTRO *et al.*, 1995) (Figura 17).

Figura 17: Organograma geral da distribuição dos sistemas.



5.7 Análise da produção do ânion superóxido (O_2^-)

O ânion superóxido foi detectado pela sua habilidade em reduzir quimicamente um composto aceptor de elétrons. Para isso foi utilizado o ferrocitocromo C (30 mg/mL em HBSS, 2.4x 10^{-3} M, ferrocitocromo c de mitocôndria de cavalo, tipo VI, SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO), porém este não é específico para a redução apenas do superóxido sendo necessário a utilização de uma enzima específica, a superóxido dismutase (enzima superóxido dismutase de eritrócitos bovinos, SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO). Imediatamente após a confecção dos sistemas e adição do citocromo, amostras de 100µL foram retiradas de cada sistema. A 1ª alíquota recolhida correspondeu ao tempo "zero" de cada sistema e as amostras subsequentes foram coletadas em intervalos regulares de tempo, equivalentes à 1h, 2h e 24h de incubação. A leitura foi realizada no leitor de ELISA (BIO-RAD, Model 680), utilizando-se comprimento de onda de 550nm. Os resultados foram obtidos através da fórmula $[O_2^-] = 205,49 \times Abs \times V$.

5.8 Produção de Óxido Nítrico por Macrófagos Alveolares

A produção de NO foi determinada a partir da concentração de nitrito no sobrenadante das culturas celulares (IMANISHI *et al.*, 2005). Foram retirados 100µL do sobrenadante das culturas após 24 horas de incubação dos sistemas. Para a quantificação de nitritos, foram acrescentados 50µL do reagente de Griess (1,5% de sulfanilamida em 5% de H_3PO_4, 0,1% em H_20 de naftiletilene diamine diidrocloride) aos sobrenadantes. Após repouso de 15 minutos à temperatura ambiente, foi realizada leitura no espectrofotômetro de microplaca (BIO-RAD,

Model 680), com filtro de 550nm. A concentração de nitrito foi calculada através de valores médios de uma curva padrão de $NaNO_2$ e os dados expressos em μM de nitrito/mL (Tabela 4).

Tabela 4: Curva Padrão de $NaNO_2$.

Concentração de $NaNO_2$
$0,5x10^{-6}$ μM
$1x10^{-6}$ μM
$2x10^{-6}$μM
$10x10^{-6}$ μM
$25x10^{-6}$ μM
$50x10^{-6}$ μM
$75x10^{-6}$ μM

5.9 Quantificação da IL-1β e Il-18

As dosagens da IL-1β e IL-18 foram realizadas através do teste imunoenzimático ELISA, utilizando kit Quantikine® m, seguindo as orientações do fabricante.

5.10 Obtenção dos macrófagos aderidos na placa de cultura celular

Após 24 horas de incubação das culturas de células, foram adicionados 500 μL de Versene (1x Gibco by life Technologies 15040) e 1mL de PBS. As placas foram incubadas à 37ºC, por 30 minutos, com atmosfera úmida e 5% de CO_2. Posteriormente, foi adicionado 1mL de PBS e cada poço da placa foi submetido a utilização do "scrape", com a finalidade de destacar as células aderidas. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 1077g, por 5 minutos. Para as análises da viabilidade celular, o *pellet* de células foi ressuspendido com 1mL de PBS, para as análises por biologia molecular, foi adicionado 800μL de Trizol e armazenado a -80°C.

5.11 Extração de RNA dos macrófagos congelados em Trizol

Em cada amostra, foi adicionado 200μL de clorofórmio, incubado por 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugado a 11725g, por 10 minutos. O sobrenadante contendo RNA (fase aquosa) foi transferido para novos tubos e precipitado ao adicionar 500μL de isopropanol. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 10 minutos e posteriormente, centrifugado utilizando as mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado, adicionou-se 1mL de álcool 70% e centrifugado a 8848g, por 5 minutos. O *pellet* de RNA foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente e

ressuspendido com 30µL em água livre de RNAse (DEPC). O RNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop™ (ThermoScientific, Waltham, Massachusetts), no comprimento de onda de 260nm e 280nm e armazenado a -80ºC.

5.12 Ensaios de transcrição reversa

O RNA total foi convertido em cDNA (DNA complementar) utilizando o kit QuantiTect® Reverse Transcription, através do termociclador automático *Eppendorf mastercycler gradient*. As condições de ciclagem utilizadas foram: 42ºC por 30min e 96ºC por 3min. A primeira etapa consiste na eliminação do DNA genômico, em seguida a transcrição com a utilização de *primers* randômicos.

5.13 Primers

Com o auxílio do software *Primer Express* (Applied Biosystems, versão 2.0), foram desenhados *primers* para detecção dos receptores TLR-2, TLR-4, NLRP3 e da enzima iNOS (Tabela 5). Os *primers* da enzima caspase-1 foram obtidos no estudo de Chiba *et al*. (2012).

Tabela 5: Característica dos *primers* desenhados para análise da expressão gênica dos receptores TLR-2, TLR-4, NLRP3 e da enzima iNOS, em ensaios de PCR tempo real.

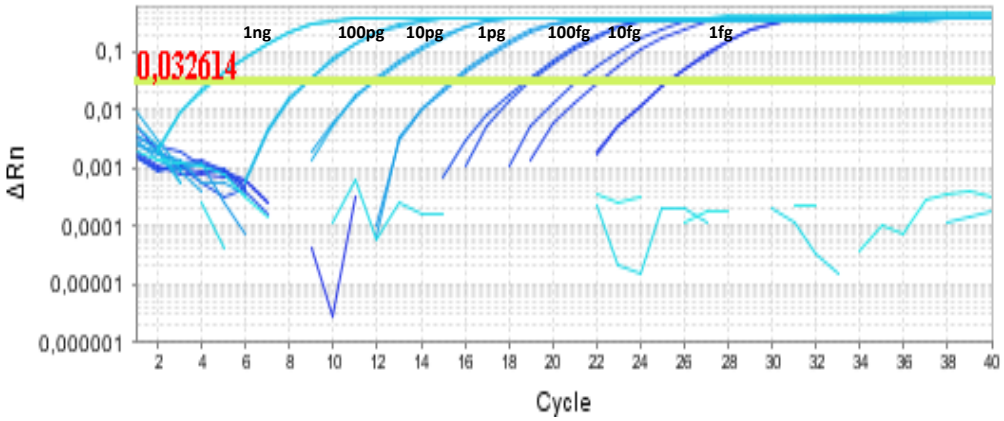
Número de acesso no GenBank	Identificação	Sequência	Tamanho (pb)	%CG	T*m*° *C*
NM_198769.2	TLR-2F	5'CACCTCAATGGGGTTGGTAA 3'	21	52,38	59,92
	TLR-2R	5'ATAGAAGTGGGGATGTGCAG 3'	21	52,38	59,51
NM_019178.1	TLR-4F	5' ATTTACAGAGGGGCAACCGC 3'	20	55,00	60,68
	TLR-4R	5'TGGCATTTTCTGCAACCAGC 3'	20	50,00	59,97
NM_001191642	NLRP3F	5' TCTAGTCCAAGAGGAAAGTAAC 3'	24	45,83	60,50
	NLRP3R	5'CCTAGAAAAGACTGCTCGACTT 3'	22	45,45	57,82
AX_23004461.1	iNOF	5' GCCACAGCTTTACAGGGAGT 3'	20	55,00	59,96
	iNOSR	5'AGGCTAACAAGACCCAAGCC 3'	20	55,00	59,96

Legenda- F: senso; R: reverso; pb: pares de base; T*m*: Temperatura de *Melting*.

5.14 Avaliação da sensibilidade, eficiência e especificidade dos sistemas desenvolvidos

Para avaliação da sensibilidade (limite de detecção) foram efetuadas diluições seriadas (fator 10) de cDNA dos controles positivos, nas concentrações de 1fg a 1ng. A sensibilidade do ensaio foi definida pela amplificação da maior diluição do DNA alvo quando comparado à formação de dímeros de *primers* em amostras sem DNA (TOO, 2003) (Figura 18).

Figura 18: Curva padrão de cDNA do alvo TLR-2. Fonte: Arquivo pessoal.



A eficiência foi determinada de acordo com Too (2003), por meio da fórmula: $\varepsilon = (10^{1/slope}) -1$. Para avaliação da especificidade, foi realizada padronização das amostras alvos (cDNA dos controles positivos com seus respectivos *primers)* e amostras testes (cDNA dos controles positivos com sistemas de *primers* não específicos). A especificidade (σ) foi definida pela equação $\sigma = (1+ \varepsilon)^{\Delta Ct}$, onde ε significa a eficiência da amplificação e Δ*Ct* a diferença dos valores dos *Cts* (*Cycle Threshold* - consiste no ciclo onde o sinal de amplificação exponencial atinge uma intensidade de fluorescência superior ao limiar de detecção) da amostra definida como alvo e das amostras em teste (TOO, 2003).

5.15 Quantificação da expressão do TLR-2, TLR-4, NLRP3, iNOS e caspase-1

A expressão gênica foi obtida pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). A amplificação das amostras foi realizada através do kit QuantiFast® Syber® green PCR, no aparelho ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, CA, USA). As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial 95ºC/1s, anelamento e extensão 60ºC/1min

em 40 ciclos. O volume final de cada reação foi de 25µL, composta por 12,5µL *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, CA, USA), 8,5 µL de água, 1µL de cada *primer* (5 pmoles) e 2µL do template de DNA. As reações foram realizadas em duplicata para a quantificação de cada gene e para os controles negativos da reação (NTC - *Non template control*). As características do produto amplificado estão descritas abaixo (Tabela 6).

Tabela 6: Características do produto amplificado (amplicon) após expressão gênica dos receptores TLR-2, TLR-4, NLRP3, da enzima iNOS e caspase-1, em ensaios de PCR tempo real.

Sistema de *primers*	Tamanho do amplicon (pb)	T*m°C*
TLR-2	109	84,32
TLR-4	117	85,55
NLRP3	134	85
iNOSR	147	86,58
Caspase-1*	120	77,4

Legenda- *Pb*: pares de base; T*m*: Temperatura de *Melting;* *: Chiba *et al*. (2012).

O método utilizado para o cálculo da expressão relativa foi a curva-padrão comparativa. Para confecção da curva-padrão, foram efetuadas diluições seriadas (1:10) de cDNA, nas concentrações de 1fg a 1ng. O controle endógeno (gene de referência) utilizado foi o GAPDH (*Glyceraldehydes-3-Phosphate Dehydrogenase*), cujos sistemas de *primers* foram: GAPDHF 5'ATCTTCCAGGAGCGAGATCCC 3' e GAPDHR 5' GTGGGCAAGGTCATCCCT 3' (GONÇALVES *et al*., 2012). A expressão de mRNA dos alvos foi obtida através de duas normalizações sequenciais: pelo controle endógeno e pelo calibrador (controle negativo). A primeira normalização foi realizada da seguinte maneira: *quantity* do gene alvo/ *quantity* do gene de referência, onde *quantity* consiste nos valores absolutos em função da curva-padrão. Após a normalização do gene alvo, o RQ (quantidade relativa de mRNA) foi obtido através da normalização pelo calibrador.

5.16 Sequenciamento

O sequenciamento das amostras foi realizado no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas do Ageu Magalhães – FIOCRUZ/PE, através do kit big-Dye terminator v 3.1 e no aparelho ABI 3100 Genect Analyzer – Applied Byosistems. As sequências foram determinadas em ambas direções (usando os mesmos *primers* individualmente) e submetidas ao NCBI - BLASTn para análise de homologia com os genes em análise.

5.17 Viabilidade dos Macrófagos Alveolares

Após recuperação dos macrófagos aderidos na placa de cultura, o *pellet* celular foi ressuspendido em 1mL de PBS e centrifugado a 1077g, por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, adicionado 200µL de tampão de apoptose, homogeneizado e transferidos para tubos de citometria. Posteriormente, foram acrescentados 5µL de Anexina V-FITC, 10µL de Iodeto de propídio e 285µL tampão de apoptose. Após as marcações, as células foram analisadas no citômetro de fluxo FACScalibur (com laser de 488nm, Becton Dickinson). Para a obtenção dos dados no citômetro de fluxo, utilizou-se o software *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson, EUA) e foram realizadas as seguintes aquisições: 20 mil eventos por amostra.

5.18 Análise Estatística

Para avaliação da evolução do peso corporal foi utilizado o teste *t Student*. Em relação às outras análises, foi empregada a ANOVA, para os dados paramétricos. Quando a ANOVA revelou a existência de diferença significativa foi utilizado o teste de *Tukey*, a fim de identificar que grupos diferiram entre si. A significância foi definida para $p<0,05$. O programa estatístico empregado para as análises foi o Sigma Stat®.

5.19 Considerações Éticas

Os experimentos foram baseados nas recomendações éticas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animal*s. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) (número do protocolo: 23076.031259/2011-85) (Anexo 1).

6 EFEITO DA DESNUTRIÇÃO NEONATAL NA EXPRESSÃO DA ENZIMA ÓXIDO NITRICO SINTASE INDUZIDA, PRODUÇÃO DE RADICAIS LIVRES E VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES INFECTADOS *in vitro* COM *Staphylococcus aureus* METICILINA SENSÍVEL E METICILINA RESISTENTE

INTRODUÇÃO

Agressões ambientais em períodos vulneráveis do desenvolvimento podem promover efeitos permanentes sobre estruturas e funções de sistemas orgânicos com repercussões na vida adulta [1]. Esta vulnerabilidade está associada ao intenso processo de diferenciação e maturação das células e tecidos dos sistemas nervoso, endócrino e imune [2].

Os micronutrientes são essenciais para replicação celular, crescimento e desenvolvimento do organismo. Ausência de nutrientes essenciais predispõe o indivíduo a uma cascata de reações adversas, eventos metabólicos que comprometem a capacidade do corpo de se adaptar, recuperar e sobreviver. A intensidade e a duração das alterações nutricionais poderão induzir maior ou menor impacto sobre todo o organismo no futuro [3].

Existe uma relação dinâmica entre doença, imunidade e nutrição [4]. Dentre as consequências das deficiências nutricionais pode ser citada a diminuição da imunidade humoral e celular, da capacidade bactericida dos fagócitos, da produção de componentes do sistema complemento, do número total de linfócitos, do equilíbrio entre os subtipos de linfócitos T e dos mecanismos inespecíficos de defesa [4, 5].

Esta relação entre desnutrição e supressão de resposta imune é um importante fator de susceptibilidade as infecções. Segundo França *et al.* [6] pacientes hospitalizados e desnutridos encontram-se em situações de risco de desenvolverem infecções nosocomiais graves por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Desde a década de 60, a infecção por MRSA constitui grave problema para a saúde pública mundial por estar relacionada a altas taxas de morbidade e mortalidade [7,8]. Acredita-se que cepas MRSA possuam mecanismos distintos de virulência, que podem ser mais exacerbados quando comparados às cepas de *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA) [9].

Apesar de existirem alguns estudos *in vivo* e *in vitro* sobre a patogenicidade das cepas de MSSA e MRSA [10,11], são escassos os que avaliam a associação entre a desnutrição neonatal e a resposta microbicida frente bactérias multirresistentes. Em virtude disto o

presente trabalho tem como objetivo avaliar a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida, a produção de radicais livres e a viabilidade de macrófagos alveolares infectados *in vitro* com *Staphylococcus aureus* meticilina sensível e meticilina resistente.

MÉTODOS

Animais e Dieta. Foram utilizados 24 ratos machos, albinos, da linhagem *Wistar* (90-120 dias), provenientes da colônia do Biotério do Departamento de Nutrição, da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em temperatura controlada (22±1ºC) com ciclo fotoperiódico de claro-escuro de 12:12h e com livre acesso à água e à ração. 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 filhotes amamentados por mães submetidas à dieta contendo 17% de proteína à base de caseína utilizada como fonte proteica (n=12); Desnutrido (D) - constituído por filhotes amamentados por mães submetidas à dieta contendo 8% de proteína à base de caseína utilizada como fonte proteica (n=12), durante os primeiros 21 dias após o nascimento. Durante o período neonatal, foram registrados diariamente (em balança eletrônica digital – Marte, modelo S-4000-com sensibilidade de 0,1g) os pesos corporais de cada animal, a fim de acompanhar o peso corporal durante a manipulação nutricional. A partir do 22º dia de vida até o final do experimento, o peso corporal foi aferido três vezes por semana, com o intuito de acompanhar a recuperação nutricional dos animais. Neste período, os animais foram separados de suas mães, mantidos em gaiolas coletivas contendo três ratos em cada gaiola e receberam a Dieta Padrão do Biotério (Labina-Purina do Brasil), até a vida adulta (90-120 dias).

Cepas de *Staphylococcus aureus*. Foram utilizadas as cepas *Staphylococcus 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 bactérias 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 a 5%) e incubadas a 37ºC. No início do ensaio, algumas colônias foram transferidas para tubos contendo PBS (*Phosphate Buffer Saline*) estéril, de forma a se obter, com auxílio de espectrofotômetro a 570nm, uma turbidez de

0,15nm. Esta absorbância, segundo Morais *et al.* [12], corresponde aproximadamente à concentração de 10^6 UFC/mL de PBS.

Lavado broncoalveolar (LBA). Os animais foram anestesiados com cloralose-uretana (0,5 e 12,5% respectivamente) na proporção de 8mL/kg i.p. O LBA foi coletado com a injeção de salina a 0,9% através de uma cânula plástica inserida na traqueia. Várias alíquotas de 3mL foram injetadas e coletadas em tubos cônicos de polipropileno de 50mL (Falcon, Sigma).

Cultura de macrófagos alveolares. As amostras do LBA foram centrifugadas, a 268g, por 15min. O precipitado que corresponde às células foi ressuspendido em RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium - Gibco-Invitrogen Corporation*) contendo 3% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 100U/mL e estreptomicina 100µg/mL). As células foram transferidas para placas de cultura de 35mm de diâmetro (6 poços, Falcon) em uma proporção de 10^6 células/mL de RPMI 1640 em cada poço. Após 1h de incubação a 37°C e 5% CO_2, desprezou-se o sobrenadante com as células não-aderentes e foram adicionados 1mL de meio RPMI. As culturas de células foram incubadas sob as condições anteriores para estabilização das células.

Sistemas. Foram estabelecidos quatro sistemas: controle negativo (C), contendo apenas macrófagos alveolares; controle positivo (CP), com macrófagos mais 10µL de lipopolissacarídeo (10µg/mL) do sorotipo de *Escherichia coli*; MSSA, macrófagos mais 100µL de inoculo bacteriano referente à cepa sensível (ATCC 29213) e MRSA, macrófagos mais 100µL de inoculo bacteriano da cepa resistente (ATCC 33591). As células foram incubadas à 37ºC, com atmosfera úmida e 5% de CO_2.

Extração dos macrófagos aderidos na placa de cultura celular. A extração dos macrófagos foi realizada com a utilização do reagente Versene (1x *Gibco by life Technologies*). Para as análises da viabilidade celular, o *pellet* de células foi ressuspendido com 1mL de PBS, para as análises de biologia molecular foi adicionado 800µL de Trizol e armazenado a -80°C.

Extração de RNA (ácido ribonucleico) dos macrófagos congelados em Trizol. Em cada amostra, foi adicionado 200µL de clorofórmio, incubado por 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugado a 11725g, por 10 minutos. O sobrenadante contendo RNA (fase aquosa) foi transferido para novos tubos e precipitado ao adicionar 500 µL de isopropanol. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente, e posteriormente centrifugado utilizando as mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado, adicionado 1mL de álcool 70% e centrifugado a 8848g, por 5 minutos. O *pellet* de RNA foi incubado por 5 minutos à

temperatura ambiente e ressuspendido com 30µL em água livre de RNAse (DEPC). O RNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop™ (ThermoScientific, Waltham, Massachusetts), no comprimento de onda de 260nm e 280nm, e armazenado a -80ºC.

Transcrição reversa do RNA em cDNA. O RNA total foi convertido em cDNA utilizando o kit QuantiTect® Reverse Transcription, através do termociclador automático *Eppendorf mastercycler gradient*. As condições de ciclagem utilizadas foram: 42ºC por 30min e 96ºC por 3min.

***Primers*.** Com o auxílio do software *Primer Express* (Applied Biosystems, versão 2.0), foram desenhados *primers* para detecção da enzima iNOS. O número de acesso no *Genback* da sequência de base utilizada foi AX_23004461.1. Os *primers* desenhados foram: iNOS *forward* 5' GCCACAGCTTTACAGGGAGT 3' e iNOS *reverse* 5'AGGCTAACAAGACCCAAGCC 3'.

Avaliação da sensibilidade, eficiência e especificidade dos *primers*. Para avaliação da sensibilidade (limite de detecção) foram efetuadas diluições seriadas (fator 10) de cDNA do controle positivo da iNOS, nas concentrações de 1fg a 1ng. A sensibilidade do ensaio foi definida pela amplificação da maior diluição do DNA alvo quando comparado à formação de dímeros de *primers* em amostras sem DNA. A eficiência foi determinada por meio da fórmula:$\varepsilon = (10^{1/slope}) - 1$. Para avaliação da especificidade, foi realizada a padronização das amostras alvos (cDNA dos controles positivos com seus respectivos *primers)* e amostras testes (cDNA dos controles positivos com sistemas de *primers* não específicos). A especificidade (σ) foi definida pela equação $\sigma = (1+ \varepsilon)^{\Delta Ct}$, onde ε significa a eficiência da amplificação e ΔCt a diferença dos valores dos *Cts* (*Cycle Threshold*) da amostra definida como alvo e das amostras em teste [13]. Os resultados foram expressos em valor de *Ct*, σ e Log σ na base 10.

Quantificação da expressão da enzima iNOS. A quantificação da expressão gênica foi obtido pela técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR). A amplificação das amostras foi realizada através do kit QuantiFast® Syber® green PCR, no aparelho ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, CA, USA). As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial 95ºC/1s, anelamento e extensão 60ºC/1min em 40 ciclos. O volume final de cada reação foi de 25 µL, composta por 12,5µL *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, CA, USA), 8,5 µL de água, 1µL de cada *primer (*5 pmoles) e 2µL do template de DNA. As reações foram realizadas em duplicata para a quantificação de cada gene e para os controles negativos da

reação (NTC). O método utilizado para o cálculo da expressão relativa foi a curva-padrão comparativa. Para confecção da curva-padrão, foram efetuadas diluições seriadas (1:10) de cDNA, nas concentrações de 1fg a 1ng. O controle endógeno (gene de referência) utilizado foi o GAPDH (*Glyceraldehydes-3-Phosphate Dehydrogenase*), cujos sistemas de *primers* utilizados foram: GAPDHF 5'ATCTTCCAGGAGCGAGATCCC 3' e GAPDHR 5' GTGGGCAAGGTCATCCCT 3' [14]. A expressão de mRNA dos alvos foi obtida através de duas normalizações sequenciais: pelo controle endógeno e pelo calibrador (controle negativo). A primeira normalização foi realizada da seguinte maneira: *quantity* do gene alvo/ *quantity* do gene de referência, onde *quantity* consiste nos valores absolutos em função da curva-padrão. Após a normalização do gene alvo, o RQ (quantidade relativa de mRNA) foi obtido através da normalização pelo calibrador.

Sequenciamento da enzima iNOS. O sequenciamento das amostras foi realizado no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas do Ageu Magalhães – FIOCRUZ/PE, através do kit big-Dye terminator v 3.1 e no aparelho ABI 3100 Genect Analyzer – Applied Byosistems. As sequências foram determinadas em ambas direções (usando os mesmos *primers* individualmente) e submetidas ao NCBI - BLASTn para análise de homologia com os genes em análise.

Análises nos sobrenadantes das culturas celulares:

Produção de Óxido Nítrico (NO). A produção de NO foi determinada a partir da concentração de nitrito no sobrenadante das células em cultura [12]. Foram retirados 100µL do sobrenadante das culturas após 24 horas de incubação. Para a quantificação de nitritos e nitratos, foram acrescentados 50µL do reagente de Griess (1,5% de sulfanilamida em 5% de H_3PO_4, 0,1% em H_20 de naftiletilene diamine diidrocloride) aos sobrenadantes. Após repouso de 15 minutos à temperatura ambiente, a leitura foi realizada em leitor de ELISA (BIO-RAD, Model 680), com filtro de 550nm. A concentração de nitrito foi calculada através de valores médios de uma curva padrão de $NaNO_2$ (na faixa de $0{,}5x10^{-6}$ µM a 75x10-6 µM) e os dados expressos em µM de nitrito/mL.

Produção do ânion superóxido (O_2^-). O O_2^- foi induzido pela adição de PMA (acetato miristato de forbol - Sigma) em solução de Hanks (HBSS, Gibco-Invitrogen Corporation), na concentração de 2µg/mL. Foram preparados os sistemas de análise com avaliação em 1h, 2h e 24h de incubação. A especificidade do ensaio foi garantida pela adição de superóxido dismutase de eritrócitos bovinos (SOD-Sigma).

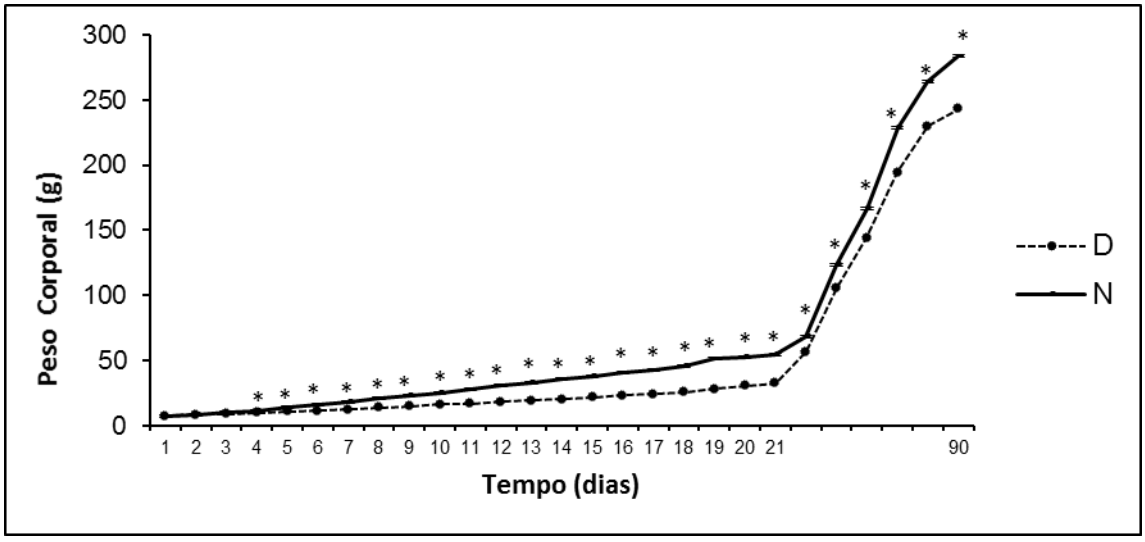
Viabilidade dos Macrófagos Alveolares. Após recuperação dos macrófagos aderidos na placa de cultura, o *pellet* celular foi ressuspendido em 1mL de PBS, e centrifugado a 1077g, por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, adicionado 200µL de tampão de apoptose, homogeneizado e transferidos para tubos de citometria. Posteriormente, foram acrescentados 5µL de Anexina V-FITC, 10µL de Iodeto de propídio e 285µL tampão de apoptose. Após as marcações, as células foram analisadas no citômetro de fluxo FACScalibur (com laser de 488nm, Becton Dickinson). Para a aquisição dos dados no citômetro de fluxo utilizou-se o software Cell Quest Pro (Becton Dickinson, EUA). Foram realizadas as seguintes aquisições: 20 mil eventos por amostra.

Análise Estatística. Para avaliação da evolução do peso corporal foi utilizado o teste t *Student*. Em relação às outras análises, foi empregada a Análise de Variância (ANOVA), para os dados paramétricos. Quando a ANOVA revelou a existência de diferença significativa foi utilizado o Teste de Tukey, a fim de identificar que grupos diferiram entre si. A significância foi definida para $p<0,05$. O programa estatístico empregado foi Sigma Stat®.

RESULTADOS

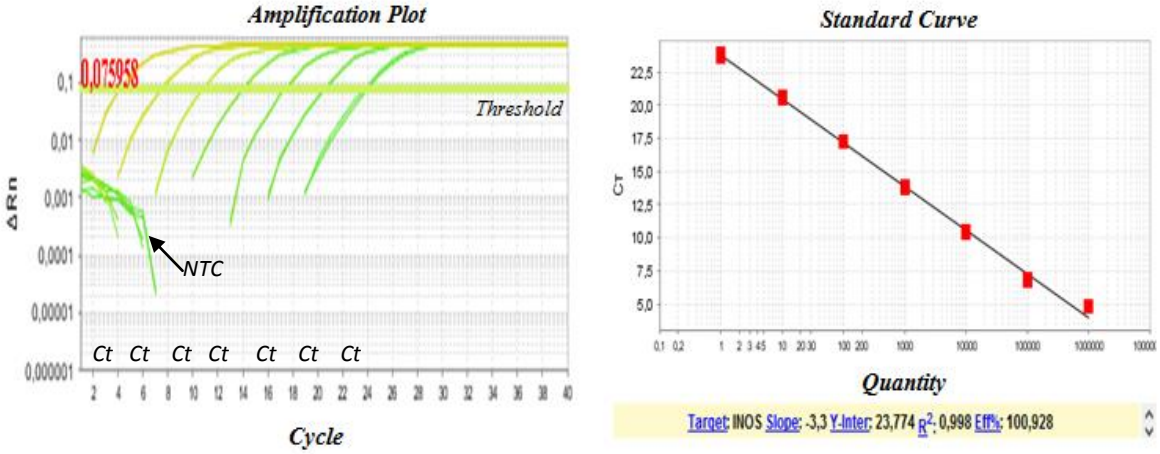
Peso corporal na desnutrição e reposição nutricional. Nos primeiros dias de vida, os pesos corporais (g) dos grupos nutridos e desnutridos foram semelhantes até o 3º dia. A partir do 4º até o 21º dia pós-natal, os valores dos pesos corporais dos animais desnutridos foram menores em relação aos dos animais nutridos ($p<0,001$). Entre o 22º e o 90º dia de vida ocorreu a reposição nutricional e os valores dos pesos do grupo desnutridos permaneceram menores quando comparados aos do grupo nutrido ($p<0,001$) (Figura 1).

Figura 1- Evolução da curva ponderal durante a desnutrição neonatal (21 dias) e reposição nutricional (23-90 dias) dos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido). Teste t de *Student*. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados peelo símbolo *



Sensibilidade, Eficiência e Especificidade do sistema de *primers*. A sensibilidade (limite de detecção) do sistema de *primers* foi de 1fg de cDNA. A eficiência da reação foi de 100% (R2= 0,998, ε = 1 e *slope*= -3,3) (Figura 2). Em relação a especificidade, o *Ct* da amostra alvo (iNOS) foi de 4,11 e as amostras testes utilizadas foram TLR-2 (*Ct*: 30,2; σ: 43969506,36), TLR-4 (*Ct*: 28,47; σ: 13254693,74) e NLRP3 (*Ct*: 25,95; σ: 2314549,522). Ao analisar o Log de σ, o sistema de *primers* é $10^{7,6}$, $10^{7,12}$ e $10^{6,3}$ vezes mais específico para o DNA alvo em relação às amostras em teste, respectivamente.

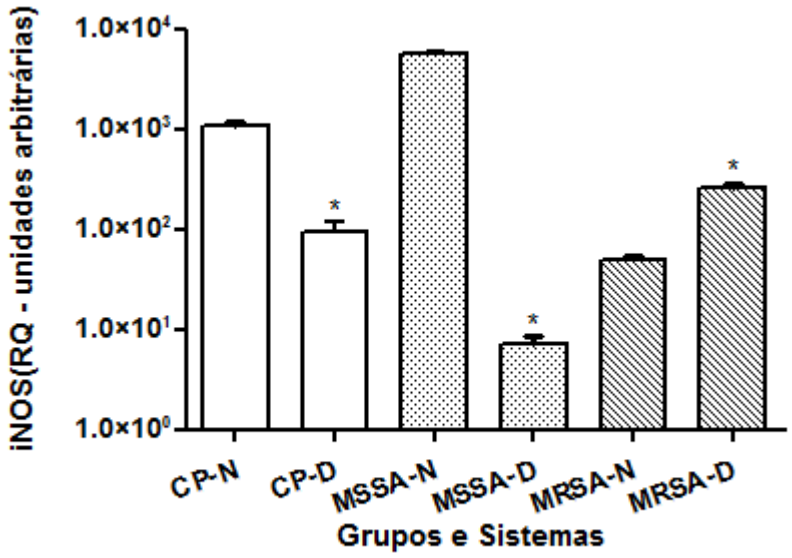
Figura 2: *Plot* das curvas de amplificação do cDNA do controle positivo da iNOS (LPS) (nas concentrações de 1fg a 1ng) e a eficiência dos sistemas de *primers*. Legenda: *Threshold* (limiar de detecção); *Ct* (*Cycle Threshold);* NTC (controle negativo da reação); *Quantity* (valores absolutos).



Sequenciamento das amostras amplificadas na qPCR. Houve 100% de homologia com a enzima iNOS de *Rattus novergicus*.

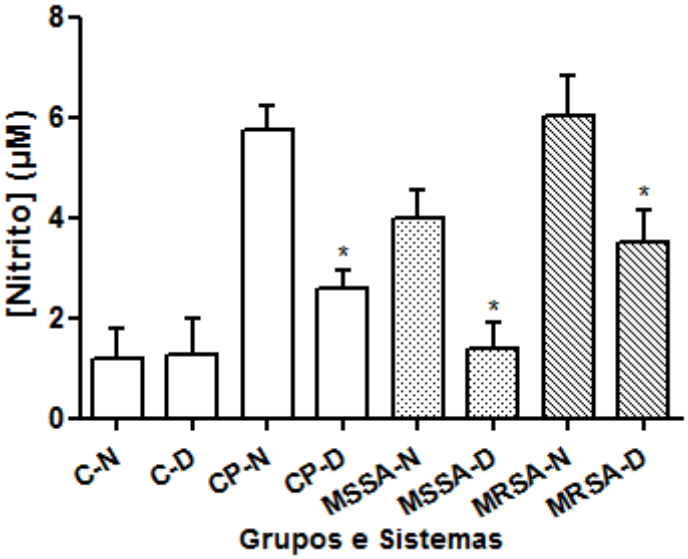
Quantificação da expressão da iNOS. O menor RQ da iNOS foi observado no grupo desnutrido quando comparado ao nutrido (CP-N: 1099,08±78,6; CP-D: 92,39±26,96; MSSA-N: 5752,31±147,73; MSSA-D: 7,12±1,59; MRSA-N: 259,93±25,34; MRSA-D: 49,16±5,65), p<0,05. Em relação aos sistemas-testes, houve maior expressão da enzima iNOS no MSSA-N, com p<0,05 (Figura 3).

Figura 3- Expressão relativa da enzima iNOS nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (C – Controle negativo, MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina). Teste ANOVA e Tukey. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados pelo símbolo *



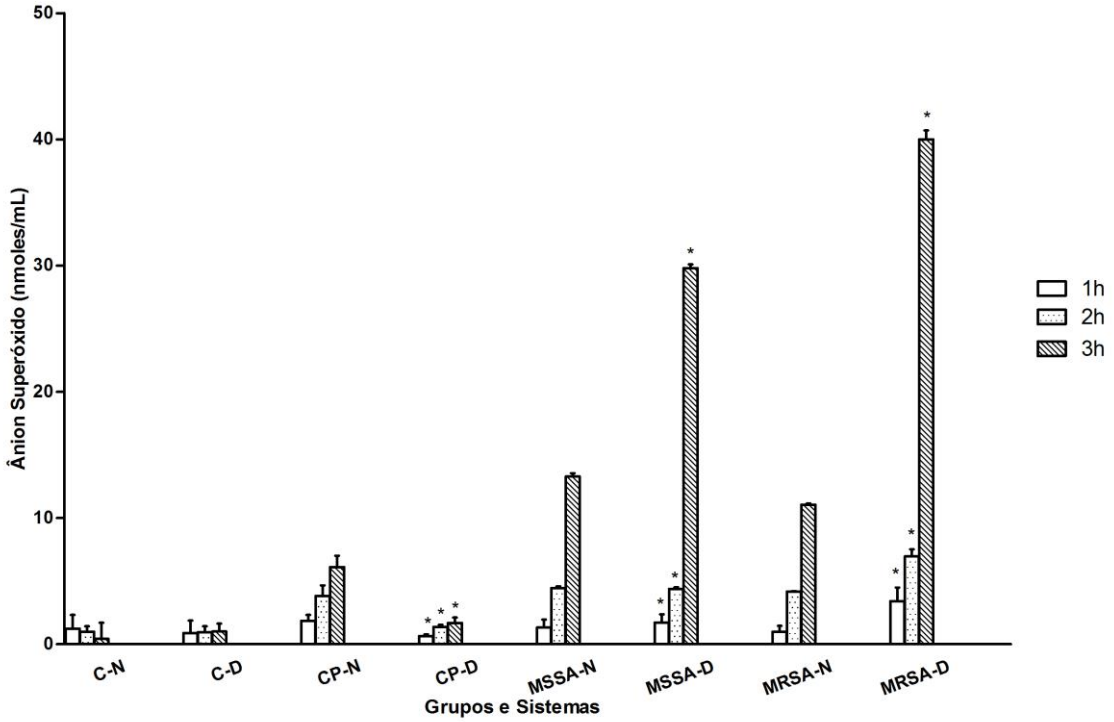
Produção do óxido nítrico. Foi detectada menor produção de óxido nítrico no grupo desnutrido quando comparado ao nutrido (C-N: 1,178±0,6µM; C-D: 1,28±0,69µM; CP-N: 5,74±0,5µM; CP-D: 2,57±0,38µM; MSSA-N: 6,02±0,53µM; MSSA-D: 1,39±0,51 µM; MRSA-N: 4,0±0,4µM; MRSA-D: 2,52±0,42µM), p<0,001. Em relação aos sistemas testes, a concentração de nitrito foi mais elevada no sobrenadante do MSSA do grupo nutrido, com p<0,05 (Figura 4).

Figura 4- Níveis de nitrito no sobrenadante das culturas dos macrófagos alveolares nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (C – Controle negativo, MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina). Teste ANOVA e Tukey. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados pelo símbolo *



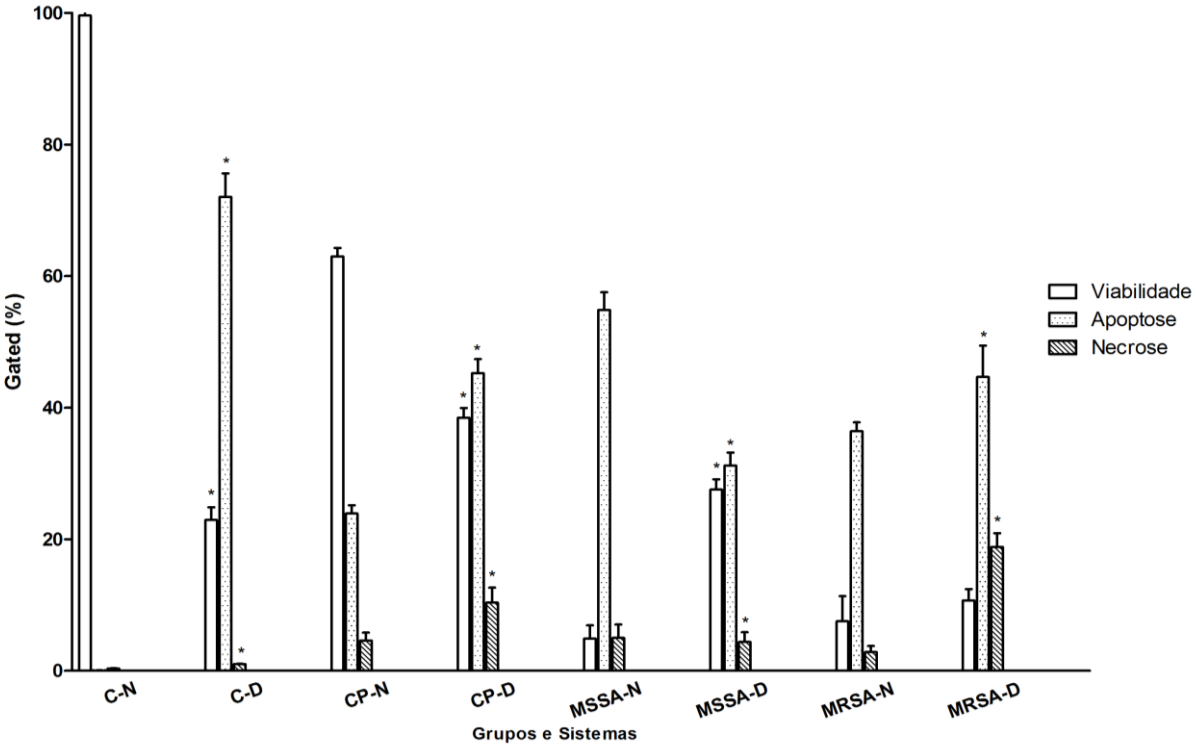
Produção do ânion superóxido. Foi observado crescimento gradativo da produção do ânion superóxido no decorrer da incubação das culturas de células, tanto no grupo nutrido como no desnutrido, $p<0,05$. A menor produção deste radical livre foi detectada no CP do grupo desnutrido ($p<0,05$). Ao analisar os sistemas-testes, foi verificado aumento da produção do ânion superóxido no grupo desnutrido em todos os tempos analisados, $p<0,001$. Houve maior produção do ânion superóxido no sistema MRSA do grupo desnutrido (CP-N_{24h}: 22,44±1,76 nmoles/mL; CP-D_{24h}: 18,10±2,1 nmoles/mL; MSSA-N_{24h}: 13,19±4,5 nmoles/mL; MSSA-D_{24h}: 29,79±3,0 nmoles/mL; MRSA-N_{24h}: 11,05±3,2 nmoles/mL; MRSA-D_{24h}: 39,99±2,6 nmoles/mL), $p<0,05$ (Figura 5).

Figura 5- Níveis de ânion superóxido no sobrenadante das culturas dos macrófagos alveolares nos grupos (grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido), nos sistemas (C – Controle negativo, MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) e nos tempos de incubação (1, 2 e 24h). Teste ANOVA e Tukey. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados pelo símbolo *



Viabilidade dos macrófagos alveolares. Houve menor taxa de células viáveis nos controles do grupo desnutrido quando comparado com o nutrido, p<0,05. O maior percentual de células em apoptose foi detectado nos sistemas MSSA do grupo nutrido (p<0,001) e em relação à taxa de necrose, no MRSA do grupo desnutrido, p<0,05 (Figura 6).

Figura 6- Taxa de viabilidade, apoptose e necrose nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (C – Controle negativo, MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) e nos tempos de incubação (1, 2 e 24h). Teste ANOVA e Tukey. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados pelo símbolo *



DISCUSSÃO

A desnutrição incidindo nos períodos críticos de desenvolvimento dos sistemas orgânicos pode programar um padrão fenotípico susceptível a infecções mesmo após reposição nutricional [2]. A replicação celular e a síntese proteica constituem eventos importantes para competência imunológica, por esta razão pode ser influenciada pelo estado nutricional do indivíduo. Segundo Schaible, Kaufmann [15] a habilidade metabólica celular e a eficiência com que as células de defesa reagem aos processos infecciosos estão relacionados ao perfil nutricional do organismo do hospedeiro.

Neste estudo, utilizou-se como modelo experimental de desnutrição neonatal uma dieta hipoproteica a base de 8% de caseína. A redução de proteína na dieta oferecida as ratas é caracterizada pela restrição da quantidade total de nutrientes acessíveis aos filhotes. Desta forma, as ratas lactentes desenvolvem desnutrição proteica e os filhotes, desnutrição proteico-calórica. Este fato é determinante para a gênese dos efeitos deletérios observados na prole [2].

A partir do quarto dia pós-natal, foi observada redução no ganho de peso dos animais desnutridos, quando comparados aos animais nutridos. Este retardo do crescimento persistiu no período de reposição nutricional. Araújo *et al.* [16] e Costa *et al.* [17] utilizando o mesmo modelo de desnutrição neonatal, encontraram resultados similares. Porto *et al.* [18] detectaram redução no peso dos animais desnutridos após o quinto dia de vida. Além do

acompanhamento da evolução ponderal dos animais é essencial analisar o perfil da reposta microbicida dos fagócitos, através de técnicas mais sensíveis e especificas, como a biologia molecular.

Neste estudo, o sistema de *primers* desenhado para detectar a expressão da iNOS apresentou elevada sensibilidade, especificidade e excelente eficiência de reação. Segundo Too [13], a quantificação da expressão gênica baseia-se tanto na especificidade dos *primers*, que incluem a amplificação e a detecção dos alvos, assim como a qualidade da reação. Desta forma, este sistema torna-se mais uma alternativa para detecção deste importante alvo da resposta microbicida.

A enzima iNOS encontra-se ausente em macrófagos em repouso, mas é expressa após ativação dos receptores extra e intracelulares em resposta aos patógenos [19]. Ao analisar os resultados da qPCR, foi observado menor expressão da enzima iNOS no grupo desnutrido quando comparada ao nutrido. Ao confrontar estes resultados com os níveis de óxido nítrico no sobrenadante das culturas, também foi observado o mesmo padrão de resposta. Desta forma, pode-se sugerir que a desnutrição no período neonatal programou uma menor expressão de importantes mediadores imunológicos, tornando o organismo susceptível a infecções. Segundo Camelo *et al.* [20], a dieta materna durante a gestação, bem como a nutrição peri-natal inadequada, podem afetar a organogênese e, consequentemente, a função orgânica na maturidade mesmo após reposição nutricional.

Corroborando com estes resultados, Ferreira-Silva *et al.* [21] ao empregar o mesmo modelo de desnutrição neonatal, encontraram dados similares ao analisar a produção de NO em macrófagos após o estímulo *in vitro* com LPS. Morais *et al.* [12], ao realizar a cinética de produção deste radical livre, a cada duas horas num total de 24h, também observaram redução na produção de espécies reativas de nitrogênio no grupo desnutrido. Estes resultados podem ser consequência do *status* nutricional do hospedeiro durante os eventos importantes da competência imunológica nos períodos críticos de desenvolvimento. A resposta imunológica envolve uma rede complexa de interações moleculares e celulares que requerem replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA), expressão de mRNA e síntese proteica. Todos estes eventos biológicos necessitam de energia. Desta forma, agressões nutricionais precoces podem comprometer de forma permanente estas etapas vitais e alterar a evolução da resposta microbicida [2].

Nos sistemas testes foi verificada maior expressão da iNOS e produção de óxido nítrico no MSSA do grupo nutrido. Este fato demonstra ativação das vias de sinalização intracelular da resposta microbicida, que poderá ser efetiva ou não, a depender do poder de virulência do patógeno. Pumerantz *et al.* [22] afirmaram que o NO produzido pelos macrófagos alveolares desenvolve importante papel microbicida contra *S. aureus*. Entretanto, *S. aureus* é capaz de adaptar-se metabolicamente ao estresse nitrosativo por expressar a enzima NO-L-lactato desidrogenase induzível. A produção de NO-L-lactato desidrogenase permite que esta bactéria mantenha a homeostase durante o estresse redox nitrosativo [23].

A ativação da enzima oxidase dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase (NADPH oxidase) promove a produção de espécies reativas de oxigênio (radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila), em um processo chamado de *explosão respiratória* [24]. No presente trabalho, houve crescimento gradativo da produção de O_2^- no sobrenadante de cultura de macrófagos alveolares em todos os sistemas. Nos sistemas MSSA e MRSA, foram observadas elevada produção do ânion superóxido no grupo desnutrido. Na desnutrição, há desequilíbrio entre a produção de radicais livres e sua eliminação. O aumento de espécies reativas de oxigênio circulantes desencadearia efeitos nocivos capazes de lesar as estruturas dos sistemas biológicos [24, 25]

Apesar do efeito benéfico em situações de infecção, a produção intensa de espécies reativas de oxigênio torna-se prejudicial na inflamação sistêmica. Na sepse ocorre descontrole da produção de radicais livres que podem ocasionar lesões à distância [25]. Desta forma, na desnutrição, ocorre comprometimento da função imune aliado à exacerbação das reações de oxidação nocivas, capazes de lesar as estruturas dos sistemas biológicos. Köhler *et al.* [26] verificaram que em neutrófilos os mecanismos mediados pela NADPH oxidase são essenciais na proteção do hospedeiro contra infecção pulmonar por *S. aureus.* Entretanto, *S. aureus* independente do perfil de resistência aos antimicrobianos pode ser capaz de neutralizar os intermediários de oxigênio através da liberação das enzimas, como catalase e estafiloxantina [27]. Este perfil resposta imunológica pode contribuir para a ocorrência de processos infecciosos sistêmicos e graves, associados a elevadas taxas de morbimortalidade.

Neste estudo, foi detectada reduzida taxa de células viáveis no grupo desnutrido. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Ferreira-Silva *et al.* [21] e Morais *et al.* [12]. Segundo Rivandeira [28], a desnutrição está associada a maior taxa de morte celular.

Deficiências proteico-calóricas podem induzir lesão celular irreversível em decorrência de diversos fatores, como a intensa produção de radicais livres, que deflagra o mecanismo de morte celular programada.

O percentual de apoptose foi mais elevado no MSSA do grupo nutrido. Este fato pode ter ocorrido fruto da resposta microbicida dos macrófagos. Após a fagocitose, independente da morte do patógeno há o desencadeamento da apoptose, com o intuito de promover a eliminação eficiente do micro-organismo e a resolução da infecção [5, 29, 30]. Com apoptose dos fagócitos, não há o desenvolvimento de reação inflamatória local, uma vez que enzimas proteolíticas, componentes citosólicos das células e o micro-organismo invasor ficam retidos nos corpos apoptóticos, que serão eliminados posteriormente [28]. Em virtude disto, pode-se afirmar que a infecção por MSSA evolui mais rápido para cura, principalmente por não induzir um processo inflamatório exacerbado [5].

Neste estudo, foi verificado maior taxa de necrose dos macrófagos infectados com o MRSA do grupo desnutrido. Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, induzindo danos às células vizinhas e uma reação inflamatória local. A fim de escapar do confinamento citoplasmático, *S. aureus* induz a morte dos fagócitos por desencadear a piroptose ou liberar leucocidinas. A principal característica da piroptose é a ruptura da membrana plasmática com a liberação do conteúdo intracelular pró-inflamatório, via caspase-1 (protease citoplasmática) [31]. O mecanismo de ação das leucocidinas é a destruição dos leucócitos por formação de poros na membrana celular. A presença da leucocidina está associada a quadros infecciosos graves e fatais por *Staphylococcus aureus* meticilina resistente, como pneumonias necrotizantes [32];

O desencadeamento da piroptose e a possível presença da toxina leucocidina, podem ter favorecido a elevada taxa de necrose encontrada na infecção *in vitro* por MRSA. Este resultado pode justificar as altas taxa de morbimortalidade associada à infecção por MRSA. Além disto, os efeitos danosos da desnutrição neonatal podem predispor o surgimento de lesões irreversíveis a longo prazo nos fagócitos. Desta forma, o tempo de vida destas células foi reduzido e assim, a resposta microbicida é incapaz de destruir o patógeno invasor, o que agravaria ainda mais este quadro infeccioso.

A conclusão obtida neste estudo é que agressão nutricional incidindo nos períodos críticos de desenvolvimento programou redução no crescimento corporal dos animais, na expressão da enzima iNOS, na produção de óxido nítrico e na viabilidade dos macrófagos

alveolares, detectáveis no organismo adulto mesmo após longa recuperação nutricional. Entretanto, a produção de espécies reativas de oxigênio foi exacerbada. Desta forma, pode-se sugerir que este quadro pode favorecer a instalação do processo infeccioso e promover o desencadeamento de infecções graves e sistêmicas, em decorrência de lesões à distância via radicais livres. Em relação ao perfil de sensibilidade a meticilina das cepas de *Staphylococcus aureus*, a resistência parece influenciar nos mecanismos de evasão da resposta microbicida, com redução da defesa imunológica. Desta forma, a interação entre desnutrição neonatal e infecção com bactérias multirresistentes, torna os fagócitos mais susceptíveis ao desenvolvimento de quadros infecciosos graves e fatais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pereira KNF, Vitoriano ILS, Melo MPP, Aragão RS, Toscano AE, Silva HJ, De Castro RM (2009). Effects of malnutrition and/or neonatal inhibition of serotonin reuptake in neuromuscular development of the gastrointestinal tract: review of literature. Neurob. 72 (2): 215-21.
2. Robinson S, Fall C (2012) Infant Nutrition and Later Health: A Review of Current Evidence. Nutr. 4, 859-874. doi:10.3390/nu4080859.
3. Fisher RE, Steele M, Karrow AA (2012) Fetal Programming of the Neuroendocrine-Immune System and Metabolic Disease. J Preg. 1:1-11. doi:10.1155/2012/792934.
4. Iliakis D, Kressig RW (2014) The relationship between malnutrition and immune. Ther Umsch. 71(1):55-61. doi: 10.1024/0040-5930/a000481.
5. Cruviel WM, Júnior DM, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Silva NP, Andrade LEC (2010) Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. Rev Bras Reumatol. 50(4): 434-61.
6. França TGD, Ishikawa LLW, Zorzella-Pezavento SFG, Chiuso-Minicucci F, Guerino CPF, Cunha MLRS, Sartori A (2009) Immunization protected well nourished mice but not undernourished ones from lung injury in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. BMC Microbiol. 9:240. doi:10.1186/1471-2180-9-240.
7. Deurenberg RH, Stobberingh EE (2008) The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol. 8(6):747-63. doi: 10.1016/j.meegid.2008.07.007.
8. Zecconi A, Scali F (2013) *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. Immunology Letters. 150(1–2): 12–22.

9. Faria NA, Oliveira DC, Westh H, Monnet DL, Larsen AR, Skov R, De Lencastre H (2005) Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. J Clin Microbiol.43:1836-42.
10. Gordon RJ, Lowy FD (2008) Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. Clin Infect Dis, 16: 209-213, 2008.
11. Shibabaw A, Abebe T, Mihret A (2014) Antimicrobial susceptibility pattern of nasal *Staphylococcus aureus* among Dessie Referral Hospital health care workers, Dessie, Northeast Ethiopia. Internat J of Infect Dis, 2:1–4. doi.org/10.1016/j.ijid.2014.03.1386.
12. Morais NG, Costa TB, Almeida TM, Severo MS, De Castro CMMB (2013) "Parâmetros imunológicos de macrófagos frente à infecção por *Staphylococcus aureus* meticilina sensível/resistente". J Bras Patol Med Lab. 49(2): 84-90. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442013000200002.
13. Too HP (2003) Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. Molecular Brain Research, Amsterdam, 114: 146-154.
14. Gonçalves SC, Régis-da-Silva CG, Brito MEF, Brandão-Filho SP, Paiva-Cavalcanti M (2012) Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of leishmaniasis. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 18(2): 188-197.
15. Schaible UE, Kaufmann SHE (2007) Malnutrition and Infection: Complex Mechanisms and Global Impacts. PLoS Medic. 4(5): 806-812. doi:10.1371/journal/pmed.0040115.t001.
16. Araujo FRG, De Castro CMMB, Rocha JA, Sampaio B, Diniz MFA, Eve LB, Montarroyos UR (2012) Perialveolar bacterial microbiota and bacteraemia after dental alveolitis in adult rats that had been subjected to neonatal malnutrition. Brit J Nutrit, 107: 996–1005. doi: 10.1017/S000711451100393X.
17. Costa TB, Morais NG, Almeida TM, Severo MS, De Castro CMMB (2012) Early malnutrition and production of IFN-□, IL-12 and IL-10 by macrophages/lymphocytes: in vitro study of cell infection by methicillin-sensitive and methicillin-resistant

Staphylococcus aureus. Rev. Nutr. 25(5): 607-619. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732012000500006.

18. Porto SMMS, Viana MT, Silva KMF, Diniz MFA, De Castro CMMB (2007) Desnutrição neonatal e microbiota normal da cavidade oral em ratos. Rev Bras Nutr. 20(6): 625-32.
19. Mcgettrick AF, O'neill LAJ (2010) Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. Curr Opin Immunol. 22(1): 20-7.
20. Camelo JRJS, Martinez FE (2005) Dilemas nutricionais no pré-termo extremo e repercussões na infância, adolescência e vida adulta. J.Pediatr. 81(1): 340-347.
21. Ferreira-Silva WT, Galvão BA, Ferraz PKN, De Castro CMMB, De Castro RM (2008) "Perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide release by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rat". Neuroimmun, 23: 120-9.
22. Pumerantz A, Muppidi K, Agnihotri S, Guerrac C, Venketaraman V, Wangb J, Betageri G (2010) Preparation of liposomal vancomycin and intracellular killing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Internat J Antimicrob Ag. 32: 1-5.
23. Richardson AR, Libby SJ, Fang FC (2008) A Nitric Oxide–Inducible Lactate Dehydrogenase Enables Staphylococcus aureus to Resist Innate Immunity; Science. 319: 1-21. doi: 10.1126/science.1155207.
24. Macedo EMC, Amorim MAF, Silva ACS, Castro CMMB (2010) Effects of copper, zinc and magnesium deficiency on the immune system of severely malnourished children. *Rev Paul Pediatr. 28(3):329-36.*
25. Sarni ROS, Souza FIS, Cocco RR, Mallozi MC, Solé D (2010) Micronutrients, immunologic system and allergic diseases. Rev. bras. alerg. imunopatol. 33(1): 8-13.
26. Köhler J, Breitbacha K (2011) NADPH-oxidase but not inducible nitric oxide synthase contributes to resistance in a murine *Staphylococcus aureus* Newman pneumonia model. Microbes and Infection. 13(11): 914–922.
27. Nizet V (2007) Understanding how leading bacterial pathogens subvert innate immunity to reveal novel therapeutic targets. J Allergy Clin Immunol. 120(1): 13-22. doi:10.1016/j.jaci.2007.06.005.

28. Rivadeneira DE, Grobmyer SR, Naama HA, Mackrell PJ, Mestre JR, Stapleton PP, Daly JM (2010) Malnutrition-induced macrophage apoptosis. Surgery, 129(5): 617-25.
29. Grivicich I, Regner A, Rocha AB (2007) Apoptosis: Programmed Cell Death. R Bras Canc. 53(3): 335-343.
30. Ribeiro R, Sousa DWN, Oliveira TS, Fernandes KPS, Junior JAS (2012) Intense Physical Activity: Role of Nitric Oxide in Apoptosis. Ter Man. 10(48): 1-5.
31. Schroder K, Tschopp J (2010) The Inflammasomes. Cell, March, 140(19): 821–832.
32. Carvalho RLB, Berezin EM, Mimica ML (2012). Detection of *lukS-PV* and *lukF-PV* in *Staphylococcus aureus* pediatric isolates. Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo. 57(2): 59-62.

7 EXPRESSÃO DOS RECEPTORES TLR-2, TLR-4, NLRP3 E DA ENZIMA CASPASE-1 NOS MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NEONATAL E INFECTADOS *in vitro* COM *Staphylococcus aureus* METICILINA SENSÍVEL E METICILINA RESISTENTE

INTRODUÇÃO

A fase mais vulnerável do processo de crescimento e desenvolvimento dos sistemas orgânicos compreende o final da gestação, a lactação e os primeiros anos de vida, os quais constituem os períodos críticos de plasticidade fisiológica [1]. Agressões ambientais precoces incidindo nos períodos críticos de desenvolvimento podem acarretar efeitos permanentes sobre estruturas e funções do sistema nervoso, endócrino e imune com repercussão na vida adulta. Segundo Palmer [2] após *deficits* nutricionais, todos os processos do organismo programam uma redução funcional adaptativa, como estratégia para garantir a sobrevivência.

Os efeitos da deficiência de nutrientes sobre a resposta imunológica dependem da magnitude, duração e do período do agravo. O perfil de expressão de receptores de reconhecimento (TLR, receptores Toll-like e NLR, receptores Nod-like) predispõe a uma resistência ou susceptibilidade a infecções [3]. A interação receptor–patógeno é responsável por diversos mecanismos celulares como fagocitose e ativação das vias de sinalização intracelular, capazes de induzir a proliferação e diferenciação das células do sistema imune [4].

Eventos importantes da resposta microbicida dependem da síntese proteica, como a expressão de receptores, produção de radicais livres, citocinas, mediadores pró-inflamatórios e a expansão clonal [4, 5]. A desnutrição no período neonatal promove deficiência de calorias e aminoácidos, essenciais na síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), na produção de proteínas de fase aguda e de energia. E desta forma, pode comprometer a defesa contra patógenos [6].

Apesar de ser combatido por uma série de mecanismos imunológicos, tanto inespecíficos quanto específicos, *S. aureus* dispõe de uma série de estratégias de escape que permite a evasão das defesas do hospedeiro. Esta bactéria possui um arsenal de fatores de virulências dispostos na sua superfície ou secretados no meio externo que podem reduzir a resposta microbicida dos fagócitos, induzir a morte destas células e/ou impedir o mecanismo de ação dos antibióticos [7].

Cutler [8] sugeriu que as modificações nas paredes celulares do *S. aureus* relacionadas com o fenótipo de multirresistência poderiam exacerbar seus mecanismos de virulência. Em 2009, França *et al.* [9] verificaram que a infecção por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) está relacionada a casos graves e fatais. No entanto, ainda não está claro se a resistência constitui um fator de risco independente para morbidade e mortalidade dos indivíduos infectados.

A desnutrição representa um importante fator de risco de mortalidade por infecção com *S. aureus* resistentes a meticilina [9, 10]. Entretanto, o efeito da desnutrição na susceptibilidade à infecção pelo *S. aureus* não é investigada de forma sistemática. Em virtude disto, torna-se necessário avaliar a expressão dos receptores TLR-2, TLR-4, NLRP3 e da enzima caspase-1 nos macrófagos alveolares de ratos adultos submetidos à desnutrição neonatal e infectados *in vitro* com *Staphylococcus aureus* meticilina sensível e meticilina resistente.

MÉTODOS

Animais e Dieta. Foram utilizados 24 ratos machos, albinos, da linhagem *Wistar* (90-120 dias), provenientes da colônia do Biotério do Departamento de Nutrição, da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em temperatura controlada (22±1ºC) com ciclo fotoperiódico de claro-escuro de 12:12h e com livre acesso à água e à ração. 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 filhotes amamentados por mães submetidas à dieta contendo 17% de proteína à base de caseína utilizada como fonte proteica (n=12); Desnutrido (D) - constituído por filhotes amamentados por mães submetidas à dieta contendo 8% de proteína à base de caseína utilizada como fonte proteica (n=12), durante os primeiros 21 dias após o nascimento. A caseína 8% é bastante utilizada como modelo experimental para estudo da desnutrição, por induzir, nos animais, quadro de desnutrição proteica. Durante o período neonatal, foram registrados diariamente (em balança eletrônica digital – Marte, modelo S-4000-com sensibilidade de 0,1g) os pesos corporais de cada animal, a fim de acompanhar o peso corporal durante a manipulação nutricional. A partir do 22º dia de vida até o final do experimento, o peso corporal foi aferido três vezes por semana, com o intuito de acompanhar a recuperação nutricional dos animais. Neste período, os animais foram separados de suas mães, mantidos em gaiolas coletivas contendo três ratos

em cada gaiola e receberam a Dieta Padrão do Biotério (Labina-Purina do Brasil), até a vida adulta (90-120 dias).

Cepas de *Staphylococcus aureus*. Foram utilizadas as cepas *Staphylococcus 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 bactérias 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 a 5%) e incubadas a 37ºC. No início do ensaio, algumas colônias foram transferidas para tubos contendo PBS (*Phosphate Buffer Saline*) estéril, de forma a se obter, com auxílio de espectrofotômetro a 570nm, uma turbidez de 0,15nm. Esta absorbância, segundo Morais *et al.* [11], corresponde aproximadamente à concentração de 10^6 UFC/mL de PBS.

Lavado broncoalveolar (LBA). Os animais foram anestesiados com cloralose-uretana (0,5 e 12,5% respectivamente) na proporção de 8mL/kg i.p. O LBA foi coletado com a injeção de salina a 0,9% através de uma cânula plástica inserida na traqueia. Várias alíquotas de 3mL foram injetadas e coletadas em tubos cônicos de polipropileno de 50mL (Falcon, Sigma).

Cultura de macrófagos alveolares. As amostras do LBA foram centrifugadas, a 268g, por 15min. O precipitado que corresponde às células foi ressuspendido em RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium - Gibco-Invitrogen Corporation*) contendo 3% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 100U/mL e estreptomicina 100µg/mL). As células foram transferidas para placas de cultura de 35mm de diâmetro (6 poços, Falcon) em uma proporção de 10^6 células/mL de RPMI 1640 em cada poço. Após 1h de incubação a 37°C e 5% CO_2, desprezou-se o sobrenadante com as células não-aderentes e foram adicionados 1mL de meio RPMI. As culturas de células foram incubadas sob as condições anteriores para estabilização das células.

Sistemas. Foram estabelecidos quatro sistemas: controle negativo (C), contendo apenas macrófagos alveolares; controle positivo para TLR-2 (CP-PG): macrófagos mais 10µL de lipopolissacarídeo (10µg/mL) do sorotipo da bactéria *Porphyromonas gingivalis*; controle positivo para NLRP3 e caspase (CP-ATP): macrófagos mais 10µL de lipopolissacarídeo (10µg/mL) do sorotipo do sorotipo de *Escherichia coli* incubados por 2 horas, e posteriormente com ATP (5mM) por 30 minutos; controle positivo para TLR4 (CP-EC):

macrófagos mais 10µL de lipopolissacarídeo do sorotipo de *Escherichia coli*; MSSA, macrófagos mais 100µL de inoculo bacteriano referente à cepa sensível (ATCC 29213) e MRSA, macrófagos mais 100µL de inoculo bacteriano da cepa resistente (ATCC 33591). As placas foram incubadas por 24horas, à 37ºC, com atmosfera úmida e 5% de CO_2.

Extração dos macrófagos aderidos na placa de cultura celular. A extração dos macrófagos foi realizada com a utilização do reagente Versene (1x *Gibco by life Technologies*). Para as análises da viabilidade celular, o *pellet* de células foi ressuspendido com 1mL de PBS, para as análises de biologia molecular foi adicionado 800µL de Trizol e armazenado a -80°C.

Extração de RNA dos macrófagos congelados em Trizol. Em cada amostra, foi adicionado 200µL de clorofórmio, incubado por 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugado a 11725g, por 10 minutos. O sobrenadante contendo RNA (fase aquosa) foi transferido para novos tubos e precipitado ao adicionar 500µL de isopropanol. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente, e posteriormente centrifugado utilizando as mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado, adicionado 1mL de álcool 70% e centrifugado a 8848g, por 5 minutos. O *pellet* de RNA foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente e ressuspendido com 30µL em água livre de RNAse (DEPC). O RNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop™ (ThermoScientific, Waltham, Massachusetts), no comprimento de onda de 260nm e 280nm, e armazenado a -80ºC.

Transcrição reversa do RNA em cDNA. O RNA total foi convertido em cDNA utilizando o kit QuantiTect® Reverse Transcription, através do termociclador automático *Eppendorf mastercycler gradient*. As condições de ciclagem utilizadas foram: 42ºC por 30min e 96ºC por 3min.

***Primers*.** Com o auxílio do software *Primer Express* (Applied Biosystems, versão 2.0), foram desenhados *primers* para detecção dos receptores TLR-2, TLR-4 e NLRP3 (número de acesso no Genback das sequências de base utilizadas NM_198769.2, NM_019178.1, NM_001191642, respectivamente). Os *primers* desenhados foram: TLR-2F 5'CACCTCAATGGGGTTGGTAA 3', TLR-2R 5'ATAGAAGTGGGGATGTGCAG 3'; TLR-4F 5' ATTTACAGAGGGGCAACCGC 3', TLR-4R 5'TGGCATTTTCTGCAACCAGC 3'; NLRP3F 5' TCTAGTCCAAGAGGAAAGTAAC3',NLRP3R5'CCTAGAAAAGACTGCTCGACTT 3'. O sistema de *primers* para detecção da enzima caspase-1 foi obtido no estudo de Chiba *et al*.

[12]: caspase-1F 5'GAAAGAATTTGCTGCCTGCCCAGA3'; caspase-1R 5'GCTTGTCTTTCAAGCTTGGGCACT3'.

Avaliação da sensibilidade, eficiência e especificidade dos *primers*. Para avaliação da sensibilidade (limite de detecção) foram efetuadas diluições seriadas (fator 10) de cDNA dos controles positivos, nas concentrações de 1fg a 1ng. A sensibilidade do ensaio foi definida pela amplificação da maior diluição do DNA alvo quando comparado à formação de dímeros de *primers* em amostras sem DNA. A eficiência foi determinada por meio da fórmula:$\varepsilon = (10^{1/slope}) - 1$. Para avaliação da especificidade, foi realizada a padronização das amostras alvos (cDNA dos controles positivos com seus respectivos *primers)* e amostras testes (cDNA dos controles positivos com sistemas de *primers* não específicos). A especificidade (σ) foi definida pela equação $\sigma = (1+ \varepsilon)^{\Delta Ct}$, onde ε significa a eficiência da amplificação e ΔCt a diferença dos valores dos *Cts* (*Cycle Threshold*) da amostra definida como alvo e das amostras em teste [13]. Os resultados foram expressos em valor de *Ct*, σ e Log σ na base 10.

Quantificação da expressão dos receptores TLR-2, TLR-4, NLRP3 e da enzima caspase-1. A quantificação da expressão gênica foi obtido pela técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR). A amplificação das amostras foi realizada através do kit QuantiFast® Syber® green PCR, no aparelho ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, CA, USA). As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial 95ºC/1s, anelamento e extensão 60ºC/1min em 40 ciclos. O volume final de cada reação foi de 25 µL, composta por 12,5µL *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, CA, USA), 8,5 µL de água, 1µL de cada *primer (*5 pmoles) e 2µL do template de DNA. As reações foram realizadas em duplicata para a quantificação de cada gene e para os controles negativos da reação (NTC). O método utilizado para o cálculo da expressão relativa foi a curva-padrão comparativa. Para confecção da curva-padrão, foram efetuadas diluições seriadas (1:10) de cDNA, nas concentrações de 1fg a 1ng. O controle endógeno (gene de referência) utilizado foi o GAPDH (*Glyceraldehydes-3-Phosphate Dehydrogenase*), cujos sistemas de *primers* utilizados foram: GAPDHF 5'ATCTTCCAGGAGCGAGATCCC 3' e GAPDHR 5' GTGGGCAAGGTCATCCCT 3' [14]. A expressão de mRNA dos alvos foi obtida através de duas normalizações sequenciais: pelo controle endógeno e pelo calibrador (controle negativo). A primeira normalização foi realizada da seguinte maneira: *quantity* do gene alvo/ *quantity* do gene de referência, onde *quantity* consiste nos valores absolutos em função da curva-padrão. Após a normalização do

gene alvo, o RQ (quantidade relativa de mRNA) foi obtido através da normalização pelo calibrador.

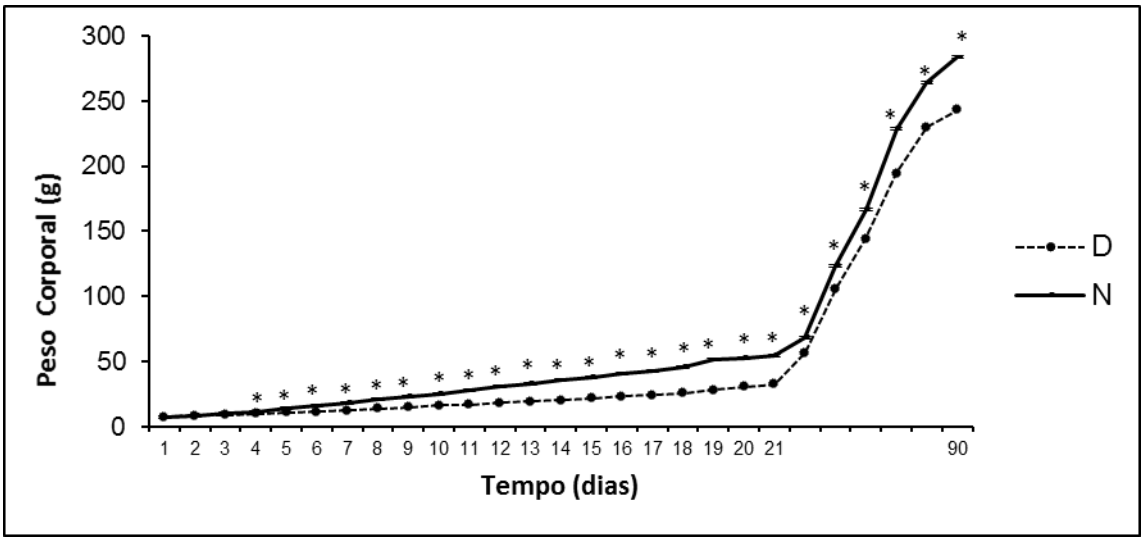
Sequenciamento. O sequenciamento das amostras foi realizado no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas do Ageu Magalhães – FIOCRUZ/PE, através do kit big-Dye terminator v 3.1 e no aparelho ABI 3100 Genect Analyzer – Applied Byosistems. As sequências foram determinadas em ambas direções (usando os mesmos *primers* individualmente) e submetidas ao NCBI - BLASTn para análise de homologia com os genes em análise.

Análise Estatística. Para avaliação da evolução do peso corporal foi utilizado o teste t *Student*. Em relação às outras análises, foi empregada a Análise de Variância (ANOVA), para os dados paramétricos. Quando a ANOVA revelou a existência de diferença significativa foi utilizado o Teste de *Tukey*, a fim de identificar que grupos diferiram entre si. A significância foi definida para $p<0,05$. O programa estatístico empregado para as análises foi o Sigma Stat®.

RESULTADOS

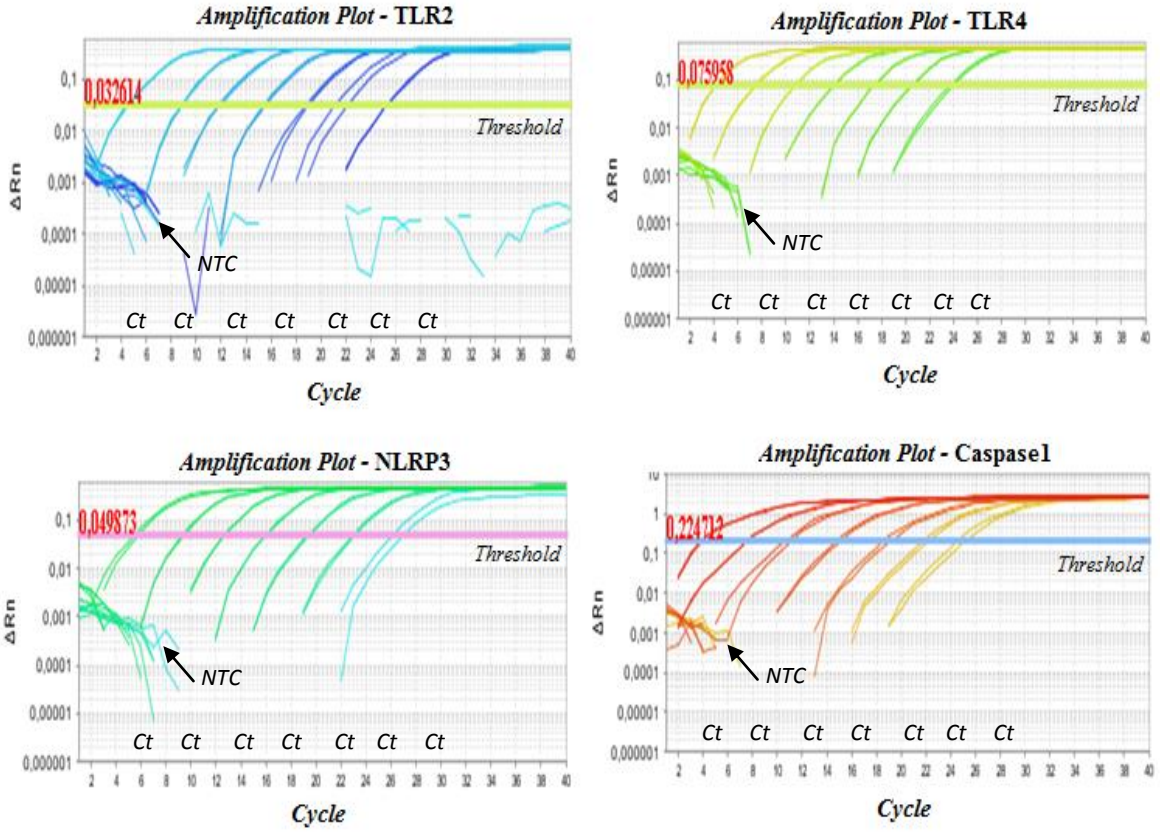
Peso corporal na desnutrição e reposição nutricional. Nos primeiros dias de vida, os pesos corporais (g) dos grupos nutridos e desnutridos foram semelhantes até o 3º dia. A partir do 4º até o 21º dia pós-natal, os valores dos pesos corporais dos animais desnutridos foram menores em relação aos dos animais nutridos ($p<0,001$). Entre o 22º e o 90º dia de vida ocorreu a reposição nutricional e os valores dos pesos do grupo desnutridos permaneceram menores quando comparados aos do grupo nutrido ($p<0,001$) (Figura 1).

Figura 1- Evolução da curva ponderal durante a desnutrição neonatal (21 dias) e reposição nutricional (23-90 dias) dos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido). Teste t de *Student*. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados pelo símbolo *



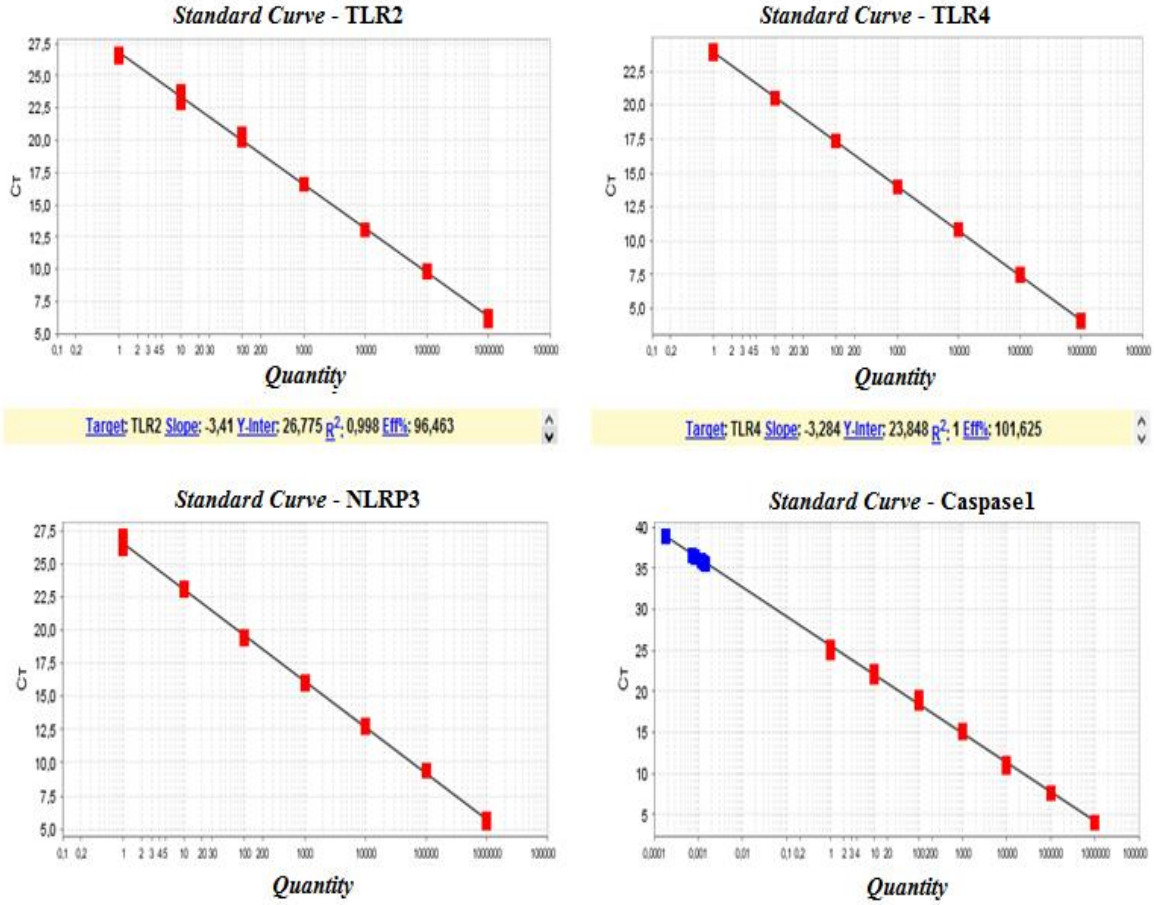
Sensibilidade dos *primers*. Em todos os sistemas de *primers*, a sensibilidade (limite de detecção) foi de 1fg de cDNA (Figura 2).

Figura 2: *Plot* das curvas de amplificação do cDNA do controle positivo da iNOS (LPS) (nas concentrações de 1fg a 1ng). Legenda: *Threshold* (limiar de detecção); *Ct* (*Cycle Threshold)*; NTC (controle negativo da reação).



Eficiência dos *primers*. A eficiência do sistema de *primers* do receptor TLR-2 foi de 96,46% (R2= 0,998, ε = 0,9646 e *slope*= -3,41), do TLR-4: 100% (R2: 1,0 ε = 1,0 e *slope*= -3,28), do NLRP3: 94,48% (R2: 0,999, ε = 0,9448 e *slope*= -3,46) e da enzima caspase-1: 91,21% (R2: 0,996, ε = 0,9121 e *slope*= -3,6) (Figura 3).

Figura 3: Eficiência dos sistemas de *primers* a partir de diluições seriadas (fator 10) de cDNA dos controles positivos, nas concentrações de 1fg a 1ng. Legenda: *Quantity* (valores absolutos); *Ct* (*Cycle Threshold)*.

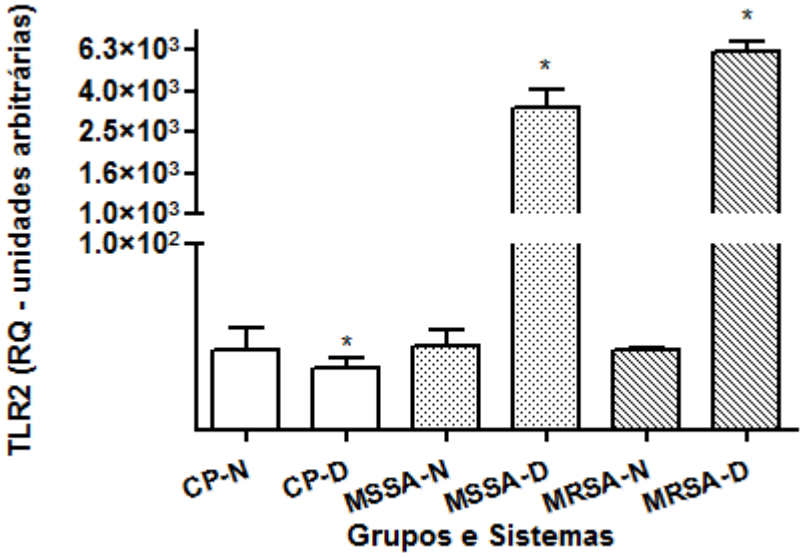


Especificidade dos *primers*. Os sistemas de *primers* apresentaram elevada especificidade**:** TLR-2 (*Ct*: 33,27, σ: 99994421,5; *Ct*: 29,28, σ: 6759138,4; *Ct*: 25,64, σ: 578689,886), TLR-4 (*Ct*: 24,11, σ: 5817608,74; *Ct*: 23,68, σ: 2561002,36; *Ct*: 22,83, σ: 4435081,39), NLRP3(*Ct*: 30,42, σ: 97915235,06; *Ct*: 28,50, σ: 335884212,3; *Ct*: 29,84, σ: 231007360,8) e caspase-1 (Ct:36,49, σ: 4706966491; *Ct*: 35,83, σ: 2960302462; *Ct*: 35,5, σ: 3204696788). Ao analisar o Log σ, o sistema de *primers* para detectar TLR-2 é 10^8, 10^7, 10^6 vezes mais específico para o receptor TLR-2 que para TLR-4, NLRP3 e caspase-1, respectivamente. Para o sistema de *primers* do TLR-4 foi $10^{6,0}$, $10^{5,9}$, $10^{5,6}$ vezes mais específico, do NLRP3 foi $10^{8,6}$, $10^{7,0}$, $10^{6,9}$ vezes mais específico e da caspase-1 foi $10^{9,8}$, $10^{9,1}$, $10^{8,9}$ vezes mais específico.

Sequenciamento das amostras amplificadas na qPCR. Os produtos obtidos para cada alvo foram sequenciados e os resultados encontrados foram: *amplicon* do TLR-2 - 100% de homologia com o receptor TLR-2 de *Rattus novergicus; amplicon* TLR-4 – 100% de homologia com o receptor TLR-4 de *Rattus novergicus*; *amplicon* NLRP3 – 95% de homologia com os receptores da família NLR e o *amplicon* da caspase-1 obteve 99% de homologia com a enzima caspase-1 de *Rattus novergicus.*

Quantificação da expressão do receptor TLR-2 O menor RQ do receptor TLR-2 ocorreu no CP-PG do grupo desnutrido quando comparado ao nutrido (CP-PG: 0,525±0,1; CP-PG-D: 0,21±0,15; MSSA: 0,61±0,74; MSSA-D: 3285,19±727,8; MRSA: 0,50±0,08; MRSA-D: 61638,6±749,38), p<0,05. Ao analisar os sistemas bacterianos, a maior expressão foi detectada no MRSA do grupo desnutrido, p<0,05 (Figura 4).

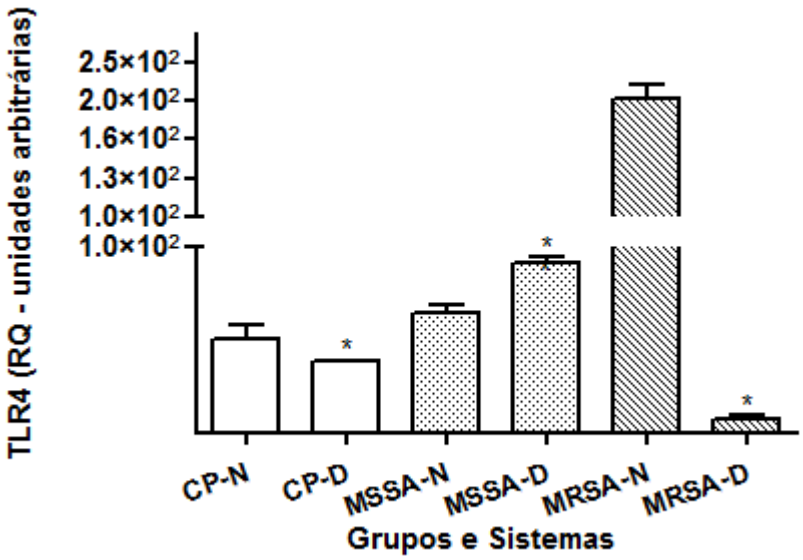
Figura 4- Expressão relativa do receptor TLR-2 nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (CP – Controle positivo, MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina). Teste ANOVA e Tukey. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados pelo símbolo *



Quantificação da expressão do receptor TLR-4. A diferença entre o grupo nutrido e desnutrido foi observada no CP-EC e no MRSA, com menor RQ do TLR-4 no MRSA (CP-EC: 1,01±1,0; CP-EC-D: 0,34±0,01; MSSA: 3,75±2,09; MSSA-D: 43,73±20,08; MRSA:

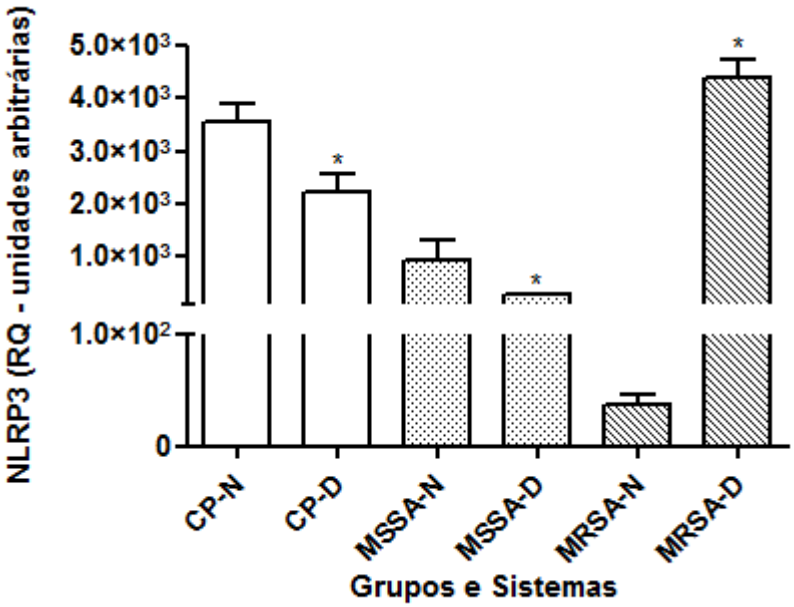
201,77±116,9; MRSA-D: 0,02±0,004), p<0,05. A maior expressão deste receptor foi observada no MRSA do grupo nutrido, p<0,001 (Figura 5).

Figura 5- Expressão relativa do receptor TLR-4 nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (CP – Controle positivo, MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina). Teste ANOVA e Tukey. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados pelo símbolo *



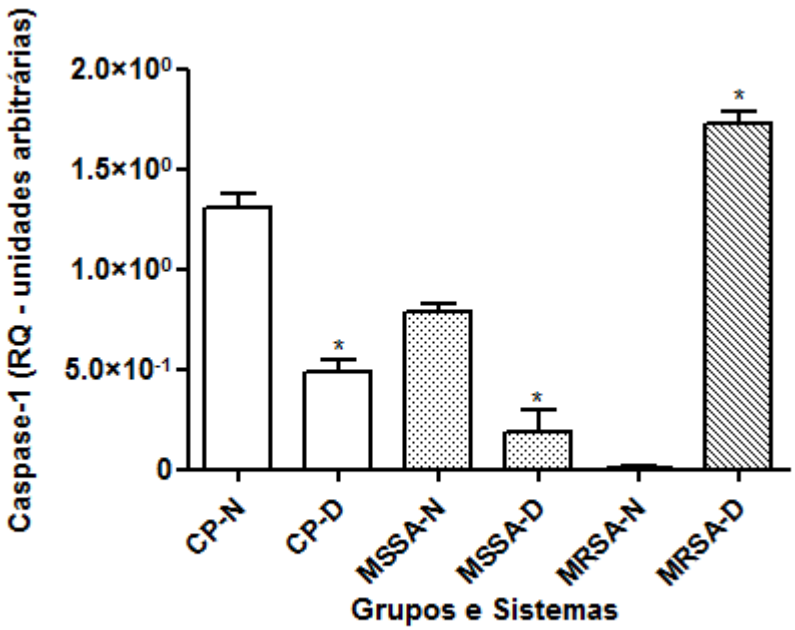
Quantificação da expressão do receptor NLRP3. Foi observada menor RQ do NLRP3 no CP-ATP e MSSA do grupo desnutrido quando comparado ao nutrido, com redução mais pronunciada no MSSA (CP-ATP: 3534,91±359,32; CP-ATP-D: 2231,36±345,45; MSSA: 952±345,85; MSSA-D: 295,55±12,09; MRSA: 37,69±8,14; MRSA-D: 4383,53±341,79), p<0,05. Entretanto, a maior expressão deste receptor foi observada no MRSA do grupo desnutrido, p<0,001 (Figura 6).

Figura 6- Expressão relativa do receptor NLRP3 nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (CP – Controle positivo, MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina). Teste ANOVA e Tukey. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados pelo símbolo *



Quantificação da expressão da caspase-1. A diferença entre o grupo nutrido e desnutrido foi observada no CP e no MSSA, com menor RQ no CP-ATP (CP-ATP: 1,39±0,06; CP-ATP-D: 0,49±0,05; MSSA: 0,78±0,04; MSSA-D: 0,188±0,11; MRSA: 0,009±0,01; MRSA-D: 1,7±0,06), $p<0,05$. Aa analisar os sistemas bacterianos foi observada maior expressão desta enzima no MRSA do grupo desnutrido, $p<0,001$ (Figura 7).

Figura 7- Expressão relativa da enzima caspase-1 nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (CP – Controle positivo, MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina). Teste ANOVA e Tukey. Resultados foram expressos como média±desvio padrão, n=24. Diferenças entre os grupos nutrido e desnutrido foram consideradas significativas com p<0,05 e foram representados pelo símbolo *



DISCUSSÃO

Alterações no aporte de determinados nutrientes durante os períodos críticos de plasticidade do sistema imunológico podem provocar distúrbios irreversíveis na resposta microbicida [2]. Embora o restabelecimento de uma dieta balanceada pós-natal possa reduzir o prejuízo decorrente de uma agressão nutricional precoce, seus efeitos poderão permanecer a longo prazo na resposta imunológica [1].

Restrição alimentar durante o desenvolvimento do animal, pode provocar efeitos irreversíveis, dependendo do período e do órgão em desenvolvimento. Se esta restrição ocorrer durante a multiplicação celular, os animais não alcançarão níveis normais no peso de alguns órgãos, mesmo após recuperação nutricional, devido ao decréscimo no número de células [1]. Neste estudo, o modelo de desnutrição neonatal empregado foi a dieta a base de 8% caseína, que se caracteriza por ser hipoproteica. Foi observado a partir do 4º dia do período de aleitamento que a desnutrição precoce acarretou déficit no peso corporal, evidenciado por um retardo da evolução ponderal que persistiu durante a reposição nutricional. Estes dados estão de acordo com aqueles obtidos por Costa *et al.* [15] e Araújo *et al.* [16].

Estudos têm demonstrado que uma dieta pobre em proteína no período de gestação e lactação induz alterações permanentes na estrutura e na funcionalidade dos sistemas fisiológicos, como nervoso, endócrino e imune [17, 18]. Este caráter deletério para o desenvolvimento das funções imunológicas pode ser em parte, consequência da baixa disponibilidade de aminoácidos imposta pela desnutrição proteica. Estes compostos são substratos para a expressão de receptores, síntese de enzimas, hormônios, moléculas que são essenciais para a adequada formação e maturação dos sistemas orgânicos [2].

Neste estudo, foram desenhados *primers* para a detecção de alvos (TLR-2, TLR-4, NLRP3) com o intuito de desvendar os efeitos da desnutrição neonatal sobre a resposta imunológica na infecção por bactérias multirresistentes. Os sistemas de *primers* obtidos apresentaram elevada sensibilidade, especificidade e excelente eficiência de reação. A precisão na quantificação da expressão gênica baseia-se tanto na especificidade dos *primers*, que incluem a amplificação e a detecção dos alvos, assim como na qualidade da reação [13]. Desta forma, estes sistemas de detecção poderão auxiliar futuros estudos na área. Em decorrência da importância destes alvos, estes podem se transformar em componentes essenciais para o diagnóstico e a terapêutica de patologias associadas a resposta imunológica.

A expressão do receptor TLR-2, foi menor nos macrófagos infectados *in vitro* com LPS do grupo desnutrido quando comparado ao nutrido. O TLR-2 é expresso em concentrações elevadas em neutrófilos e desempenha papel chave na resposta ao peptideoglicano, ácido lipotecoico e uma variedade de macromoléculas das bactérias Gram positivas [19]. Nietrs [20] através de um estudo *in vitro* verificaram que macrófagos de camundongos deficientes no TLR-2 não desenvolvem resposta ao peptideoglicano do *S. aureus*, tornando o organismo susceptível à instalação da infecção.

Nos sistemas bacterianos, foi observada intensa expressão do TLR-2 tanto para o MSSA como para o MRSA do grupo desnutrido, com maior destaque para o MRSA. Apesar da maior transcrição do mRNA, as etapas da síntese proteica ou as vias de sinalização intracelular podem estar comprometidas. Segundo Schaible, Kaufmann [6] existe um fino controle entre a restrição nutricional e o nível de transcrição proteica, assim, podem ser encontrados níveis baixos de RNA para algumas proteínas e para outras não são afetados ou estão elevados, entretanto a função biológica encontra-se comprometida.

A parede celular de *S. aureus* contém moléculas ligadas ao peptideoglicano que ao interagirem com TLR-2, não só atuam como padrões moleculares associados patógenos

desencadeando respostas imunitárias inatas pró-inflamatórias, como também podem atuar como moduladores da resposta anti–inflamatória [21]. Kurokawa *et al.* [22] caracterizaram bioquimicamente um componenente (Ácido teicóico D- alanylation) da parede celular do *Staphylococcus aureus* que atua interferindo no reconhecimento do peptidoglicano pelo TLR-2 e favorece a indução da resposta humoral.

Na expressão do TLR-4, houve menor transcrição nos macrófagos infectados *in vitro* com LPS e MRSA no grupo desnutrido quando comparado ao nutrido. A desnutrição proteico-energética provoca uma deficiência de calorias e aminoácidos, essenciais na síntese de DNA, RNA, na produção de proteínas e enzimas. Dependendo da intensidade e da duração das alterações nutricionais, as consequências terão impacto maior ou menor sobre todo o organismo no futuro [6]. Desta forma, pode-se sugerir que os macrófagos dos animais desnutridos no período neonatal foram programados para expressar baixos níveis deste receptor.

Em contrapartida, foi observada maior expressão do TLR-4 no MRSA do grupo nutrido. O TLR-4 possui a habilidade de reconhecer o lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas e o ácido lipotecóico das bactérias Gram positivas. Este receptor seria considerado uma segunda via de identificação de bactérias Gram-positivas no espaço extracelular [23, 24]. A estimulação por bactérias e fungos através do TLR-4 é capaz de mediar à indução de citocinas pró-inflamatórias, enquanto o reconhecimento desses micro-organismos por TLR-2 pode conduzir à liberação de mediadores anti-inflamatórios, em decorrência da interação parasito-hospedeiro [23].

O ato contínuo de interação entre patógeno e os receptores Toll-like, acionam diferentes vias celulares de sinalização, incluindo a participação de proteínas e receptores intracelulares NLR (*nucleotid-binding oligomerization domain receptor)*, que são plataformas centrais da imunidade inata. Esta sequência culmina com a produção e secreção de inúmeras citocinas pró-inflamatórias (IL-1β e IL-18), através da ativação de um complexo proteico denominado inflamassoma. O inflamassoma NLRP3 desempenha papel crítico na resposta contra a bactéria *Staphylococcus aureus* [25].

A expressão do receptor NLRP3 foi menor no controle positivo e no MSSA do grupo desnutrido quando comparado ao nutrido. Este resultado mais uma vez corrobora com a hipótese de programação do sistema imunológico por agressões nutricionais precoces, que induzem efeitos permanentes sobre estruturas e funções do sistema imune e podem promover

maior susceptibilidade a infecções na vida adulta [26]. Em resposta a uma infecção, a ativação dos inflamassomas contribui para limitar a invasão do micro-organismo. Experimentos *in vivo* utilizando um modelo de abscesso subcutâneo por *S. aureus* revelou um crítico papel de NLRP3-/- no recrutamento dos neutrófilos e controle da infecção [27].

Neste estudo, foi observado elevada transcrição de mRNA do NLRP3 no MRSA do grupo desnutrido. Apesar do inflamassoma constituir um importante componente da resposta imune inata na defesa do hospedeiro, sua ativação desregulada está associada à indução de lesões teciduais extensas. *S. aureus* produz várias toxinas que formam poros que estão implicados na patogênese de infecções graves e são capazes de ativar o inflamassoma NLRP3 [27]. A α-hemolisina estafilocócica é um fator essencial na virulência do *S. aureus* na pneumonia grave. Esta citolisina ativa o inflamassoma NLRP3 durante a infecção do parênquima pulmonar por *S. aureus* para induzir a produção de interleucina-1β e morte celular [28, 29]. Segundo Kebaier *et al.* [29] ratos NLRP3-/- desenvolvem pneumonia menos grave.

Os inflamassomas NLRP3 são importantes reguladores da inflamação e são essenciais para ativação proteolítica da caspase-1 [30]. Ao confrontar os resultados do NLRP3 com a expressão da enzima caspase-1, foi observado o mesmo perfil de transcrição. Corroborando com estes resultados, Mariathasan *et al.* [31] observaram fraca, mas significativa ativação caspase-1 após a infecção por *S. aureus* em macrófagos estimuladas com LPS. A caspase-1 é necessária para o processamento proteolítico e secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β e IL-18), como também indução de um tipo de morte celular, denominada piroptose. A piroptose é caracterizada por ruptura da membrana plasmática e a liberação do conteúdo intracelular pró-inflamatório [30]

Em infecções de pele por *Staphylococcus aureus,* Soong *et al.* [32] verificaram que esta bactéria promove a ativação da caspase-1 e desencadeia a morte dos queratinócitos, via piroptose. Enquanto os queratinócitos foram submetidos à degradação, os *S. aureus* proliferaram no espaço intracelular dos fagócitos, e desta forma escaparam da toxicidade dos produtos proteolíticos da piroptose. Em quadros de pneumonia grave, *S. aureus* ao ativar o inflamassoma NLRP3, a piroptose parece proteger este patógeno da resposta microbicida dos fagócitos, além de promover dano na arquitetura pulmonar e desta forma, facilitar a penetração das bactérias pela barreira epitelial [29].

Diante dos resultados encontrados neste estudo, pode-se sugerir que a infecção por

MRSA associado à agressão nutricional precoce induz quadros inflamatórios graves e de lesão tecidual extensa. Apesar da ativação simultânea do TLR e NLRP3 ser importante para a resposta imune inata rápida, seu perfil exacerbado induz o processo de morte celular descontrolado e assim, pode favorecer a disseminação do patógeno. Além disto, em decorrência da acentuada expressão do NLRP3, sugere-se que este receptor poderá ser um possível alvo para futuras intervenções farmacológicas em infecções graves por *S. aureus* meticilina resistente.

CONCLUSÃO

O modelo de desnutrição neonatal empregado programou redução da expressão de receptores extracelulares, intracelulares e da enzima caspase-1 nos macrófagos alveolares infectados *in vitro* com LPS. Entretanto, este tipo de resposta não foi observada na relação *S. aureus* versus hospedeiro, esta interação promoveu maior transcrição do RNA dos receptores e da enzima. Em relação ao perfil de sensibilidade a meticilina das cepas de *Staphylococcus aureus*, a resistência parece influenciar nos mecanismos de evasão da resposta microbicida, por induzir uma exacerbação da resposta imunológica via NLRP3. Este perfil de resposta foi instalado com o intuito de promover lesões teciduais por facilitar a disseminação da bactéria no organismo do hospedeiro. Ao associar a desnutrição neonatal à infecção por MRSA pode-se sugerir maior propensão para o desenvolvimento de quadros infecciosos graves e fatais, em decorrência do comprometimento da resposta microbicida e da intensidade do processo inflamatório provocado pela relação parasito-hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- Fisher RE, Steele M, Karrow AA (2012) Fetal Programming of the Neuroendocrine-Immune System and Metabolic Disease. J Preg. 1:1-11. doi:10.1155/2012/792934.

2- Palmer AC (2011) Nutritionally Mediated Programming of the Developing Immune System. American Society for Nutrition. 2: 377–395. doi:10.3945/an.111.000570.

3- Mcgettrick AF, O'neill LAJ (2010) Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. Curr Opin Immunol. 22(1):20-7.

4- Hilmi D, Parcina M, Stollewerk D, Ostrop J, Josten M, Meilaender A, Zaehringer U, Wichelhaus Ta, Bierbaum G, Heeg K, Wolz C, Bekeredjian-Ding I. (2014) Heterogeneity of Host TLR-2 Stimulation by Staphylocoocus aureus Isolates. PLOS ONE. 9(5): 1-11.

5- Iliakis D, Kressig RW (2014) The relationship between malnutrition and immune. Ther Umsch. 71(1):55-61. doi: 10.1024/0040-5930/a000481.

6- Schaible UE, Kaufmann SHE (2007) Malnutrition and Infection: Complex Mechanisms and Global Impacts. PLoS Medic. 4(5): 806-812. doi:10.1371/journal/pmed.0040115.t001.

7- Sun K, Metzger DW (2014) Influenza infection suppresses NADPH oxidase-dependent phagocytic bacterial clearance and enhances susceptibility to secondary methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. J Immunol. 192(7):3301-7. doi: 10.4049/jimmunol.1303049. Epub 2014 Feb 21.

8-Cutler RR (1979) Relationship between antibiotic resistance, the production of "virulence factors", and virulence for experimental animals in *Staphylococcus aureus*. J Med Microb. 2: 55-62.

9-França TGD, Ishikawa LLW, Zorzella-Pezavento SFG, Chiuso-Minicucci F, Guerino CPF, Cunha MLRS, Sartori A (2009) Immunization protected well nourished mice but not undernourished ones from lung injury in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. *BMC Microbiology*. **9**(240): 1-7.

10- Opilla M (2008) Epidemiology of bloodstream infection associated with parenteral nutrition. Am J Infect Control. 36: 5-8.

11- Morais NG, Costa TB, Almeida TM, Severo MS, De Castro CMMB. "Parâmetros imunológicos de macrófagos frente à infecção por *Staphylococcus aureus* meticilina sensível/resistente". J Bras Patol Med Lab. 2013; 49(2): 84-90. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442013000200002.

12- Chiba T, Itoh T, Tabuchi M, Nakazawa T, Satou T (2012) Interleukin-1β Accelerates the Onset of Stroke in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. Mediators of Inflammation. 1(1): 1-11.

13- Too HP (2003) Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. Molecular Brain Research, Amsterdam. 114: 146-154.

14- Gonçalves SC, Régis-da-Silva CG, Brito MEF, Brandão-Filho SP, Paiva-Cavalcanti M (2012) Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of leishmaniasis. The

Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 18(2): 188-197.

15- Costa TB, Morais NG, Almeida TM, Severo MS, De Castro CMMB (2012) Early malnutrition and production of IFN-γ, IL-12 and IL-10 by macrophages/lymphocytes: in vitro study of cell infection by methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Rev. Nutr. 25(5): 607-619. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732012000500006.

16- Araujo FRG, De Castro CMMB, Rocha JA, Sampaio B, Diniz MFA, Eve LB, Montarroyos UR (2012) Perialveolar bacterial microbiota and bacteraemia after dental alveolitis in adult rats that had been subjected to neonatal malnutrition. Brit J Nutrit, 107: 996–1005. doi: 10.1017/S000711451100393X.

17- Macedo EMC, Amorim MAF, Silva ACS, Castro CMMB (2010) Effects of copper, zinc and magnesium deficiency on the immune system of severely malnourished children. *Rev Paul Pediatr. 28(3):329-36.*

18- Bento-Santos A, Silveira LR, Manhães-De-Castro R, Leandro CG (2012) Perinatal undernutrition and hypothalamic control of food intake and energy metabolism in the skeletal muscle. Rev. Nutr., Campinas, 25(3):403-413.

19- Jann NJ, Schmaler M, Ferracin F, Landmann R (2011) TLR-2 enhances NADPH oxidase activity and killing of *Staphylococcus aureus* by PMN. Immunology Letters. 135(1–2): 17–23.

20- Nieters A, Beckmann L, Deeg E, Becker N (2006) Gene polymorphisms in Toll-like receptors, interleukin-10, and interleukin-10 receptor alpha and lymphoma risk. Genes and Immunity, Hampshire. 7(6): 615-24.

21- Mele T, Madrenas J (2010) TLR-2 signalling: At the crossroads of commensalism, invasive infections and toxic shock syndrome by *Staphylococcus aureus*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 42(7): 1066–1071.

22- Kurokawa K, Gong J, Ryu K, Zheng L, Chae J, Kim M, Lee BL (2011) Biochemical characterization of evasion from peptidoglycan recognition by Staphylococcus aureusD-alanylated wall teichoic acid in insect innate immunity. Developmental & Comparative Immunology. 35(8): 835–839.

23- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 124: 783-801.

24- Kurokawa K, Gong J, Ryu K, Zheng L, Chae J, Kim M, Lee BL (2011) Biochemical characterization of evasion from peptidoglycan recognition by Staphylococcus aureusD-alanylated wall teichoic acid in insect innate immunity. Developmental & Comparative Immunology. 35(8): 835–839.

25- Paiva-Oliveira EL, Silva AC, Silva RM, Sevenini LA, Melo HÁ, Lagrota-Candido JM, Quirino-Santos T (2012) Inflamassoma e sua Repercussão Clínica: Revisão da Literatura. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 11:340-347.

26- Pereira KNF, Vitoriano ILS, Melo MPP, Aragão RS, Toscano AE, Silva HJ, De Castro RM (2009). Effects of malnutrition and/or neonatal inhibition of serotonin reuptake in neuromuscular development of the gastrointestinal tract: review of literature. Neurob. 72(2): 215-21.

27- Franchi L, Muñoz-Planillo R, Núñez G (2012) Sensing and Reacting to Microbes via the Inflammasomes. Nature Immunology. 13(4):325-332.

28- Graves SF, Kobayashi SD, DeLeo FR (2010) Community-associated methicillin resistant*Staphylococcus aureus* immune evasion and virulence. J Mol Med. 88:109–14.

29- Kebaier C, Chamberland RR, Allen IC, Gao X, Broglie PM, Hall JD, Jania C, Doerschuk CM, Tilley SL, Duncan JA (2012) *Staphylococcus aureus* α-Hemolysin Mediates Virulence in a Murine Model of Severe Pneumonia Through Activation of the NLRP3 Inflammasome. J Infect Dis. 205(5): 807–817. doi: 10.1093/infdis/jir846.

30- Latz E (2010) The inflammasomes: mechanisms of activation and function Current Opinion in Immunology. 22: 28–33.

31- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. Nature. 440: 228–232.

32- *Soong G, Chun J, Parker D, Prince A (2012) Staphylococcus aureus* Activation of Caspase 1/Calpain Signaling Mediates Invasion Through Human Keratinocytes. The Journal of Infectious Diseases. 205(10): 1571-1579.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- *Em relação a comparação entre animais nutridos e desnutridos no período neonatal seguidos de reposição nutricional sobre a expressão dos receptores de reconhecimento padrão (TLR-2, TLR-4 e NLRP3), ativação e viabilidade dos macrófagos alveolares.*
    - A agressão nutricional incidindo nos períodos críticos de desenvolvimento promoveu:
        - Redução no crescimento corporal dos animais, evidenciado pelo baixo peso no desmame, persistindo até os 90 dias de vida.
        - Redução na produção de óxido nítrico, ânion superóxido e da viabilidade dos macrófagos alveolares infectados *in vitro* com LPS, detectáveis no organismo adulto mesmo após recuperação nutricional. Apesar dos níveis basais das citocinas IL-1β e da IL-18 não terem sofrido alterações, pode-se afirmar que a manipulação nutricional durante o período neonatal interfere com a programação de mecanismos microbicidas dos macrófagos, com consequências deletérias para o organismo adulto.
        - Redução da expressão de receptores extracelulares (TLR-2 e TLR-4), intracelulares (NLRP3), da expressão da enzima iNOS e caspase-1 nos macrófagos alveolares infectados *in vitro* com LPS. Este perfil de resposta compromete o reconhecimento e ativação dos fagócitos frente ao patógeno invasor, mecanismos essenciais para defesa do hospedeiro.

- *Em relação a comparação da expressão dos receptores de reconhecimento padrão (TLR-2, TLR-4 e NLRP3), ativação e viabilidade dos macrófagos alveolares infectados in vitro com MSSA e MRSA entre ratos submetidos ou não a desnutrição neonatal seguida de reposição nutricional.*
    - A resistência a meticilina parece influenciar nos mecanismos de evasão da resposta microbicida, por induzir redução do estresse nitrosativo e em contrapartida, por promover maior produção do ânion superóxido e morte celular. Desta forma, pode-se sugerir que este perfil de resposta pode

favorecer a instalação do processo infeccioso e induzir o desencadeamento de infecções graves e sistêmicas, em decorrência de lesões à distância via estresse oxidativo.

- Os baixos níveis de IL-1β e IL-18 no grupo desnutrido e infectado com MRSA podem indicar que o perfil pró-inflamatório (Th1) encontra-se comprometido, favorecendo a permanência da bactéria no organismo do hospedeiro. Estes resultados justificam as elevadas taxas de mortalidade em infecções por MRSA.
- A interação *S. aureus* versus hospedeiro promoveu maior expressão dos receptores TLR-2, TLR-4, NLRP3, da enzima iNOS e da caspase-1. Entretanto, MRSA x macrófagos desencadearam um perfil de expressão exacerbado via receptores TLR-2 e NLRP3. Apesar da ativação simultânea do TLR-2 e NLRP3 ser importante para a resposta imune inata rápida, seu perfil exacerbado induz o processo de morte celular descontrolado e assim, pode favorecer a disseminação do patógeno.
- Ao associar a desnutrição neonatal à infecção por MRSA pode-se sugerir maior propensão para o desenvolvimento de quadros infecciosos graves e fatais, em decorrência do comprometimento da resposta microbicida e da intensidade do processo inflamatório provocado pela relação parasito-hospedeiro.

Os resultados apresentados nesta tese mostraram a importância de se estudar possíveis sequelas das agressões nutricionais na resposta imune sofridas no período crítico de desenvolvimento e a resposta imune às infecções por bactérias multirresistentes. Apesar de existirem muitos dados sobre o efeito da desnutrição e o sistema imune, ainda há muito para ser investigado sobre seu efeito tardio pós-recuperação nutricional. Grande parte dos estudos é realizada em animais desnutridos, mas que não foram recuperados totalmente ou parcialmente da desnutrição. Desta forma, deixam lacunas quanto ao esclarecimento sobre o comportamento do sistema imune após recuperação total ou parcial do quadro de desnutrição promovido durante o período neonatal.

De acordo com os dados aqui obtidos, a desnutrição neonatal induziu danos permanentes na programação dos mecanismos microbicidas dos macrófagos, representadas

por déficit no estresse nitrosativo e descontrole no oxidativo, ambos essenciais para uma resposta antimicrobiana eficaz. Ao associar à infecção por MRSA, ocorreu desregulação da expressão dos receptores TLR-2, NLRP3 e da enzima caspase-1. Este perfil de resposta pode induzir lesões teciduais extensas, favorecer a permanência e a disseminação destas bactérias. Assim, pode-se sugerir que a infecção por MRSA versus à agressão nutricional precoce induz quadros inflamatórios graves e de lesão tecidual extensa.

Em virtude disto, as informações geradas neste trabalho permitem aplicar perspectivas de estudos futuros, utilizando o mesmo modelo animal e de infecção *in vitro*. Uma das abordagens futuras seria analisar: o perfil da expressão de citocinas (IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 e IFN-δ) e de importantes representantes da cascata de ativação intracelular (MyD88; NF-kβ; SARM); a produção da imunoglobulina E (IgE) antiestafilococo e caracterizar, genotipicamente e fenotipicamente, as cepas de *S. aureus*, quanto aos seus fatores de virulência.

Uma outra linha proposta por esta pesquisa seria avaliar, neste mesmo modelo de desnutrição neonatal a evolução da infecção *in vivo*, através da dosagem de radicais livres, citocinas pró e anti-inflamatórias, receptores de reconhecimento padrão e enzimas importantes para a resposta microbicida. Esta nova abordagem, teria o intuito de analisar a resposta imunológica atuando com todos os seus constituintes moleculares e celulares. Mais um aspecto que também poderia ser abordado é o efeito da imunização prévia com antígenos *S. aureus* meticilina sensível/meticilina resistente na susceptibilidade a infecção por esta bactéria.

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 crescimento e desenvolvimento dos sistemas orgânicos. Assim, ressalta-se que o conhecimento das respostas em organismos precocemente desnutridos, mesmo após longo período de recuperação nutricional (de grande prevalência em nossa região), poderá contribuir para o esclarecimento das alterações morfofuncionais ocorridas no início da vida, sua íntima relação com as modificações na resposta microbicida, além de promover subsídios para estudos posteriores sobre patogênese/tratamento de doenças infecciosas causadas por *S. aureus*.

REFERÊNCIAS

1. CHEN, G.; PEDRA, J.H.F. The Inflammasome in Host Defense. *Sensors*, 10: 97-111, 2010.
2. AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell.; 124: 783-801; 2006.
3. ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. Metrocamp Pesquisa, 1(1): 37-58, 2007.
4. BÁRTHOLO; R.M.; BÁRTHOLO, T.P. Imunidade inata e a importância dos receptores Toll-similar. The innate immunity and the importance of the toll-like receptors. Pulmao, RJ. Supl. 2: S2-S8, 2009.
5. BENTO-SANTOS, A.; SILVEIRA, L. R, MANHÃES-DE-CASTRO, R.; LEANDRO, C.G. Perinatal undernutrition and hypothalamic control of food intake and energy metabolism in the skeletal muscle. Rev. Nutr., Campinas, 25(3):403-413, 2012.
6. CARPENTER, S.; RICCI, E.P.; MERCIER, B.C.; MOORE, M.J.; FITZGERALD, K.A. Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity. NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY REVIEW. 14:361-376, 2014. doi:10.1038/nri3682
7. CARVALHO, R.L.B.; BEREZIN, E.N.; MIMICA, M.J. Detection of *lukS-PV* and *lukF-PV* in *Staphylococcus aureus* pediatric isolates. Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Medicas Santa Casa de São Paulo. 57(2): 59-62, 2012.
8. CHANDRA, R.K. Nutrition and the immune system from birth to old age. Eur. J. Clin. Nutr. 56(3): 73-76, 2002. doi:10.1038/sj.ejcn.1601492.
9. COELHO-CASTELO, A.A.M.; TROMBONE, A.P.F.; ROCHA, C.D.; LORENZI, J.C.C. Immune response to infectious diseases. Medicina (Ribeirão Preto). 42(2): 127-42, 2009.
10. COSTA, T.B.; MORAIS, N.G.; ALMEIDA, T.M.; SEVERO, M.S.; DE CASTRO, C.M.M.B. Early malnutrition and production of IFN-δ, IL-12 and IL-10 by macrophages/lymphocytes: in vitro study of cell infection by methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Revista de Nutrição; 25(5): 607-619, 2012. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732012000500006.
11. CRAVEN, R.R.; GAO, X.; ALLEN, I.C.; GRIS, D.; WARDENBURG, J.B.; TEKIPPE, E.M.; TING, J.P.; DUNCAN, J.A. Staphylococcus aureus a-Hemolysin

Activates the NLRP3-Inflammasome in Human and Mouse Monocytic Cells. PLoS ONE. 4(10): 7446-7457, 2009.

12. CRUVIEL, W.M.; JÚNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.C. 2010. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. Rev Bras Reumatol. 50(4): 434-61.
13. CRUZ, C.M.; RINNA, A.; FORMAN, H.J.; VENTURA, A.L.; PERSECHINI, P.M.; OJCIUS, D.M. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. J Biol Chem; 282:2871–9, 2007.
14. CHIBA, T.; ITOH, T.; TABUCHI, M.; NAKAZAWA, T.; SATOU, T. Interleukin-1β Accelerates the Onset of Stroke in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. 2 Mediators of Inflammation. 1(1): 1-11, 2012.
15. 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 Physiology, v.79, p: 1271-1277, 1995.
16. DELEO, F.R.; DIEP, B.; OTTO, M. Host Defense and Pathogenesis in Staphylococcus aureus Infections. J Immun, 180: 500 –509, 2009.
17. DURÁN, A; ALVAREZ-MON, M.; VALERO, N. Role of toll-like receptors (TLRs) and nucleotide-binding oligomerization domain receptors (NLRs) in viral infections. Invest Clin. 55(1): 61-81, 2014.
18. DURAN, N.; OZER, B.; DURAN, G.G.; ONLEN, Y.; DEMIR, C. Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. Indian J Med Res. 135(3): 389–396. 2012.
19. FERRAZ, E.G.; SILVEIRA, B.B.B.; SARMENTO, V.A.; SANTOS, J.N. Toll-Like Receptors: regulation of the immune responses, RGO - Rev Gaúcha Odontol., Porto Alegre, 59(3): 483-490, 2011.
20. FERREIRA SILVA, W.T.; GALVÃO, B.A.; FERRAZ, P.K.N.; DE CASTRO, C.M.M.B.; DE CASTRO, R.M. Perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide release by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rat. Neuroimmunomod. 23: 120-129, 2008.

21. 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, 117(11): 1967-1975, 1987.
22. FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. NITRIC OXIDE SYNTHASES: REGULATION AND FUNCTION, EUR HEART J. 33(7): 829-837, 2012.
23. FORTIN, C.F.; MCDONALD, P.P.; FÜLÖP, T.; LESUR, O. Sepsis, leukocytes, and nitric oxide (NO): an intricate affair. Shock. 33(4): 344-52, 2010. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181c0f068.
24. FRANÇA, T.G.D.; ISHIKAWA, L.L.W.; ZORZELLA-PEZAVENTO, S.F.G.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; GUERINO, C.P.F.; CUNHA, M.L.R.S.; SARTORI, A. Immunization protected well nourished mice but not undernourished ones from lung injury in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. *BMC Microbiology*. **9**(240): 1-7, 2009.
25. GAO, C.; GUO, H.; MI, Z.; GRUSBY, M.J.; KUO, P.C. Osteopontin Induces Ubiquitin-Dependent. The Journal of Immunology. 178, 1870-1881, 2007**.** doi: 10.4049/jimmunol.
26. GRANT, S.S.; HUNG, D.T. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. Landes Bioscience, 4(4): 273–283, 2013.
27. GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Apoptosis: Programmed Cell Death. Revista Brasileira de Cancerologia. 53(3): 335-343, 2007.
28. GONÇALVES, S.C.; RÉGIS-DA-SILVA, C.G.; BRITO, M.E.F.; BRANDÃO-FILHO, S.P.; PAIVA-CAVALCANTI, M. Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of leishmaniasis. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 18(2): 188-197, (2012).
29. HALES, C.N.; BARKER, D.J. Type 2 (non-insulindependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia. 35(7): 595-601, 1992.
30. HALLE, A.; HORNUNG, V.; PETZOLD, G.C. STEWART, C.R.; MONKS, B.G.; REINHECKEL, T.; FITZGERALD, K.A.; LATZ, E.; MOORE, K.J.; GOLENBOCK, D.T. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. Nat Immunol; 9:857–65, 2008.

31. HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. American Society of Plant Biologists. 141(2): 312-322, 2011.
32. HARKNESS, J.E. Biologia e manejo. In Biologia clínica de coelhos e roedores. Roca, 2: 9-55, 1993.
33. HENNESSY, E.J.; PARKER, A.E.; O'NEILL, L.A.J. Targeting Toll‑like receptors: emerging therapeutics?Nature Ver Drug Discov. 9:293- 307, 2010.
34. HORVATH, G.L.; SCHRUM, J.L.; NARDO, C.M.; LATZ, E. Intracellular sensing of microbes and danger signals by the inflammasomes. Immunol Rev. 243(1): 119–135, 2011. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01050.x.
35. HUME, D. A. The mononuclear phagocyte system. Curr Opin Immunol. 18: 49-53, 2006.
36. ICHINOHE, T.; LEE, H.K.; OGURA, Y.; FLAVELL, R.; IWASAKI, A. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. J Exp Med. 206: 79–87, 2009.
37. ILIAKIS, D.; KRESSIG, R.W. The relationship between malnutrition and immune. Ther Umsch. 71(1):55-61, 2014.
38. IMANISHI, N.; ANDOH, T.; SAKAI, S.; SATOH, M.; KATADA, Y.; UEDA, K.; TERASAWA, K.; OCHIAI, H.; Induction of inducible nitric oxide (NO) synthase mRNA and NO production in macrophages infected with influenza A/PR/8 vírus and stimulated with Its ether-split product. Microbiology and Immunology, 49(1): 41-48, 2005.
39. JANN, N.J.; SCHMALER, M.; FERRACIN, F.; LANDMANN, R. TLR-2 enhances NADPH oxidase activity and killing of *Staphylococcus aureus* by PMN. Immunology Letters. 135(1–2): 17–23, 2011.
40. JONES, K.D.J.; BERKLEY, J.A.; WARNER, J.O. Perinatal nutrition and immunity to infection .Pediatric Allergy and Immunology. 21 (4): 564–576, 2010.
41. KÖHLER, J.; BREITBACH, K.; RENNER, C.; HEITSCH, A.K.; BAST, A.; ROOIJEN, N.; VOGELGESANG, S. STEINMTZ, I. NADPH-oxidase but not inducible nitric oxide synthase contributes to resistance in a murine *Staphylococcus aureus*Newman pneumonia model. Microbes and Infection. 13 (11): 914–922, 2011.

42. KUBICA, M.; GUZIK, K.; KOZIEL, J.; ZAREBSKI, M.; RICHTER, W.; GAJKOWSKA, B. Potential New Pathway for Staphylococcus aureus Dissemination: The Silent Survival of S. aureus Phagocytosed by Human Monocyte-Derived Macrophages, PLoS ONE; 3: 1409-1435, 2008.
43. LAMKANFIA, M.; KANNEGANTIC, T.D. Nlrp3: An immune sensor of cellular stress and infection. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 42: 792–795, 2010.
44. LATZ, E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function Current Opinion in Immunology. 22: 28–33, 2010.
45. LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J.M.; HOFFMANN, J.A. The dorsoventral regulatory gene cassete spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults, Cell, 86, 973-983, 1996.
46. LU, Y.F.; MCEWAN, N.A. Staphylococcal and micrococcal adherence to canine and feline corneocytes: quantification using a simple adhesion assay. Veterinary Dermat. 18: 29–35, 2007.
47. MACÊDO, E.M.C.; AMORIM, *M.A.F.;* SILVA, A.C.S.; CASTRO, C.M.M.B. Effects of copper, zinc and magnesium deficiency on the immune system of severely malnourished children. Rev Paul Pediatr. 28(3): 329-36, 2010.
48. MANKAN, A.K.; KUBARENKO, A.; HORNUNG, V. Immunology in clinic review series; focus on autoinflammatory diseases: inflammasomes: mechanisms of activation. The Journal of Translational Immunology. 167: 369–381, 2011. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04534.x.
49. MARIANO, F.A.; FOLLY, M.M.; TEIXEIRA, G.N.; CARMO, L.S.; MOTTA, O.V. Enterotoxins production by Staphylococcus isolated from milk of goats from Rio de Janeiro state. Revista Brasileira de Ciências e Veterinária. 14(2): 105-110, 2007.
50. MARIATHASAN, S.; MONACK, D.M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. Nature Reviews Immunology, January, 7: 31-41, 2007.
51. MARIATHASAN, S.; WELSS, K.; NEWTON, K.; MCBRIDE, J.; O'ROURKE, K.; GIRMA, M.; LEE, W.P. WEINRAUCH, Y.; MONACK, D.M.; DIXIT, V.M. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. Nature. 440, 228-232, 2006.

52. MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasome: guardians of the body. Annu Rev Immunol. 27:229-235, 2009.
53. MARTINON, F.; TSCHOPP, J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens TRENDS in Immunology, 26(8), 2005.
54. MATOUSKOVA, I.; JANOUT, V. Current knowledge of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 152(2): 191-202, 2008.
55. MCGETTRICK, A.F.; O'NEILL, L.A.J. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. Curr Opin Immunol. 22(1):20-7, 2010.
56. MELE, T.; MADRENAS, J. TLR-2 signalling: At the crossroads of commensalism, invasive infections and toxic shock syndrome by *Staphylococcus aureus*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 42(7): 1066–1071, 2010.
57. MELO, J.F.; MACEDO, E.M.C.; SILVA, R.P.P.; VIANA, M.T.; SILVA, W.T.F.; CASTRO, C.M.M.B. Efeito da desnutrição neonatal sobre o recrutamento celular e a atividade oxidante-antioxidante de macrófagos em ratos adultos endotoxêmicos. Revista de Nutrição, 21(6): 683-694, 2008. doi: http://dx. doi.org/10.1590/S1415-52732008000600007.
58. MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C.A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activaction of adaptative immunity. Nature. 388(6640): 394-397, 1997.
59. MILLER, L.S.; PIETRAS, E.M.; URICCHIO, L.H.; HIRANO, K.; RAO, S.; LIN, H.; O'CONNELL, R.M.; IWAKURA, Y.; CHEUNG, A.L.; CHENG, G.; MODLIN, R.L. Inflammasome-mediated production of IL-1beta is required for neutrophil recruitment against Staphylococcus aureus in vivo. J Immunol 179: 6933–6942, 2007.
60. MILLER, L.G.; KAPLAN.S.L. *Staphylococcus aureus*: a community pathogen. Infect. Dis. Clin, N. Am. 23: 35-52, 2009.
61. MORAIS, N.G.; COSTA, T.B.; ALMEIDA, T.M.; SEVERO, M.S.; DE CASTRO, C.M.M.B. Parâmetros imunológicos de macrófagos frente à infecção por Staphylococcus aureus meticilina sensível/resistente. J Bras Patol Med Lab. 49(2): 84-90, 2013. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442013000200002.

62. MORGANE, P.J. Malnutrition and the development of the brain. Neurosci. Biobehav. Rev., 17: 91-128, 1993.
63. MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol. 8:958-69, 2008.
64. MURPHY, J.; WASLSHE, R.; DEVOCELLE, M. A computational modelo f antibiotic resistance mechanisms in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). J. Theor. Biol. 254:284-293, 2008.
65. MURPHY, M.P.; HOLMGREN, A.; LARSSON, N.G.; HALLIWELL, B.; CHANG, C.J.; KALYANARAMAN, B.; RHEE, S.R.; THORNALLEY, P.J.; PATRIDGE, L.; GEMS, D.; NYSTROM, T.; BELOUSOV, V.; SCHUMACKER. P.T.; WINTERBOURN, C.C. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. Cell Metabolism. 13: 361-367, 2011.
66. NIETERS, A.; BECKMANN, L.; DEEG, E.; BECKER, N. Gene polymorphisms in Toll-like receptors, interleukin-10, and interleukin-10 receptor alpha and lymphoma risk. Genes and Immunity, Hampshire. 7(6): 615-24, 2006.
67. NIZET, V. Understanding how leading bacterial pathogens subvert innate immunity to reveal novel therapeutic targets. J Allergy Clin Immunol. 120(1): 13-22, 2007.
68. OH, J.E.; LEE, H.K. Pattern recognition receptors and autophagy. Front. Immunol. 24, 2014. doi: 10.3389/fimmu.2014.00300.
69. PAIVA-OLIVEIRA, E.L.; SILVA, A.C.; SILVA, R.M.; SEVENINI, L. A.; MELO, H.A.; LAGROTA-CANDIDO, J.M.; QUIRINO-SANTOS, T. Inflamassoma e sua Repercussão Clínica: Revisão da Literatura. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 11, 2012.
70. PALMER, A.C. Nutritionally Mediated Programming of the Developing Immune System. American Society for Nutrition. 2: 377–395, 2011. doi:10.3945/an.111.000570.
71. PEREIRA, K.N.F.; VITORIANO, I.L.S.; MELO, M.P.P; ARAGÃO, R.S.; TOSCANO, A.E.; SILVA, H.J.; DE CASTRO, R.M.; Effects of malnutrition and/or neonatal inhibition of serotonin reuptake in neuromuscular development of the gastrointestinal tract: review of literature; Neurobiologia, 72(2), 2009.

72. PEREZ, L.R.R.; D'AZEVEDO, P.A. Clonal types and antimicrobial resistance profiles of methicillin-ressitant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in South Brazil. Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 50(3): 135-137, 2008.
73. PETRILLI, V.; PAPIN, S.; DOSTERT, C.; MAYOR, A.; MARTINON, F.; TSCHOPP, J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. Cell Death Differ; 14:1583–9, 2007.
74. QIANG, L.; TAIFENG, Z.; YING, L.; JINGJING, X.; GAIQI, Y. Risk factors affecting nasal colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* when admitted in intensive care unit. Chinese Medical Journal. 127 (10): 1804-1808, 2014. doi: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20140050.
75. ROBINSON, S.; FALL, C. Infant Nutrition and Later Health: A Review of Current Evidence. *Nutrients*, *4*, 859-874, 2012. doi:10.3390/nu4080859.
76. RYU, S.; SONG, P.I.; SEO, C.H.; CHEONG, H.; PARK, Y. Colonization and Infection of the Skin by *S. aureus*: Immune System Evasion and the Response to Cationic Antimicrobial Peptides. *International Journal of Molecular Sciences15*, 2014. doi: 8753-8772; doi:10.3390/ijms15058753.
77. SANTOS, A.L. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. J Bras Patol Medic Laborat. 43(6): 413-23, 2007.
78. SCHAIBLE, U.E.; KAUFMANN, S.H.F. Malnutrition and Infection: Complex Mechanisms and Global Impacts. PLoS Medicine .4(5): 115-122, 2007.
79. SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasomes. Cell, 140(19): 821–832, 2010.
80. SEO, H.S.; MICHALEK, S.M.; NAHM, M.H. Lipoteichoic acid is importante in innate imune responses to gram-positive bacteria. Infec . Immun., 76 (1): 206-213, 2008.
81. SHIBABAWQ, A.; ABEBE, T.; MIHRET, A. Antimicrobial susceptibility pattern of nasal Staphylococcus aureus 3 among Dessie Referral Hospital health care workers, Dessie, Northeast Ethiopia. International Journal of Infectious Diseases. xxx:1–4, 2014. doi: 10.1016/j.ijid.2014.03.1386.
82. SIBBALD, M.J.J.B.; ZIEBANDT, A.K.; ENGELMANN, S.; HECKER, M.; JONG, A.; 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, 70(3): 755-788, 2006.

83. STUART, L.M.; EZEKOWITZ, A.B. Phagocytosis: Elegant Complexity. Immunity, 22: 539–550, 2005.
84. SUTTERWALA, F.S; OGURA, Y; SZCZEPANIK, M; LARA-TEJERO, M; LICHTENBERGER, G.S.; GRANT, E.P.; BERTIN,J; COYLE,A.J; GALA, J.E.; ASKENASE, J.W.; FLAVELL1, R.A. Critical Role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in Innate and Adaptive Immunity through Its Regulation of Caspase-1. Immunity, 24: 317–327, 2006.
85. TEGNÉR, J.; NILSSON, R.; BAJIC, V.B.; BJÖRKEGREN, J.; RAVASI, T. Systems biology of innate immunity. Cellular Immunology, 244: 105-109, 2007.
86. TIZARD, I.R. Imunologia básica – uma introdução. Roca Ltda, São Paulo, 9° edição, 147-159. 2011.
87. TOO, H.P. Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. Molecular Brain Research, 114: 146-154, 2003.
88. TORRACA, V.; MASUD, S.; SPAINK, H.P.; MEIJER, A.H. Macrophage-pathogen interactions in infectious diseases: new therapeutic insights from the zebrafish host model. Disease Models & Mechanisms. 7: 785-797, 2014. doi:10.1242/dmm.015594
89. VANCINI, R. L., LIRA, C. A. B. D., GUEDES JÚNIOR, D. P., SILVA, A. C. D., & NOUAILHETAS, V. L. A. Influência do exercício sobre a produção de radicais livres. Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde, 10(2): 47-58, 2012.
90. YANG, Z.; MING, X. ARGINASE: THE EMERGING THERAPEUTIC TARGET FOR VASCULAR OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION. Front immunol. 4(149): 1:13, 2013.
91. ZOU N, A.O.L.; CLEVELAND-JR, J.C.; YANG, X.; SU, X.; CAI, G.Y. Critical role of extracelllar heat shock cognate protein 70 in the myocardial inflamatory response and cardiac dysfunction after global ischemia-reperfusion. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 294: 2805-2813, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Planilha De Evolução Ponderal

PLANILHA DE EVOLUÇÃO PONDERAL

Projeto de Doutorado: Natália Morais

GRUPO: _____ GAIOLA:_____ D.N.:_____/_____/_____.

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

OBSERVAÇÕES:

GRUPO EXPERIMENTAL (desnutrição neonatal)

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

GRUPO CONTROLE

- Até o 21º dia, as mães serão alimentadas com caseína a 17% e os filhotes serão pesados diariamente

- A partir do 22º dia, os filhotes passarão a ser alimentados com Labina®. A partir de agora, os filhotes serão pesados em dias alternados.

APÊNDICE B – EFEITOS TARDIOS DA DESNUTRIÇÃO NEONATAL NA RESPOSTA MICROBICIDA, PRODUÇÃO DE CITOCINAS E VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS NA INFECÇÃO POR Staphylococcus aureus SENSÍVEL/RESISTENTE A METICILINA[1]

Natália Gomes de Morais[1], Thacianna Barreto da Costa[1], Maiara Santos Severo[3], Célia Maria Machado Barbosa de Castro[4]

[1]Doutorandas em Medicina Tropical pela Universidade Federal de Pernambuco.
[2]Doutora em Entomologia pela Universidade da Califórnia Riverside.
[3]Professora Associada 4 da Universidade Federal de Pernambuco.

Título abreviado: Desnutrição e infecção por MSSA e MRSA

1, 3. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Campus Universitário, s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: MORAIS, N.G. E-mail: morais.ngm@gmail.com.
2. Universidade da California Riverside, Genomics Building, Center for Disease Vector Research, Dept of Entomology, University Avenue, 92521, Riverside, Estados Unidos.

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar função microbicida e viabilidade de macrófagos, após infecção celular *in vitro*, com *Staphylococcus aureus* sensível/resistente a meticilina, em ratos nutridos ou submetidos à desnutrição neonatal. **MÉTODOS:** Ratos machos Wistar (n=40) foram divididos em dois grupos distintos: Nutrido (ratos amamentados por mães submetidas à dieta com 17% de caseína) e Desnutrido (ratos amamentados por mães submetidas à dieta com 8% de caseína). Os macrófagos foram recuperados após procedimento cirúrgico de traqueostomia, através da coleta do lavado broncoalveolar. Após o isolamento dos mononucleares, foram estabelecidos quatro sistemas: controle negativo, composto apenas pelos fagócitos; controle positivo, macrófagos mais lipopolissacarídeo; e dois sistemas teste, macrófagos mais *Staphylococcus aureus* sensível e resistente a meticilina. As placas foram incubadas por 24h à 37ºC, com atmosfera úmida e 5% de CO_2. Transcorrido este período, foram realizados ensaios para análise da resposta microbicida, produção de citocinas e viabilidade celular. Na análise

estatística, utilizou-se ANOVA, admitindo-se $p<0,05$. **RESULTADOS:** A desnutrição acarretou redução do crescimento ponderal dos animais, da taxa de fagocitose, da produção de óxido nítrico, do ânion superóxido e da viabilidade de macrófagos. Houve menor produção de nitrito, de interleucina 1β, 18 e da viabilidade dos macrófagos infectados com *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente. **CONCLUSÃO:** O modelo de desnutrição neonatal adotado comprometeu a função dos fagócitos com redução da resposta microbicida e da viabilidade celular. A interação de desnutrição com cepa resistente induziu baixa produção de mediadores inflamatórios por células efetoras da resposta imunológica, o que poderá resultar em comprometimento da defesa.

Termos de indexação: Desnutrição; Macrófagos*; Staphylococcus aureus;* Meticilina.

INTRODUÇÃO

Agressões ambientais em períodos vulneráveis do desenvolvimento do organismo são capazes de afetar de forma permanente a estrutura e função de órgãos e tecidos. Esta vulnerabilidade está associada ao intenso processo de diferenciação e maturação sofrido pelos sistemas orgânicos nestas fases[1]. Estudos demonstram que a desnutrição neonatal pode comprometer a formação dos sistemas de homeostase, como o nervoso, endócrino e imune[2,3].

Segundo Chandra[2], a desnutrição neonatal interfere com a programação de mecanismos funcionais dos macrófagos, provocando modificações duradouras, detectáveis no organismo adulto, mesmo após longa recuperação nutricional. Indivíduos desnutridos podem apresentar deficiência na função microbicida dos fagócitos, como: redução na produção de citocinas pró-inflamatórias, radicais livres (óxido nítrico e ânion superóxido), e a viabilidade dos macrófagos, tornando o organismo ainda mais vulnerável às infecções[4,5].

A invasão do organismo por patógenos pode causar desregulação na resposta microbicida das células do sistema imune[6]. Este mecanismo é desencadeado por vários micro-organismos, por facilitar o desenvolvimento do processo infeccioso e propiciar maior tempo de sobrevivência no hospedeiro[7]. A fim de conseguir estabelecer uma infecção, *Staphylococcus aureus* tem desenvolvido vários mecanismos para resistir a resposta imunológica.

Desde a década de 60, a infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) constitui grave problema para a saúde pública mundial por estar relacionada, a maiores taxas de mortalidade do que as provocadas pelo *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA)[8]. Acredita-se que cepas MRSA possuam mecanismos distintos de virulência, que

podem ser mais exacerbados quando comparados às cepas MSSA[9]. Inúmeros estudos clínicos baseados em taxas de morbidade e mortalidade indicam que o MRSA é mais virulento que o MSSA. Contudo, estudos laboratoriais que avaliam a presença e magnitude de mecanismos patogênicos e fatores de virulência das cepas de MSSA e MRSA obtiveram resultados conflitantes[5,10].

Apesar dos diversos estudos utilizando modelos de desnutrição, ainda existem várias lacunas sobre a desnutrição neonatal seguida de reposição nutricional e seus efeitos tardios na resposta imune. Além disso, são escassos os trabalhos que avaliam as interações entre infecção e desnutrição. Dessa forma, o presente estudo foi delineado para analisar o impacto da desnutrição neonatal sobre a função microbicida, produção de citocinas e viabilidade dos macrófagos alveolares infectados, *in vitro*, com *Staphylococcus aureus* meticilina sensível e meticilina resistente. Dentro deste contexto, a experimentação com animais poderá contribuir para o esclarecimento das alterações morfofuncionais ocorridas no início da vida, e sua íntima relação com o comprometimento da resposta microbicida, surgimento e evolução de doenças infecciosas.

MÉTODOS

Animais e Dieta

Foram utilizados 40 ratos machos, albinos, da linhagem *Wistar* (90-120 dias), provenientes da colônia do Biotério do Departamento de Nutrição, da Universidade Federal de Pernambuco. Os experimentos foram baseados nas recomendações éticas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.* E foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) (número do protocolo: 23076.026684/2009-38). Os animais foram mantidos em temperatura controlada (22ºC Desvio-padrão DP= 1°C) com ciclo fotoperiódico de claro-escuro de 12:12h e com livre acesso à água e à ração.

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 filhotes amamentados por mães submetidas à dieta contendo 17% de proteína à base de caseína utilizada como fonte protéica (n=20); Desnutrido (D) - constituído por filhotes amamentados por mães submetidas à dieta contendo 8% de proteína à base de caseína utilizada como fonte protéica

(n=20), durante os primeiros 21 dias após o nascimento. A caseína 8% é bastante utilizada como modelo experimental para estudo da desnutrição, por induzir, nos animais, quadro de desnutrição protéica[11].

Durante o período neonatal, foram registrados diariamente (em balança eletrônica digital – Marte, modelo S-4000-com sensibilidade de 0,1g) os pesos corporais de cada animal, a fim de acompanhar o peso corporal durante a manipulação nutricional. A partir do 22º dia de vida até o final do experimento, o peso corporal foi aferido três vezes por semana, com objetivo de acompanhar a recuperação nutricional dos animais. Neste período, os animais foram separados de suas mães, mantidos em gaiolas coletivas contendo três 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 *S. aureus* meticilina resistente (The American Type Culture Collection – ATCC 33591) e *Staphylococcus aureus* metilicina sensível (ATCC 29213) pelo seu perfil distinto de resistência e por sua importância em termos de saúde pública. As bactérias 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 a 5%) e incubadas em estufa a 37ºC. No início do ensaio, algumas colônias foram transferidas para tubos contendo Phosphate Buffer Saline (PBS) estéril, de forma a se obter, com auxílio de espectrofotômetro a 570nm, uma turbidez de aproximadamente 0,15nm. Esta absorbância, segundo Lu & McEwan[12], corresponde aproximadamente à concentração de 10^6 bactérias/mL de PBS.

Lavado broncoalveolar (LBA). O lavado broncoalveolar (LBA) foi obtido de acordo com a técnica desenvolvida por De Castro *et al.* 1995. Os animais foram anestesiados com cloralose-uretana (0,5 e 12,5% respectivamente) na proporção de 8mL/kg i.p. O LBA foi coletado com a injeção de salina a 0,9% através de uma cânula plástica inserida na traquéia. Várias alíquotas de 3mL foram injetadas e coletadas em tubos cônicos de polipropileno de 50mL (Falcon, Sigma).

Cultura de macrófagos alveolares (MA). Centrifugou-se as amostras do LBA recolhido, a 1500rpm durante 15min. O precipitado que corresponde às células foi ressuspendido em RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute médium - Gibco-Invitrogen Corporation) contendo 3% de soro fetal bovino (Gibco-Invitrogen Corporation) e antibióticos (penicilina

100U/mL e estreptomicina 100µg/mL). As células foram transferidas para placas de cultura de 35mm de diâmetro (6 poços, Falcon), onde foram dispensados 2mL da suspensão em uma proporção de 10^6 células/mL de RPMI 1640 em cada poço. Após 1h na incubadora a 37°C e 5% CO_2, desprezou-se o sobrenadante com as células não-aderentes e adicionou-se 2mL de meio RPMI, deixando-se as placas por mais 1h em incubadora para estabilização das células.

Sistemas. Para avaliação do índice de aderência (IA), fagocitose e produção de superóxido, foram estabelecidos três sistemas: controle (C), contendo apenas macrófagos alveolares; MSSA, MA mais 100µL de inoculo bacteriano referente à cepa sensível (ATCC 29213); MRSA, MA mais 100µL de inoculo bacteriano da cepa resistente (ATCC 33591). Para avaliação da cinética do óxido nítrico e a viabilidade dos macrófagos alveolares foi adicionado o controle positivo - CP, contendo MA mais 10µL de LPS (sorotipo de *Escherichia coli;* 055:B5, Sigma). Posteriormente, as placas foram incubadas à 37ºC, com atmosfera úmida e 5% de CO_2.

Avaliação do índice de aderência (IA). Após 1 hora de incubação das culturas de células, foram retiradas alíquotas dos sobrenadantes contendo células não aderentes e os poços da placa de cultura ressuspendidos com RPMI. Essas aliquotas, contendo as células não aderentes foram adicionadas ao corante azul Tripan na diluição de 1:10 e as células foram contadas no hemocitômetro. O IA foi calculado através da fórmula descrita por De La Fuente *et al.*[13]. Fórmula utilizada: IA = 100 – células não aderidas/mL divididas por n.º inicial de células/mL x 100.

Determinação da taxa de fagocitose. Para este ensaio, à suspensão de 10^6 células/mL de RPMI 1640 foi adicionado o inoculo bacteriano, para ambas as cepas, na concentração de 10^6 UFC/mL de PBS, sendo o volume final de 1,5mL para cada tubo. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado, distribuído delicadamente e de maneira uniforme sobre lâminas para microscopia óptica. 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 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[14].

Análise da produção do ânion superóxido (O_2^-). O O_2^- foi induzido pela adição de acetato miristato de forbol/PMA (Sigma) em solução de Hanks (HBSS, Gibco-Invitrogen Corporation), na concentração de 2µg/mL. Foram preparados os sistemas de análise

descontínua com avaliação a cada 1 hora, por 2 horas. A especificidade do ensaio foi garantida pela adição de superóxido dismutase (SOD) de eritrócitos bovinos contendo 3000U/mg de proteína em solução final de 3mg/mL em água destilada (Sigma)[15].

Cinética da Produção de Óxido Nítrico por Macrófagos Alveolares. A produção de NO foi determinada a partir da concentração de nitrito no sobrenadante das células em cultura[10]. Foram retirados 100µL do sobrenadante das culturas a cada duas horas num total de 24 horas de incubação. Para a quantificação de nitritos e nitratos, foram acrescentados 50µL do reagente de Griess (1,5% de sulfanilamida em 5% de H_3PO_4, 0,1% em H_20 de naftiletilene diamine diidrocloride) aos sobrenadantes. Após repouso de 15 minutos à temperatura ambiente, foi realizada leitura em leitor de ELISA (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay - BIO-RAD, Model 680) com filtro de 550nm. A concentração de nitrito foi calculada através de valores médios de uma curva padrão de $NaNO_2$ e os dados expressos em µM.

Quantificação das citocinas: IL-1β e IL-18 (intercelucina-1β e interleucina-18). Após 24h de incubação das culturas de células, foram coletados 100µL do seu sobrenadante. A partir deste sobrenadante, as citocinas IL-1β e IL-18 foram dosadas através do teste imunoenzimático ELISA, utilizando kit *Quantikineâ m* (R&D Systems).

Viabilidade dos Macrófagos Alveolares. A viabilidade celular foi avaliada pela redução mitocondrial do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo de difenil tetrazólico) à formazam[16]. Após 24 horas de incubação, as culturas de células foram lavadas com PBS (1X) a temperatura ambiente. Sob proteção da luz, foram incubadas, por duas horas, com 550µL de PBS e 55µL de solução de MTT. Transcorrido este período de tempo, acrescentou-se 200µL de PBS e 200µL DMSO, e raspou-se a monocamada celular com um *"scrape"*. A quantificação do formazam solubilizado foi realizada em leitor de ELISA (BIO-RAD, Model 680), com filtro de 570nm. Os resultados foram expressos em absorbância de formazam por $1x10^6$ células.

Análise Estatística. Na análise do peso corporal e da taxa de fagocitose foi utilizado o teste t Student. Em relação às outras análises, foi empregada a Análise de Variância (ANOVA), para os dados paramétricos. Quando a ANOVA revelou a existência de diferença significativa foi utilizado o Teste de Tukey, a fim de identificar que grupos diferiram entre si. A significância foi definida para $p<0,05$. O programa estatístico empregado para as análises foi o Sigma Stat®.

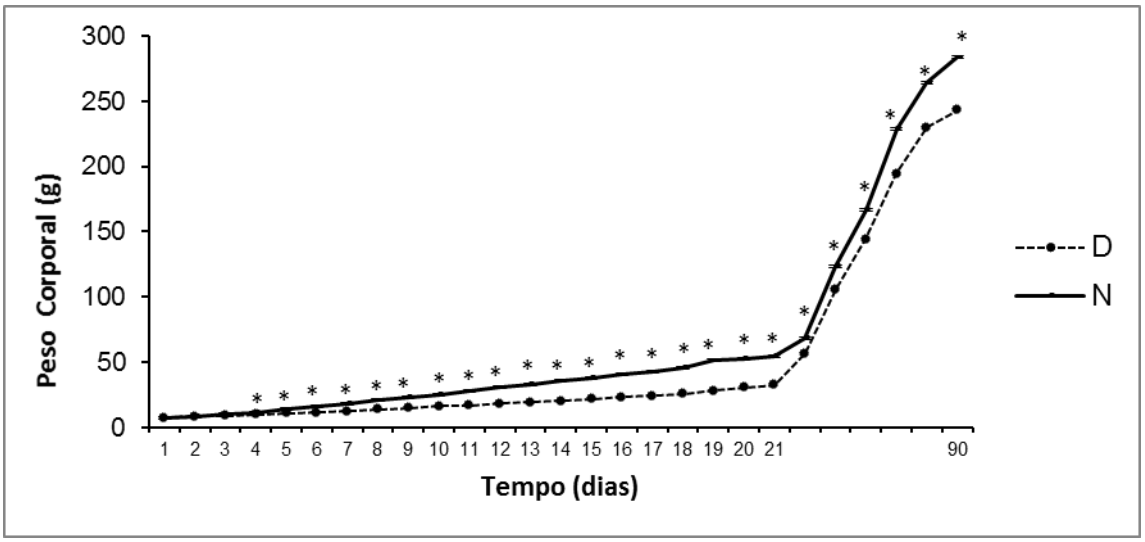
RESULTADOS

Peso corporal na desnutrição e reposição nutricional

Nos primeiros dias de vida, os pesos corporais (g) dos grupos nutridos e desnutridos foram semelhantes até o 3º dia. A partir do 4º até o 21º dia pós-natal, os valores dos pesos corporais dos animais desnutridos foram menores em relação aos dos animais nutridos ($p<0,001$). Entre o 22º e o 90º dia de vida ocorreu a reposição nutricional e os valores dos pesos do grupo desnutridos permaneceram menores quando comparados aos do grupo nutrido ($p<0,001$) (Figura 1).

Figura 1- Evolução da curva ponderal durante a desnutrição neonatal (21 dias) e reposição nutricional (23-90 dias) dos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido). Teste t de Student. Valores expressos como média±desvio padrão, n=40. Recife-PE, 2009.

***p<0,05 na comparação dos grupos Nutrido e Desnutrido.**



Índice de Aderência

Não houve diferença entre os grupos nutridos e desnutridos (C-N: 87,5±3,0; C-D: 86±2,0; MSSA-N: 90,3±2,6; MSSA-D: 91±2,0; MRSA-N: 93,3±3,1; MRSA: 93±3,0), $p>0,05$. Também não foi observada entre os sistemas analisados, $p>0,05$.

Taxa de fagocitose

O percentual da taxa de fagocitose foi menor no grupo desnutrido quando comparado ao grupo nutrido (MSSA-N: 12,1± 2,0; MSSA-D: 4,1± 3,2; MRSA-N: 10,4±3,1; MRSA-D: 4,3±3,0), $p<0,001$. Entretanto, ao analisar os sistemas MSSA e MRSA não houve diferença nas taxas de fagocitose dos macrófagos alveolares ($p>0,05$).

Produção do superóxido

Houve redução da produção de superóxido no grupo desnutrido quando comparado ao nutrido para todos os sistemas (p=<0,001), e em ambos os tempos de incubação (p<0,05). Entretanto, ao analisar os sistemas MSSA e MRSA não foi observada diferença (p>0,05) (Tabela 1).

Tabela 1– Valores absolutos para a produção de superóxido nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido), nos sistemas (C – Controle negativo, MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina e MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) e nos tempos de incubação (1 e 2h). Teste ANOVA e Tukey. Valores expressos como média±desvio padrão, n=40. Recife-PE, 2009.

***p<0,05 na comparação dos grupos Nutrido e Desnutrido;**

#p<0,05 na comparação 1h e 2h.

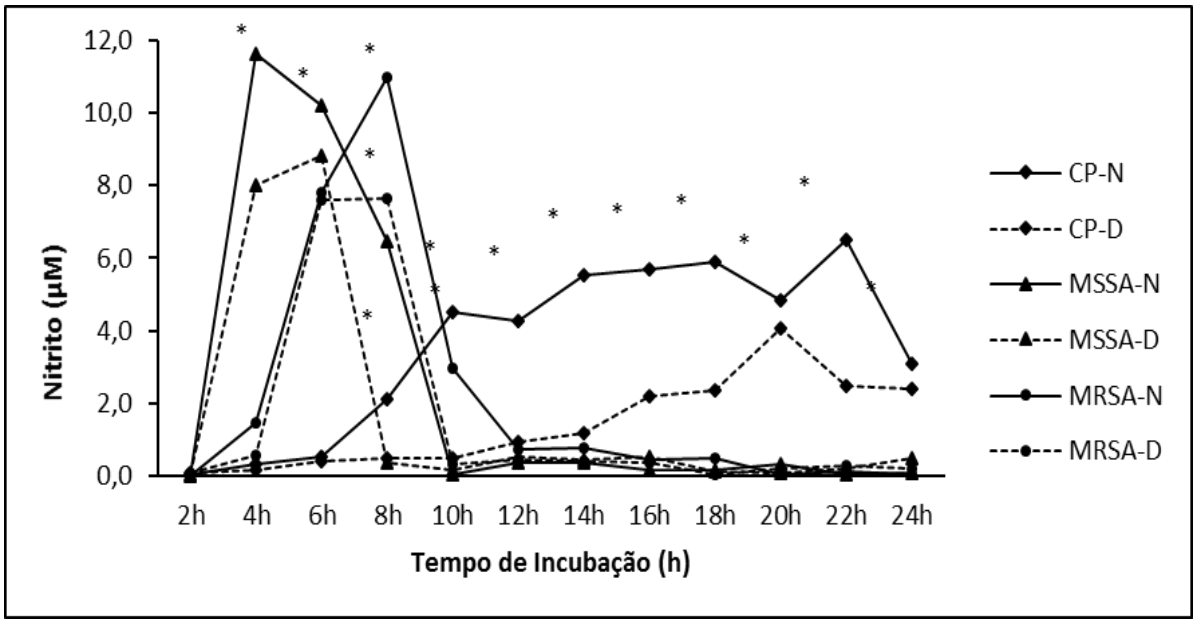
Tempo	1h			2h		
Sistemas / Grupos	C	MSSA	MRSA	C	MSSA	MRSA
N	1,47±0,08	1,69±0,07	1,70±0,07	2,79±0,14#	2,88±0,19#	3,54±0,17#
D	1,07±0,08*	1,10±0,14*	1,1±0,08*	2,12±0,28#*	2,34±0,11#*	2,48±0,14#*

Análise da Cinética da Produção de Óxido Nítrico por Macrófagos Alveolares

A quantificação de NO foi expressa em µM de nitrito. A produção de NO por macrófagos foi menor no grupo desnutrido, quando comparado com o nutrido, em todos os sistemas (p<0,05). Houve diferença entre os sistemas CN e CP nos dois grupos analisados a partir das 8h de incubação, com maior produção de óxido nítrico no CP (p<0,001). O pico máximo da produção de NO para o sistema CP foi após 22h tanto para o grupo nutrido quanto para o desnutrido (p<0,001). No período de 4 às 10h, houve redução da produção média de NO para grupo desnutrido nos sistemas MSSA e MRSA quando comparada com o nutrido (p<0,05). O pico máximo da produção de NO ocorreu após 4h de incubação do sistema MSSA do grupo N, de 6h para o grupo D e 8h para o MRSA nos dois grupos. A partir das 12h de incubação, tanto para o nutrido quanto para o desnutrido, ocorreu redução da produção de NO para os sistemas MSSA e MRSA (p<0,001), permanecendo com valores semelhantes aos do CN (Figura 2).

Figura 2- Cinética da produção de óxido nítrico no sobrenadante das culturas dos macrófagos alveolares nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (C- Controle negativo, CP- Controle positivo, MSSA- *Staphylococcus aureus* sensível a metilina e MRSA- *Staphylococcus aureus* resistente a metilina). Teste ANOVA e Tukey. Valores expressos como média±desvio padrão, n=40. Recife-PE, 2009.

***p<0,05 na comparação dos grupos Nutridos e Desnutridos.**

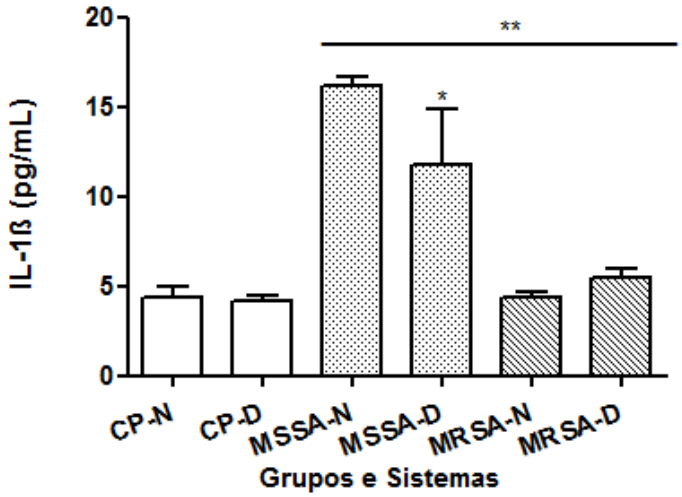


Níveis de IL-1β

Ao comparar os níveis IL-1β do grupo nutrido com o desnutrido, não foi detectada diferença entre os controles (p>0,05). Entretanto, ao analisar os sistemas-testes, houve maior concentração de IL-1β no sobrenadante do sistema-teste MSSA, do grupo nutrido (MSSA-N: 15,94±0,53pg/mL; MSSA-D: 11,81±3,01pg/mL), p<0,05 (Figura 3).

Figura 3- Níveis de IL-1β no sobrenadante das culturas dos macrófagos alveolares nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (C- Controle negativo, MSSA- *Staphylococus aureus* sensível a metilicina e MRSA- *Staphylococus aureus* resistente a metilicina). Teste ANOVA e Tukey. Valores expressos como média±desvio padrão, n=40. Recife-PE, 2011.

***p<0,05 na comparação dos grupos Nutrido e Desnutrido.**

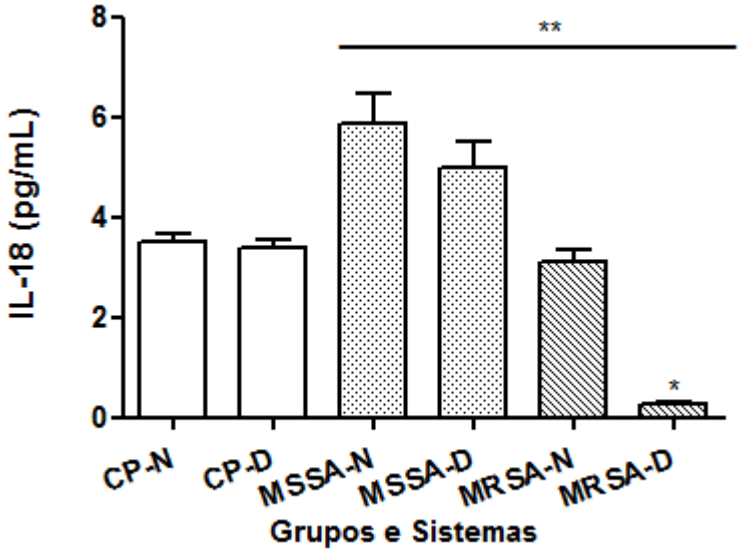


Níveis de IL-18

Ao comparar os níveis de IL-18 do grupo nutrido com o desnutrido, não foi observada diferença entre os controles, p>0,05. Em relação aos sistemas-testes foi detectada maior produção de IL-18 no MSSA (MSSA-N: 5,87±0,59pg/mL; MRSA-N: 3,11±0,23pg/mL), p<0,05. Porém, houve menor concentração de IL-18 no sistema-teste MRSA do grupo desnutrido (MRSA-N: 3,11±0,23pg/mL; MRSA-D: 0,27±0,01pg/mL), p<0,05 (Figura 4).

Figura 4- Níveis de IL-18 no sobrenadante das culturas dos macrófagos alveolares nos grupos (N- Nutrido e D- Desnutrido) e nos sistemas (C- Controle negativo, MSSA- *Staphylococus aureus* sensível a metilicina e MRSA- *Staphylococus aureus* resistente a metilicina). Teste ANOVA e Tukey. Valores expressos como média±erro padrão, n=40. Recife-PE, 2011.

***p<0,05 na comparação dos grupos Nutrido e Desnutrido.**



Viabilidade dos Macrófagos Alveolares

A viabilidade dos macrófagos do grupo desnutrido foi menor quando comparada com o nutrido, em todos os sistemas analisados (CP-N: 69,2±0,8; CP-D: 51,3±0,51; MSSA-N: 18,5±0,22; MSSA-D: 12,2±0,11; MRSA-N: 20,7±0,2; MRSA-D: 6,7±0,03), $p<0,05$. Foi observada intensa redução dos macrófagos no sistema MRSA do grupo desnutrido ($p<0,001$).

DISCUSSÃO

Estudos demonstram que modelos de desnutrição neonatal possuem correlação entre a deficiência de determinados nutrientes com a expressão de genes, o que induz mudanças no genótipo e consequente fenótipo[17,18]. Dependendo da intensidade e da duração das alterações nutricionais, as consequências terão impacto maior ou menor sobre todo o organismo no futuro[1].

Neste estudo, utilizou-se como modelo experimental de desnutrição uma dieta a base de 8% de caseína, que se caracteriza por ser hipoprotéica. A redução do nível de proteína na dieta oferecida as ratas é caracterizada pela restrição da quantidade total de nutrientes acessíveis aos filhotes. Assim, as ratas lactentes desenvolvem desnutrição protéica e os filhotes, desnutrição protéico-calórica. Este fato é determinante para a gênese dos efeitos deletérios observados na prole[19].

Os animais amamentados por essas mães apresentaram retardo do crescimento verificado pelo baixo peso no desmame, persistindo até os 90 dias de vida. A partir do quarto dia pós-natal, foi observada redução no ganho de peso nos animais desnutridos, quando comparados aos animais nutridos. Este resultado foi similar ao obtido por Melo *et al.*[4], entretanto, empregaram a DBR (dieta básica regional), deficiente em todos os seus constituintes. Costa *et al.*[5] ao utilizar caseína 8% como modelo de desnutrição, detectaram redução no peso dos animais desnutridos após o quarto dia de vida.

A agressão nutricional incidindo no período neonatal parece interferir com a programação de mecanismos funcionais dos macrófagos, provocando alterações duradouras, detectáveis no organismo adulto, mesmo após longa recuperação nutricional[3]. Prestes-Carneiro *et al.*[20] verificaram que a desnutrição do primeiro ao décimo segundo dia de lactação comprometeu a resposta microbicida, representada pela redução na taxa de fagocitose. Outros pesquisadores relataram déficit na produção de NO[4,21]. Dong *et al.*[22] observaram diminuição na liberação deste radical livre por macrófagos alveolares após estimulação *in vitro* com LPS.

No presente estudo, a oferta de dieta hipoprotéica 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 8%. Chandra[2] observou que a desnutrição modifica diferentes etapas do processo fagocítico de 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 Prestes-Carneiro *et al.*[20] diante de estímulos inflamatórios, os macrófagos de animais desnutridos não respondem com a mesma intensidade que os macrófagos oriundos dos animais nutridos possibilitando ou permitindo, o desenvolvimento dos processos inflamatórios e/ou infecciosos. Outros estudos relataram ainda, diminuição da capacidade fagocítica em animais desnutridos e submetidos à desnutrição neonatal[4, 22].

Em relação à atividade oxidante, os macrófagos alveolares de ratos desnutridos no período neonatal apresentaram menor produção de superóxido, tanto em condições normais, quanto frente a estímulo bacteriano. Corroborando com este achado, Kawakami *et al.*[23] verificaram que sistemas antimicrobicidas de fagócitos são potencialmente afetados pela desnutrição neonatal. Prestes-Carneiro *et al.*[20] também relataram redução na produção de superóxido durante a desnutrição proteica severa.

Neste estudo, a produção de NO foi analisada a cada duas horas, num total de 24 horas de incubação das culturas de células. Houve produção crescente no CP, nos dois grupos testados e o pico máximo ocorreu após 22 horas. Entretanto, foi reduzida no grupo desnutrido quando comparado com o nutrido. Corroborando com este resultado, Melo *et al.*[4], detectaram déficit na produção de NO por macrófagos alveolares e peritoneais, após 24 horas de incubação com LPS, em ratos desnutridos precocemente. Ferreira-Silva *et al.*[24] também verificaram redução da concentração de nitrito no sobrenadante das culturas celulares, durante a cinética da produção de NO, no grupo desnutrido após estimulação com LPS. Estes dados indicam que a desnutrição neonatal programa alterações nos macrófagos com repercussão na vida adulta[9].

Pumerantz *et al.*[25] afirmaram que o NO produzido pelos macrófagos alveolares desenvolve importante papel microbicida contra o *Staphylococcus aureus*. Ao comparar a

liberação de NO nos sistemas MSSA e MRSA, dos grupos nutridos e desnutridos, também houve menor produção no grupo desnutrido. A redução da síntese deste radical livre pode favorecer a multiplicação das bactérias resistentes no interior dos fagócitos, uma vez que um importante mecanismo de defesa encontra-se comprometido[10].

Segundo, Richardson *et al.*[26] *S. aureus* pode se evadir de múltiplos componentes da resposta imune inata, incluindo a ação microbicida do NO. Estes autores descobriram que o *S. aureus* é capaz de adaptar-se metabolicamente ao estresse nitrosativo por expressar a enzima NO-L-lactato desidrogenase induzível. A produção de NO-L-lactato desidrogenase permite que *S. aureus* mantenha a homeostase durante o estresse redox nitrosativo.

Ao analisar a produção da IL-1β, foi observada diferença entre os grupos de animais nutridos e desnutridos apenas nos sistemas-testes. Foi detectada maior produção de IL-1β no MSSA do nutrido, mas ao analisar o grupo desnutrido, foi maior no sistema MRSA. A IL-1β é um potente pirógeno endógeno, estimulador da febre, da migração de leucócitos para os tecidos e da expressão de citocinas e quimiocinas[27]. Níveis elevados da citocina pró-inflamatória IL-1β produzirá uma sintomatologia exuberante, porém a resposta microbicida efetiva. Em indivíduos imunodeprimidos, os sinais e sintomas da infecção também serão pronunciados. Entretanto, em decorrência de uma disfunção funcional esta resposta poderá ser ineficaz. Estes resultados justificam a elevada taxa de mortalidade em infecções por MRSA.

Em relação à produção da IL-18, houve maior produção da IL-18 no controle positivo quando comparado com negativo. Ao analisar os sistemas-testes entre os grupos nutridos e desnutridos, houve redução da produção no grupo desnutrido, com menores níveis de IL-18 no sistema MRSA. A IL-18 induz a produção de INF-δ (interferon-gama) pelas células do sistema imune. Esta citocina é importante para ativação de macrófagos, linfócitos T e outros tipos celulares[28]. Pode-se sugerir que em infecções pelo MRSA em desnutridos, o perfil pró-inflamatório (Th1) encontra-se comprometido, favorecendo a permanência da bactéria no organismo do hospedeiro.

Ao comparar a viabilidade dos macrófagos entre os sistemas CP, MSSA e MRSA, foi observada intensa redução após infecção com *S. aureus*. Este achado foi mais evidente no grupo desnutrido e infectado com MRSA. Isto indica que existe maior vulnerabilidade dos macrófagos durante a infecção por MRSA, principalmente em indivíduos imunocomprometidos.

Deficiências protéico-calóricas podem induzir lesão celular irreversível que deflagra o mecanismo da morte celular programada[20]. Ferreira-Silva *et al.*[24] detectaram redução na viabilidade dos macrófagos alveolares, após a desnutrição peri-natal. Corroborando com estes autores, Rivadeneira *et al.*[29] verificaram que a desnutrição está associada com aumento de apoptose. A apoptose pode ser desencadeada por estímulos externos ou por estímulos internos que resultem em disfunção mitocondrial, lesões no DNA, alterações dos fatores de crescimento e nutricionais. Estas diferentes vias induzem ativação das caspases, que desencadeiam a clivagem de proteínas estruturais, as quais comprometem a integridade do citoesqueleto, culminando com a morte celular[29].

Staphylococcus aureus é capaz de produzir uma variedade de citotoxinas potentes, capazes de permitir que a bactéria resista à resposta microbicida. A leucocidina é uma toxina associada a novos clones de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente. O mecanismo de ação das leucocidinas é a destruição dos leucócitos por formação de poros na membrana celular[30]. Diante disto, pode-se sugerir que a infecção por *S. aureus* induziu a morte dos fagócitos por desencadeamento da lise celular e que a desnutrição neonatal corroborou com este efeito. Os resultados obtidos neste estudo poderiam ser a chave para a explicação das altas taxas de morbidade e mortalidade associadas à infecção por MRSA em indivíduos imunocomprometidos.

CONCLUSÃO

O modelo de desnutrição neonatal empregado comprometeu alguns parâmetros funcionais da imunidade inata, tais como: taxa de fagocitose, produção de óxido nítrico, ânion superóxido e IL-18. A fagocitose e a produção destes mediadores inflamatórios são cruciais para destruição efetiva dos micro-organismos invasores. Apesar de não ter alterado o índice de aderência e a produção da IL-1β, pode-se afirmar que a manipulação nutricional durante o período neonatal interfere com a programação de mecanismos microbicidas dos macrófagos. Em relação ao perfil de sensibilidade a meticilina das cepas de *Staphylococcus aureus*, a resistência parece influenciar nos mecanismos de evasão da resposta microbicida, com redução da defesa imunológica. Uma vez que, a interação entre desnutrição neonatal e infecção com MRSA tornou os fagócitos mais susceptíveis, o que pode favorecer quadros infecciosos graves e fatais. Entretanto, ainda existem muitas lacunas a serem esclarecidas sobre a estrutura e o desempenho dos componentes da defesa imune durante infecção por cepas patogênicas, como a bactéria *Staphylococcus aureus*, em organismos adultos que

sofreram agressões ambientais precoces. Desta forma, torna-se importante a realização de estudos baseados em metodologias mais sensíveis e especificas, como as análises de biologia molecular. Estes poderão fornecer dados mais relevantes sobre este tema e contribuir para o esclarecimento das alterações morfofuncionais ocorridas no início da vida e sua íntima relação com as modificações na resposta microbicida das células fagocitárias, o surgimento e a evolução de doenças infecciosas.

COLABORADORES

MORAIS, N.G. participou da elaboração do projeto de pesquisa, da estratégia experimental, da coleta de dados, tabulação, da discussão dos resultados e da redação do artigo. COSTA, T.B. participou da preparação dos grupos experimentais, da manutenção dos animais no biotério e da coleta de dados. SEVERO, M.S. participou da elaboração do projeto de pesquisa, da estratégia experimental. CASTRO, C.M.M.B. participou da elaboração do projeto de pesquisa, da tabulação, da discussão dos resultados e da elaboração do artigo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pereira KNF, Vitoriano ILS, Melo MPP, Aragão RS, Toscano AE, Silva HJ, De Castro RM. Effects of malnutrition and/or neonatal inhibition of serotonin reuptake in neuromuscular development of the gastrointestinal tract: review of literature. Neurob. 2009; 72 (2): 215-21.
2. Chandra RK. Nutrition and the immune system from birth to old age. Eur. J. Clin. Nutr. 2002; 56 (3): 73-76. doi:10.1038/sj.ejcn.1601492.
3. Melo JF; Costa TC; Lima TDC; Chaves MEC; Vayssade LM; Nagel MD; Castro CMMB. Long-term effects of a neonatal low-protein diet in rats on the number of macrophages in culture and the expression/production of fusion proteins. European Journal of Nutrition. 2013; 52 (5): 1475-82. doi: 10.1007/s00394-012-0453-y.
4. Melo JF, Macedo EMC, Silva RPP, Viana MT, Silva WTF, Castro CMMB. Efeito da desnutrição neonatal sobre o recrutamento celular e a atividade oxidante-antioxidante de macrófagos em ratos adultos endotoxêmicos. Rev Nutr 2008, 21(6): 683-94. doi: http://dx. doi.org/10.1590/S1415-52732008000600007.
5. Costa TB; Morais NG; Almeida TM; Severo MS; De Castro CMMB. Early malnutrition and production of IFN-□, IL-12 and IL-10 by macrophages/lymphocytes: in vitro study of cell infection by methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Rev. Nutr. 2012; 25 (5):607-619. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732012000500006.

6. Tegnér J; Nilsson R; Bajic, VB; Björkegren, J; Ravasi, T. Systems biology of innate immunity. Cellular Immunology. 2007; 244 (2): 105-109. doi: 10.1016/j.cellimm.2007.01.010.
7. Kubica M; Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, Golda A, *et al.* Potential New Pathway for *Staphylococcus aureus* Dissemination: The Silent Survival of *S. aureus* Phagocytosed by Human Monocyte-Derived Macrophages, PLoS ONE. 2008, 3(1): 1409-1435. doi: 10.1371/journal.pone.0001409.
8. Beam JW; Buckley B. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus.* Prevalence and Risk Factors. Journal of Athletic. 2006, 41 (3): 337–340. doi: PMC1569547.
9. Mandell GL. Uptake, transport, delivery and intracellular activity of antimicrobial agents. Pharmacother. 2005; 25 (12): 130S-33S.
10. Morais NG; Costa TB; Almeida TM; Severo MS; De Castro CMMB. "Parâmetros imunológicos de macrófagos frente à infecção por Staphylococcus aureus meticilina sensível/resistente". J Bras Patol Med Lab. 2013; 49(2), p. 84-90. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442013000200002.
11. Passos MCF; Ramos CF; Moura EG. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. Nutrition Research. 2000, 20 (1): 1603-12. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0271-5317(00)00246-3.
12. Lu YF, Mcewan NA. Staphylococcal and micrococcal adherence to canine and feline corneocytes: quantification using a simple adhesion assay. Veterinary Dermatol. 2007, 18: 29–35. doi: 10.1111/j.1365-3164.2007.00567.
13. De La Fuente M; Del Rio M; Ferrandez MD; Hernanz A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. Immunol. 1991; 73: 205-11. doi: PMID: 1649124
14. Malagueno E, Albuquerque C, De Castro CMMB, Gadelha M, Inácio-Irmão J, SANTANA JV. Effect of biomphalaria straminea plasma of biomphalaria glabrata hemolymph cells**.** *Memorial Instituto Oswaldo Cruz.* 1998; 93 (1): 301-2. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761998000700059.
15. De castro CMMB; De castro RM; Medeiros AF; Santos AQ; Silva WTF; Filho JLL. Effect of stress on the production of O_2^- in alveolar macrophages. J Neuroimmunol. 2000, 108: 68-72. doi: PII: S0165-5728(00)00276-9.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immun Meth 1983, 65 (½): 55-63. doi: PMID: 6606682.

17. Rodriguez L, Gonzalez C, Flores L, Jiménez-Zamudio L, Graniel J, Ortiz R. Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children. Clin Diagn Lab Immunol 2005, 12 (4): 502-7. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03361.
18. Waterland RA, Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. Nutr 2004, 20: 63–8. doi:10.1016/j.nut.2003.09.011.
19. Araujo FRG; De Castro CMMB; Rocha JA; Sampaio B; Diniz MFA; Eve LB; Montarroyos UR. Perialveolar bacterial microbiota and bacteraemia after dental alveolitis in adult rats that had been subjected to neonatal malnutrition. British Journal of Nutrition. 2012, 107: 996–1005. doi: 10.1017/S000711451100393X.
20. Prestes-Carneiro LE; Laraya RD; Silva PRC; Moliterno RA; Felipe I; Mathias PC. Long-term effect of early protein malnutrition on growth curve hematological parameters and macrophage function of rats. J Nutr Scien Vitaminol 2006, 52 (6): 414-20. doi: http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.52.414.
21. Anstead GM; Chandrasekar B; Zhao W; Yang J; Perez LE; Melby PC. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. Infect and Immun. 2001, 69: 4709-18. doi: 10.1128/IAI.69.8.4709-4718.2001.
22. Dong W; Selgrade MJK; Gilmour MI; Lange RW; Park P; Luster MI, *et al*. Altered alveolar macrophage function in calorie-restricted rats. Am J Respir Cell Mol Biol. 1998; 19: 462-9. doi: 10.1165/ajrcmb.19.3.3114.
23. Kawakami K; Kadota J; Lida K; Shirai R; Abe K; Kohno S. Reduced immune function and malnutrition in the elderly. Tohoku J. Exp. Med. 1999, 187 (2): 157-171.
24. Ferreira-Silva WT; Galvão BA; Ferraz Pereira KN; De Castro CMMB; De Castro RM. Perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide release by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rat. Neuroimmunomod. 2008, 23: 120-9. doi: 10.1159/000212382.
25. Pumerantz A; Muppidi K; Agnihotri S; Guerrac C; Venketaraman V; Wangb J, *et al*. Preparation of liposomal vancomycin and intracellular killing of meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Internat J Antimicrob Ag. 2010, 32: 1-5. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.10.011.
26. Richardson AR; Libby SJ; Fang FC. A Nitric Oxide–Inducible Lactate Dehydrogenase Enables *Staphylococcus aureus* to Resist Innate Immunity; Scien. 2008, 319: 1-21. doi: 10.1126/science.1155207.
27. Latz E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function Current Opinion in Immunology 2010, 22: 28–33. doi:10.1016/j.coi.2009.12.004.

28. Lalor SJ; Dugan LS; Sutton CE; Basdeo SA; Fletcher JM; Mills KHG. IL-18 Promote IL-17 Production by gd and Caspase-1-Processed Cytokines IL-1b and CD4 T Cells That Mediate Autoimmunity *J Immuno* 2011, *6: 55-63*. doi: 10.4049/jimmunol.1003597.
29. Rivadeneira DE; Grobmyer SR; Naama HÁ; Mackrell PJ; Mestre JR; Stapleton PP, *et al*. Malnutrition-induced macrophage apoptosis. Surgery 2001, 129(5): 617-25. doi: http://dx.doi.org/10.1067/msy.2001.112963.
30. Nizet V. Understanding how leading bacterial pathogens subvert innate immunity to reveal novel therapeutic targets. J Allergy Clin Immunol. 2007, 120(1): 13-22. doi:10.1016/j.jaci.2007.06.005.

APÊNDICE C: Versão em inglês do ARTIGO II

Title of paper: Effect of neonatal malnutrition on expression of nitric oxide synthase enzyme, production of free radicals and *in vitro* feasibility of alveolar macrophages infected with methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[1].

Names of authors

Natália Gomes de Morais[2],
Thacianna Barreto da Costa[3],
Amanda Lúcia Farias Pedrosa[4],
Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro[5],
Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque[6].
Valéria Rêgo Alves Pereira[7],
Milena de Paiva Cavalcanti[8];
Célia Maria Machado Barbosa de Castro[9]

[1]Article from the thesis MORAIS, N.G., entitled "Effect of neonatal malnutrition on intracellular signaling and viability of alveolar macrophages infected in vitro with methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*" - Federal University of Pernambuco; 2014.

Affiliations and addresses of the authors

[2]Assistant Professor at Federal University of São Francisco Valley (UNIVASF), Health Sciences Center, University Campus, 48608-170, Paulo Afonso, BA, Brazil.
[3]PhD student in Tropical Medicine at Federal University of Pernambuco (UFPE), Department of Tropical Medicine, University Campus, University Town, 50670-420, Recife, PE, Brazil.
[4]Trainee in Scientific Initiation of the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, University Campus, University Town, 50670-420, Recife, PE, Brazil.
[5]PhD student in Public Health at the Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation - CPqAM/FIOCRUZ, Campus UFPE, Recife, Brazil.

[6]PhD student in Biosciences and Biotechnology for Health, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation - CPqAM/FIOCRUZ, Campus UFPE, Recife, Brazil.
[7]Researcher at the Laboratory of Immunogenetics, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation - CPqAM/FIOCRUZ, Campus UFPE, Recife, Brazil.
[8]Researcher in the laboratory of Immunoparasitology, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation - CPqAM/FIOCRUZ, Campus UFPE, Recife, Brazil.
[9]Associate Professor 2 at Federal University of Pernambuco, Health Sciences Center, Department of Tropical Medicine, University Campus, University Town, 50670-420, Recife, PE, Brazil

***Address for correspondence:**
Natália Gomes de Morais
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.
Phone: +55 81 21268484
Fax: +55 81 21268485
E-mail: natalia.morais@univasf.edu.br

Running Title of paper: Malnutrition and infection by MSSA and MRSA.

Abstract

Objective: Evaluate the effects of neonatal malnutrition on the microbicidal response and viability of *in vitro* macrophages infected with *Staphylococcus aureus* sensitive/resistant to methicillin. Methods: Male Wistar rats (n = 24) were divided into two distinct groups: Nourished (rats breastfed by mothers undergoing diet with 17% casein) and Malnourished (rats breastfed by mothers undergoing diet with 8% casein). Macrophages were recovered after surgical tracheostomy procedure by collecting bronchoalveolar lavage. Four systems were established: negative control, composed only by phagocytes; positive control, macrophages plus lipopolysaccharide; and two test systems, macrophages plus *Staphylococcus aureus* sensitive and resistant to methicillin. Plates were incubated at 37 °C for 24h. After this period, tests for the analysis of cell viability and microbicidal response

were performed. In the statistical analysis, the Student-t and ANOVA tests were used, accepting p <0.05. Results: The neonatal malnutrition impaired the animals' body weight. There was a lower expression of the inducible nitric oxide enzyme (iNOS), nitric oxide production and viability of macrophages infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. However, increased production of superoxide anion in the malnourished group was detected. Conclusion: Neonatal malnutrition focusing on critical periods of development promoted lower expression of iNOS, nitric oxide production and percentage of viable cells. The high levels of reactive oxygen species may favor the onset of serious and systemic infections with fatal outcome if associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
Index terms: Malnutrition; Macrophages; *Staphylococcus aureus*; Methicillin.

Introduction

Environmental impacts during vulnerable periods of development can promote lasting effects on structures and functions of organic systems with consequences in adulthood [1]. This vulnerability is associated with the intense process of differentiation and maturation of cells and tissues of the nervous, endocrine and immune systems [2].

Micronutrients are essential for cell replication, growth and development of the organism. Lack of essential nutrients predisposes individuals to a cascade of adverse reactions; metabolic events that impair the body's ability to adapt, to recover and to survive. The intensity and duration of the nutritional changes may induce to a greater or lesser impact on the entire body in the future [3].

There is a dynamic relationship between disease, immunity and nutrition [4]. Among the consequences of nutritional deficiencies may be cited decreased humoral and cellular immunity, phagocyte bactericidal capacity, production of components of the complement system, the total number of lymphocytes, the balance between the subtypes of T lymphocytes and non-specific mechanisms of defense [4, 5].

This relationship between malnutrition and suppression of immune response is an important factor in susceptibility to infections. According to France *et al.* [6], malnourished and hospitalized patients are at risk of developing serious nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Since the 60s, the MRSA infection is a serious problem for global public health for being related to high rates of morbidity and mortality [7, 8]. It is believed that MRSA strains have distinct virulence mechanisms, which

can be more exacerbated when compared to strains of methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) [9].

Despite there being some *in vivo* and *in vitro* studies upon the pathogenicity of MSSA and MRSA strains [10, 11], there are few assessing the association between neonatal malnutrition and microbicidal response against multiresistant bacteria. Thus, the present study aims at evaluating the expression of induced nitric oxide synthase enzyme, production of free radicals and the *in vitro* viability of alveolar macrophages infected with *Staphylococcus aureus* sensitive and resistant to methicillin.

Materials and Methods

Ethical Considerations. This research was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Center for Biological Sciences of the Federal University of Pernambuco (protocol number 23076.031259/2011-85).

Animals and Diet. 24 male albino Wistar rats (90-120 days) from the colony in the Vivarium at the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco were used. The animals were kept under controlled temperature (22 ± 1°C) and 12:12 h light-dark photoperiod with free access to water and feed. One day after birth, the offspring was standardized in six male pups per mother. That same day, adopted as the first day of life of the animal, offspring was divided into two groups: nourished (N) - consisting of pups nursed by mothers undergoing diet containing 17% protein based on casein used as protein source (n = 12); Malnourished (M) - consisting of pups nursed by mothers undergoing diet containing 8% protein based on casein used as protein source used (n = 12) during the first 21 days after birth. During the neonatal period, body weight of each animal was recorded daily (using digital electronic scale - Mars, model S-4000- 0.1 g precision) to monitor body weight during nutritional manipulation. From the 22nd day of life until the late experiment, body weight was measured three times a week, in order to monitor the nutritional recovery of the animals. In this period, the animals were separated from their mothers, kept in collective cages containing three rats each and received the Vivarium' Standard Diet (Labina-Purina, Brazil) until adulthood (90-120 days).

Strains of Staphylococcus aureus. Methicillin-resistant (The American Type Culture Collection – ATCC 33591) and Methicillin-sensitive (The American Type Culture Collection – ATCC 29213) *Staphylococcus aureus* strains were used due to their distinctive resistance profile and its importance in terms of public health. Bacteria were maintained in Tryptic Soy

Broth Broth (TSB) supplemented with 20% glycerol at -20 °C until use. Twenty-four hours before each experiment, the strains were plated on Blood Agar (agar supplemented with 5% sheep blood) and incubated at 37ºC. At the early testing, some colonies were transferred to tubes containing sterile PBS, in order to obtain 0.15nm turbidity with the aid of a spectrophotometer at 570nm. This absorbance according to Morais *et al.* [12] corresponds approximately to a concentration of 10^6 bacteria/mL PBS (Phosphate Buffer Saline).

Bronchoalveolar lavage (BAL). The animals were anaesthetized with chloralose-urethane (0.5 and 12.5%, respectively) at a ratio of 8mL/kg i.p. BAL was collected by injecting 0.9% saline through a plastic cannula inserted into the trachea. Several aliquots of 3mL were injected and collected in conical polypropylene tubes of 50mL (Falcon, Sigma).

Culture of alveolar macrophages. BAL samples were centrifuged at 268 g for 15min. The precipitate corresponding to the cells was re-suspended in RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium - Gibco-Invitrogen Corporation) containing 3% bovine fetal serum and antibiotics (100U/mL penicillin and 100µg/mL streptomycin). Cells were transferred to 35mm in diameter culture plates (6-well Falcon) at a ratio of 10^6 cells/mL RPMI 1640 in each well. After 1h incubation at 37 ° C and 5% CO_2, the supernatant was disregarded with non-adherent cells and were added 1mL of RPMI medium. Cell cultures were incubated under the above conditions for cells stabilization.

Systems. Four systems were established: negative control (C) containing only alveolar macrophages; positive control (PC), with macrophages plus 10µL lipopolysaccharide (10 µg/mL) of *Escherichia coli* serotype; MSSA, macrophages plus 100 µL of bacterial inoculum on the sensitive strain (ATCC 29213) and MRSA, macrophages plus 100mL bacterial inoculum of resistant strain (ATCC 33591). Plates were incubated at 37 °C in humid atmosphere, 5% CO_2.

Extraction of macrophages adhered to the cell culture plate. The extraction of macrophages was performed using Versene reagent (1x Gibco by life Technologies). For analyzes of cell viability, cell pellet was re-suspended in 1mL PBS; 800µL Trizol was added and stored at -80 °C for molecular biology analysis.

RNA (ribonucleic acid) extraction from macrophages frozen in Trizol. Each sample was added 200µL chloroform, incubated for 3 minutes at room temperature and centrifuged at 11725g for 10 minutes. The RNA-containing supernatant (aqueous phase) was transferred to new tubes and precipitated by adding 500µL isopropanol. Tubes were incubated at room

temperature and then centrifuged using the same conditions. The supernatant was discarded, added 1mL of 70% ethanol and centrifuged at 8848g for 5 minutes. The RNA pellet was incubated for 5 minutes at room temperature and re-suspended with 30µL in RNAse-free water (DEPC). RNA was quantified in spectrophotometer NanoDrop™ (ThermoScientific, Waltham, Massachusetts) at 260nm and 280nm wavelengths, and stored at -80 ºC.

RNA Reverse transcription into cDNA. Total RNA was converted into cDNA using the QuantiTect® Reverse Transcription kit through automatic thermocycler Eppendorf mastercycler gradient. The cycling conditions used were: 42°C for 30 min and 96°C for 3min.

Primers. With the aid of the Primer Express software (Applied Biosystems, version 2.0), primers for detecting iNOS were designed. The accession number of the base sequence used on the Genback was AX_23004461.1. The designed primers were: iNOS forward 5' GCCACAGCTTTACAGGGAGT 3' and iNOS reverse_5'AGGCTAACAAGACCCAAGCC 3'.

Evaluation of sensitivity, efficiency and primers specificity. To evaluate the sensitivity (detection limit) serial cDNA dilutions (factor 10) of iNOS positive control at concentrations of 1fg to 1ng were performed. The test sensitivity was defined as the amplification of the highest target DNA dilution when compared to the formation of dimers of primers in samples without DNA. Efficiency was determined by the formula: $\varepsilon = (10^{1/slope}) -1$. Amplification of samples was performed by QuantiFast® Syber® green PCR kit in the ABI Prism 7500 apparatus (Applied Biosystems, CA, USA). The cycling conditions were: initial denaturation at 95°C/1s, annealing and extension at 60°C/1min in 40 cycles. The final volume of each reaction was 25µL, consisting of 12.5µL SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), 8.5µL water, 1µL of each primer (5 pmol) and 2µL DNA template. Reactions were performed in duplicate for quantifying each gene and reaction negative controls (NTC). The method used to calculate the relative expression was the comparative standard curve. To construct the standard curve, serial cDNA dilutions (1:10) at concentrations from 1fg to 1ng were carried out. The endogenous control (reference gene) was used GAPDH (Glyceraldehydes-3-Phosphate Dehydrogenase), whose primer systems used included: GAPDHF 5'ATCTTCCAGGAGCGAGATCCC 3' and GAPDHR 5' GTGGGCAAGGTCATCCCT 3' [14]. The mRNA expression of targets was achieved by two sequential normalizations: through calibrator and endogenous control (negative control). The first normalization was performed as follows: target gene quantity/reference gene quantity,

where quantity means the absolute quantity values depending on the standard curve. After target gene normalization, RQ (relative quantity of mRNA) was obtained by calibrator normalization.

Sequencing of iNOS. The sequencing of samples was carried out at the Technology Platforms Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation (CPqAM/FIOCRUZ/PE) through the Big Dye Terminator v3.1 kit and the ABI 3100 Genect Analyzer appliance - Applied Byosistems. Sequences were determined in both directions (using the same primers individually) and submitted to the NCBI – BLASTn to homology analysis with genes in question.

Analyses in cell culture supernatants:

Nitric oxide production (NO). The NO production was determined as nitrite concentration in the supernatant of cultured cells [12]. 100µL of the supernatant were taken from the cultures after 24 hours of incubation. For quantification of nitrites and nitrates, 50µL of Griess reagent (1.5% sulfanilamide in 5% H_3PO_4, 0.1% naftiletilene diidrocloride diamine in H_20) were added to supernatants. After standing 15 minutes at room temperature, reading was performed in ELISA (BIO-RAD, Model 680) with 550nm filter. The nitrite concentration was calculated using average values from a standard curve of $NaNO_2$ (in the range of $0.5x10^{-6}$µM to 75x10-6 µM) and data expressed in µM nitrite/mL.

Production of superoxide anion (O_2^-). The O_2^- was induced by addition of PMA (phorbol myristate acetate - Sigma) in Hanks' solution (HBSS, Gibco, Invitrogen Corporation) at a concentration of 2µg/mL. Systems analysis with evaluation in 1h, 2h and 24h incubation were prepared. The testing specificity was provided by the addition of bovine erythrocyte superoxide dismutase (SOD, Sigma).

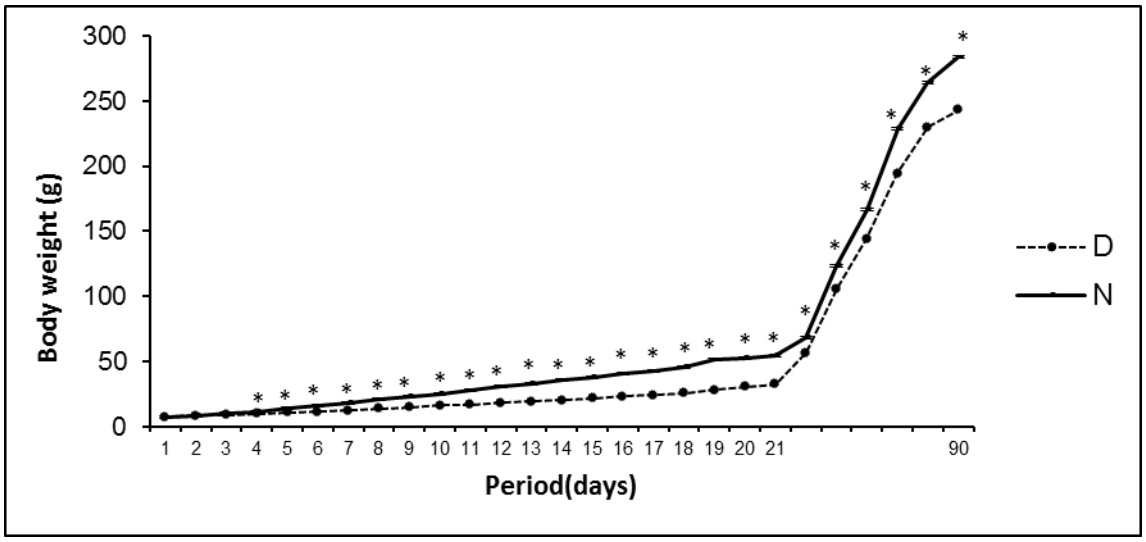
Viability of Alveolar Macrophages. After recovering the macrophages adhered to the culture plate, the cell pellet was resuspended in 1mL PBS, and centrifuged at 1077g for 10 minutes. The supernatant was discarded; 200µL of apoptosis buffer was added, homogenized and transferred to cytometry tubes. Subsequently, 5µL of Annexin V-FITC, 10µL propidium iodide and 285µL apoptosis buffer were added. After markings, cells were analyzed on the flow cytometer FACScalibur (488nm laser, Becton Dickinson). For data acquisition on the flow cytometer, the Cell Quest Pro (Becton Dickinson, USA) software was used. The following acquisitions were made: 20 000 events per sample.

Statistical Analysis. To evaluate the body weight evolution, the Student t test was used. Regarding the other analyses, we used the Analysis of Variance (ANOVA) for parametric data. When ANOVA showed a significant difference, the Tukey test was used to identify which groups had differed. Significance was set at $p < 0.05$. The statistical program used was Sigma Stat®.

Results

Body weight in malnutrition and nutritional supplementation. In the first days of life, body weights (g) of the nourished and malnourished groups were similar until the 3rd day. From the 4th until the 21th postnatal day, values of malnourished animals' body weights were lower than those of nourished animals ($p < 0.001$). Between the 22nd and the 90th day of life, a nutritional supplementation occurred and weight values of the malnourished group were lower when compared to values from the nourished group ($p < 0.001$) (Figure 1).

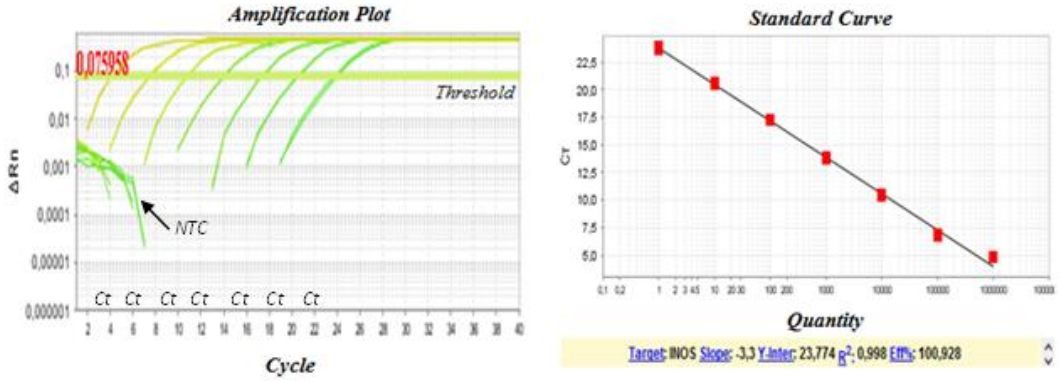
Figure 1- Evolution of the weight curve during the neonatal malnutrition (21 days) and nutritional supplementation (23-90 days) of the groups (N-Nourished and M-Malnourished). Student t test. Results were expressed as mean ± standard deviation, n=24. Differences between the nourished and malnourished groups were considered significant at $p < 0.05$ and were represented by the symbol *



Sensitivity, Efficiency and Specificity of the primer system. The sensitivity (detection limit) of the primers system was 1fg of cDNA. The efficiency of reaction was 100% ($R2=0.998$, $\varepsilon = 1$ and slope = -3.3) (Figure 2). Regarding specificity, the Ct of the target sample (iNOS) was 4.11 and the test samples were TLR-2 (Ct: 30.2; σ: 43969506.36), TLR-4 (Ct: 28.47; σ:

13254693.74) and NLRP3 (Ct: 25.95; σ: 2314549.522). By analyzing the Log σ, the system of primers is and $10^{7,6}$, $10^{7,12}$ and $10^{6,3}$ times more specific to the target DNA relative to the test samples, respectively.

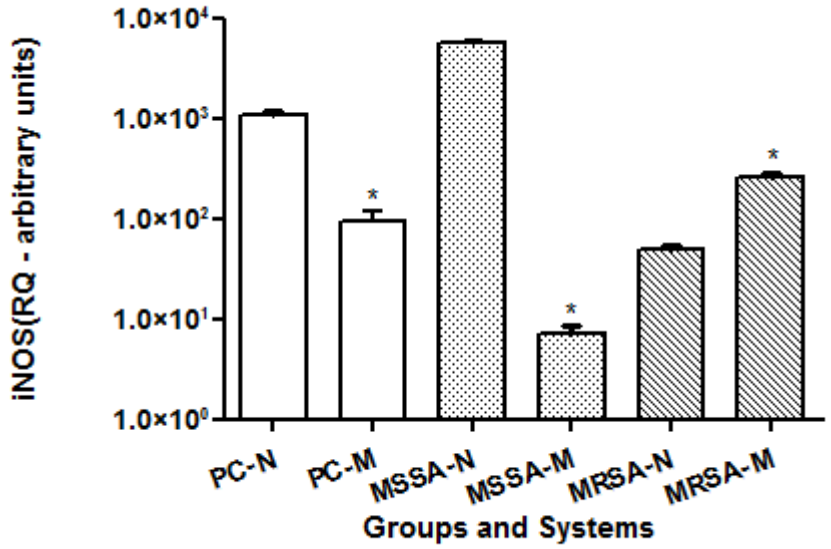
Figure 2: *Plot* of the cRNA amplification curves of the iNOS positive control (LPS) (at concentrations of 1fg to 1ng) and the efficiency of primer systems. Caption: Threshold (detection threshold); Ct (Cycle Threshold); NTC (negative control of the reaction); Quantity (absolute values).



Sequencing of the amplified samples in qPCR. There was 100% homology with the iNOS enzyme of *Rattus norvegicus*.

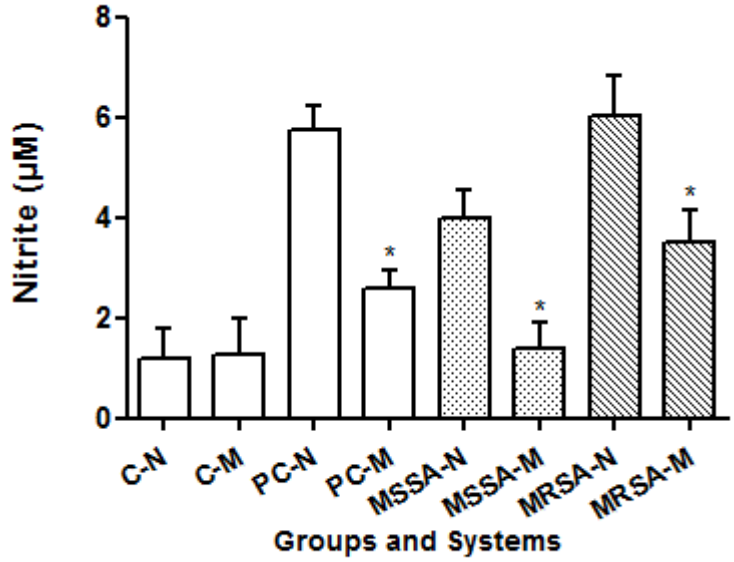
Quantification of iNOS expression. The lowest RQ of iNOS was observed in the malnourished group in comparison to the nourished one (PC-N: 1099.08±78.6; PC-M: 92.39±26.96; MSSA-N: 5752.31±147.73; MSSA-M: 7.12±1.59; MRSA-N: 259.93±25.34; MRSA-M: 4.16±5.65), $p<0.05$. Test-systems showed higher expression of iNOS enzyme in MSSA-N, with $p<0.05$ (Figure 3).

Figure 3- Relative expression of iNOS enzyme in groups (N-Nourished and M-Malnourished) and systems (PC - positive control, MSSA – methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and MRSA - methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). ANOVA and Tukey test. Results expressed as mean ± standard deviation, n=24. Differences between nourished and malnourished groups were considered significant at $p<0.05$ and were represented by the symbol *



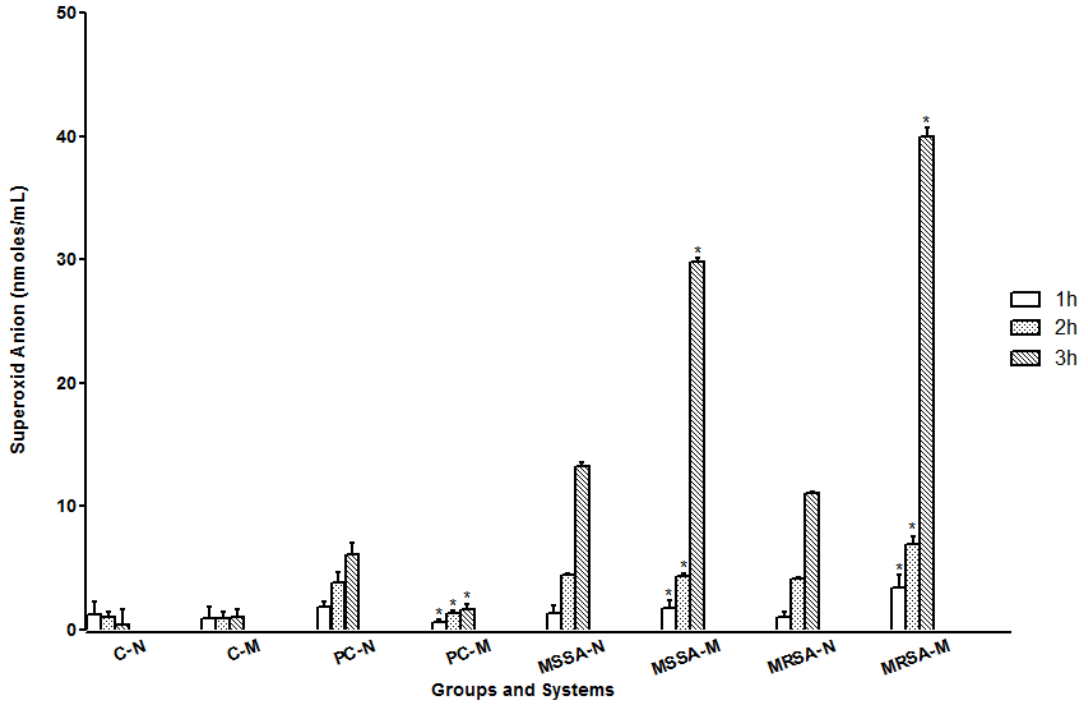
Poduction of nitric oxide. A lower production of nitric oxide in the malnourished group was detected, when compared to the nourished group (C-N: 1.178±0,6 µM; C-M: 1.28±0,69 µM; PC-N: 5.74±1,9 µM; PC-M: 2.57±0,38 µM; MSSA-N: 6.02±0,53 µM; MSSA-M: 1.39±0,51 µM; MRSA-N: 4.0±0,4 µM; MRSA-M: 2.52±0,42 µM), p <0.001. In relation to the test system, the nitrite concentration was higher in the supernatants of the MRSA from the nourished group, with p <0.05 (Figure 4).

Figure 4- Nitrite levels in the supernatant of the alveolar macrophages cultures in groups (N-Nourished and M-Malnourished) and systems (C-negative control, PC - positive control, MSSA - methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and MRSA - methicillin resistant *Staphylococcus aureus*). ANOVA and Tukey test. Results were expressed as mean ± standard deviation, n=24. Differences between nourished and malnourished groups were considered significant at p <0.05 and were represented by the symbol *



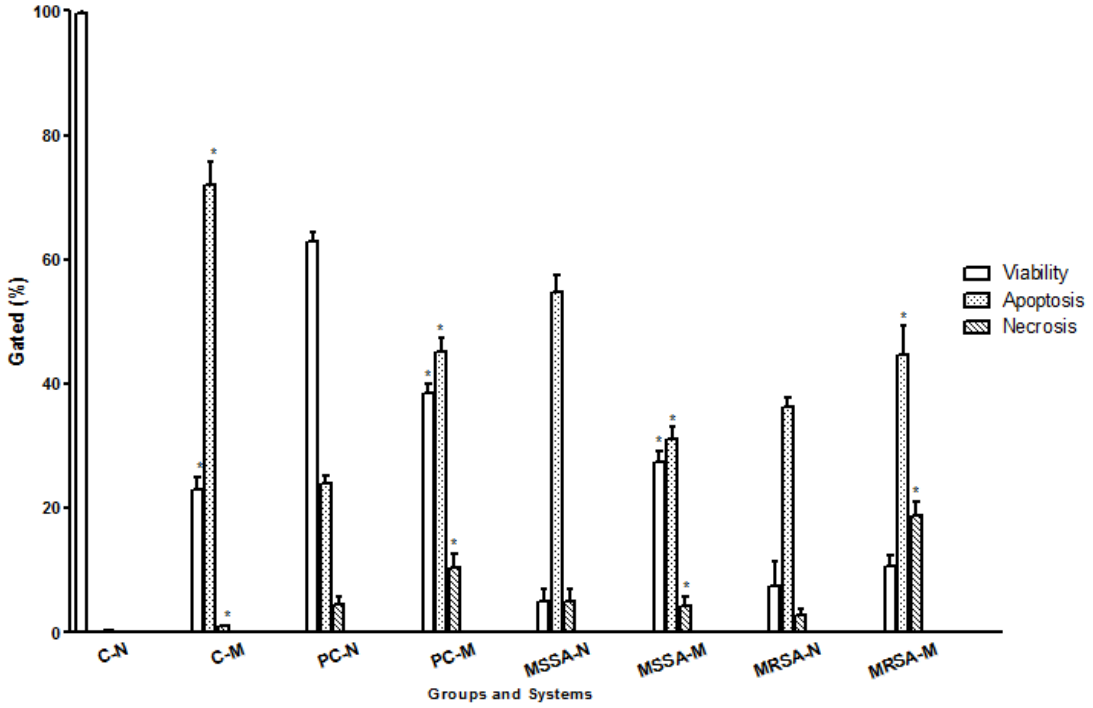
Production of the anion superoxide. A gradual increase of the production of anion superoxide during the incubation of cell cultures was observed in both the nourished and malnourished groups, $p < 0.05$. The lower production of this free radical was detected in the PC of the malnourished group ($p < 0.05$). When analyzing the test-systems, an increased production of superoxide anion was verified in the malnourished group at all times analyzed, $p < 0.001$. There was greater production of superoxide anion in the malnourished group's MRSA system (PC-N_{24h}: 22.44±1.76nmoles/mL; PC-M_{24h}: 18.10±2.1nmoles/mL; MSSA-N_{24h}: 13.19±4.5 nmoles/mL; MSSA-M_{24h}: 29.79±3.0nmoles/mL; MRSA-N_{24h}: 11.05±3.2nmoles/mL; MRSA-M_{24h}: 39.99±2.6nmoles/mL), $p < 0.05$ (Figure 5).

Figure 5- Levels of superoxide anion in the supernatant of alveolar macrophages cultures in groups (N- Nourished and M-Malnourished) and systems (C-negative control, PC - positive control, MSSA - methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and MRSA - methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) and incubation periods (1, 2 and 24h). ANOVA and Tukey test. Results were expressed as mean ± standard deviation, n=24. Differences between the nourished and malnourished groups were considered significant at $p < 0.05$ and were represented by symbol *



Viability of alveolar macrophages. There was a lower rate of viable cells in the controls of malnourished group when compared to the nourished group, $p < 0.05$. The highest percentage of apoptotic cells was detected in MSSA systems of the nourished group ($p < 0.001$) and, regarding the rate of necrosis, this percentage was higher in the MRSA of the malnourished group, $p < 0.05$ (Figure 6).

Figure 6- Viability, apoptosis and necrosis in groups (N- Nourished and M-Malnourished) and systems (C-negative control, PC - positive control, MSSA - methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and MRSA - methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) and incubation periods (1, 2 and 24h). ANOVA and Tukey test. Results were expressed as mean ± standard deviation, n=24. Differences between the nourished and malnourished groups were considered significant at $p < 0.05$ and were represented by the symbol *



Discussion

Malnutrition on critical periods on the development of organic systems can schedule a phenotypic standard susceptible to infection even after nutritional replacement [2]. The cell replication and protein synthesis are important events for the immunological competence and, therefore, they can be influenced by the individual's nutritional status. According to Schaible, Kaufmann [15], the cell's metabolic ability and the efficiency with which the defense cells respond to infectious processes are related to the nutritional profile of the host organism.

In this study, we used as an experimental model of neonatal malnutrition a 8%-casein hypoproteic diet. The reduction of protein in mothers' diet is characterized by the restriction of total amount of nutrients available to the pups. Thus, infant rats develop protein malnutrition and puppies, a protein-calorie malnutrition. This fact is crucial for the genesis of the deleterious effects observed in the offspring [2].

From the fourth postnatal day, there was a reduction in weight gain of malnourished animals, when compared to nourished animals. This growth retardation persisted during the period of nutritional supplementation. Araujo *et al.* [16] and Costa *et al.* [17], using the same model of neonatal malnutrition, found similar results. Porto *et* al. [18] found a reduction in weight of the malnourished animals after the fifth day of life. In addition to monitoring the weight gain of animals, it is essential to analyze the profile of microbicidal response of phagocytes through more sensitive and specific techniques, such as molecular biology.

In this study, the primers system, designed to detect the expression of iNOS, showed high sensitivity, specificity and excellent efficiency of reaction. According to Too [13], the quantification of the gene expression is based both on the specificity of the primers, including the amplification and detection of targets, as well as the quality of reaction. Thus, this system becomes an additional alternative for the detection of such important target of the microbicidal response.

The iNOS enzyme is absent in resting macrophages, but it is expressed after the activation of extra and intracellular receptors in response to pathogens [19]. When analyzing the results of qPCR, a lower expression of iNOS enzyme was observed in the malnourished group, when compared to the nourished one. By comparing these results with the nitric oxide levels in the supernatant of cultures, the same pattern of response was also observed. Thus, one can suggest that the malnutrition in the neonatal period scheduled a lower expression of important immune mediators, making the body susceptible to infections. According to Camel *et al.* [20], both the maternal diet during pregnancy and the inadequate peri-natal nutrition can affect organogenesis and, hence, the organic functions in adult life, even after nutritional replacement.

Corroborating these results, Ferreira-Silva *et* al. [21], by employing the same model of neonatal malnutrition, found similar data when analyzing NO production in macrophages after *in vitro* stimulation with LPS. Morais *et al*. [12], when performing the kinetics of production of this free radical every two hours, totaling 24h, also observed a reduction in the production of reactive nitrogen species in the malnourished group. These results may be a consequence of the nutritional *status* of the host during important events of immune competence in critical periods of development. The immune response involves a complex network of molecular and cellular interactions that require replication of deoxyribonucleic acid (DNA), mRNA expression and protein synthesis. All of these biological events require energy. Thus, early nutrition aggressions can permanently compromise these vital steps and change the evolution of the microbicidal response [2].

In test-systems, there was a greater expression of iNOS and nitric oxide production in the MSSA of the nourished group. This fact demonstrates an activation of the pathways of intracellular signaling of the microbicidal response, which can be effective or not, depending on the power of pathogen's virulence. Pumerantz *et al.* [22] reported that the NO produced by alveolar macrophages develops an important microbicide role against *S. aureus*. However, *S.*

aureus is able to adapt to the metabolically nitrosative stress by expressing the enzyme in inducible-NO-L-lactate dehydrogenase (LDH). The production of NO-L-lactate dehydrogenase allows the bacteria to maintain homeostasis during redox-nitrosative stress [23].

The activation of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent oxidase enzyme (NADPH oxidase) promotes the production of reactive-oxygen species (superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical), in a process called respiration explosion [24]. In this study, there was a gradual increase in the production of O_2^-in the supernatant of the alveolar macrophages culture in all systems. In MSSA and MRSA systems, a high production of superoxide anion was observed in the malnourished group. In malnutrition, there is an imbalance between the production and disposal of free radicals. The increase of circulating oxygen-reactive species triggers harmful effects that can injure the structures of biological systems [24, 25]

Despite the beneficial effect in cases of infection, the intense production of reactive-oxygen species becomes detrimental in systemic inflammation. Sepsis occurs in uncontrolled production of free radicals that can cause distant dissemination [25]. Thus, in malnutrition, immune function is impaired together with the exacerbation of harmful oxidation reactions, which can injure the structures of biological systems. Köhler *et al.* [26] found that in the neutrophil the NADPH oxidase-mediated mechanisms are essential in protecting the host against pulmonary infection with *S. aureus*. However, *S. aureus,* independent of its antimicrobial resistance profile, may be able to neutralize oxygen intermediates through the release of enzymes such as catalase and staphyloxanthin [27]. This immune response profile may contribute to the occurrence of systemic and serious infectious processes, associated with high morbidity and mortality rates.

In this study, a reduced rate of viable cells was detected in the malnourished group. This result was similar to that obtained by Ferreira-Smith *et al*. [21] and Mitchell *et al*. [12]. According to Rivandeira [28], malnutrition is associated with an increased rate of cell death. Protein-calorie deficiencies can induce irreversible cell damage due to several factors, including intense production of free radicals, which triggers the mechanism of programmed cell death.

The percentage of apoptosis was higher in the MSSA of the nourished group, probably because of the microbicidal response of macrophages. After phagocytosis, regardless of the

pathogen's death, the apoptosis is triggered, in order to promote an efficient elimination of micro-organisms and cease the infection [5, 29, 30]. With the apoptosis in phagocytes, there is a development of local inflammatory reaction, since proteolytic enzymes, cytosolic component of cells and invading micro-organism are retained in apoptotic bodies, which are subsequently removed [28]. Thus, we can state that the MSSA infection progresses faster to cure, especially for not inducing an exacerbated inflammatory process [5].

In this study, a higher rate of necrosis was verified on macrophages infected with MRSA in the malnourished group. During necrosis, the cell contents are released, inducing damage to neighboring cells and local inflammation. In order to escape the cytoplasmic confinement, *S. aureus* induces the death of phagocytes for triggering pyroptosis or releasing leucocidinas. The main feature of pyroptosis is the disruption of the plasma membrane with the release of pro-inflammatory intracellular contents, through caspase-1 (cytoplasmic protease) [31]. The mechanism of action of leucocidinas is the destruction of leukocytes by forming pores in the cell membrane. The presence of leukocidin is associated with severe and fatal infectious conditions by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus,* such as necrotizing pneumonia [32];

The triggering of pyroptosis and the possible presence of leukocidin toxin may have favored the high level of necrosis on *in vitro* infection found by MRSA. This result may explain the high mortality rate associated with MRSA infection. In addition, the harmful effects of neonatal malnutrition may predispose the onset of long term -irreversible injury in phagocytes. Thus, the life span of these cells was reduced and so the microbicidal response was unable to destroy the invading pathogen, what would further exacerbate the infection.

The conclusion obtained in this study is that nutritional aggression at critical periods of development has programmed a reduction in animals' body growth, in the expression of iNOS enzyme, in the production of nitric oxide and in the viability of alveolar macrophages detectable in the adult organism even after a long nutritional recovery. However, the production of reactive oxygen species was exacerbated. Thus, one may suggest that this framework can facilitate the installation of the infectious process and promote serious and systemic infections due to distant dissemination through free radicals. Regarding the sensitivity to methicillin of *Staphylococcus aureus* strains, the resistance appears to influence the mechanisms of evasion of microbicidal response, with reduced immune defense. Thus, with the interaction between neonatal malnutrition and infection with multidrug-resistant

bacteria, phagocytes become more susceptible to the development of serious and fatal infectious conditions.

Acknowledgements

The authors wish to thank CAPES, the National Council for Science and Technology (CNPq), Brazil, for their financial support, and Laboratory Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation - CPqAM/FIOCRUZ.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Pereira KNF, Vitoriano ILS, Melo MPP, Aragão RS, Toscano AE, Silva HJ, De Castro RM (2009). Effects of malnutrition and/or neonatal inhibition of serotonin reuptake in neuromuscular development of the gastrointestinal tract: review of literature. Neurob. 72 (2): 215-21.
2. Robinson S, Fall C (2012) Infant Nutrition and Later Health: A Review of Current Evidence. Nutr. 4, 859-874. doi:10.3390/nu4080859.
3. Fisher RE, Steele M, Karrow AA (2012) Fetal Programming of the Neuroendocrine-Immune System and Metabolic Disease. J Preg. 1:1-11. doi:10.1155/2012/792934.
4. Iliakis D, Kressig RW (2014) The relationship between malnutrition and immune. Ther Umsch. 71(1):55-61. doi: 10.1024/0040-5930/a000481.
5. Cruviel WM, Júnior DM, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Silva NP, Andrade LEC (2010) Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. Rev Bras Reumatol. 50(4): 434-61.
6. França TGD, Ishikawa LLW, Zorzella-Pezavento SFG, Chiuso-Minicucci F, Guerino CPF, Cunha MLRS, Sartori A (2009) Immunization protected well nourished mice but not undernourished ones from lung injury in Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infection. BMC Microbiol. 9:240. doi:10.1186/1471-2180-9-240.
7. Deurenberg RH, Stobberingh EE (2008) The evolution of Staphylococcus aureus. Infect Genet Evol. 8(6):747-63. doi: 10.1016/j.meegid.2008.07.007.

8. Zecconi A, Scali F (2013) Staphylococcus aureus virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. Immunology Letters. 150(1–2): 12–22.
9. Faria NA, Oliveira DC, Westh H, Monnet DL, Larsen AR, Skov R, De Lencastre H (2005) Epidemiology of emerging methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. J Clin Microbiol.43:1836-42.
10. Gordon RJ, Lowy FD (2008) Pathogenesis of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection. Clin Infect Dis, 16: 209-213, 2008.
11. Shibabaw A, Abebe T, Mihret A (2014) Antimicrobial susceptibility pattern of nasal Staphylococcus aureus among Dessie Referral Hospital health care workers, Dessie, Northeast Ethiopia. Internat J of Infect Dis, 2:1–4. doi.org/10.1016/j.ijid.2014.03.1386.
12. Morais NG, Costa TB, Almeida TM, Severo MS, De Castro CMMB (2013) "Parâmetros imunológicos de macrófagos frente à infecção por Staphylococcus aureus meticilina sensível/resistente". J Bras Patol Med Lab. 49(2): 84-90. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442013000200002.
13. Too HP (2003) Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. Molecular Brain Research, Amsterdam, 114: 146-154.
14. Gonçalves SC, Régis-da-Silva CG, Brito MEF, Brandão-Filho SP, Paiva-Cavalcanti M (2012) Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of leishmaniasis. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 18(2): 188-197.
15. Schaible UE, Kaufmann SHE (2007) Malnutrition and Infection: Complex Mechanisms and Global Impacts. PLoS Medic. 4(5): 806-812. doi:10.1371/journal/pmed.0040115.t001.
16. Araujo FRG, De Castro CMMB, Rocha JA, Sampaio B, Diniz MFA, Eve LB, Montarroyos UR (2012) Perialveolar bacterial microbiota and bacteraemia after dental alveolitis in adult rats that had been subjected to neonatal malnutrition. Brit J Nutrit, 107: 996–1005. doi: 10.1017/S000711451100393X.

17. Costa TB, Morais NG, Almeida TM, Severo MS, De Castro CMMB (2012) Early malnutrition and production of IFN-□, IL-12 and IL-10 by macrophages/lymphocytes: in vitro study of cell infection by methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Rev. Nutr. 25(5): 607-619. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732012000500006.
18. Porto SMMS, Viana MT, Silva KMF, Diniz MFA, De Castro CMMB (2007) Desnutrição neonatal e microbiota normal da cavidade oral em ratos. Rev Bras Nutr. 20(6): 625-32.
19. Mcgettrick AF, O'neill LAJ (2010) Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. Curr Opin Immunol. 22(1): 20-7.
20. Camelo JRJS, Martinez FE (2005) Dilemas nutricionais no pré-termo extremo e repercussões na infância, adolescência e vida adulta. J.Pediatr. 81(1): 340-347.
21. Ferreira-Silva WT, Galvão BA, Ferraz PKN, De Castro CMMB, De Castro RM (2008) "Perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide release by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rat". Neuroimmun, 23: 120-9.
22. Pumerantz A, Muppidi K, Agnihotri S, Guerrac C, Venketaraman V, Wangb J, Betageri G (2010) Preparation of liposomal vancomycin and intracellular killing of meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Internat J Antimicrob Ag. 32: 1-5.
23. Richardson AR, Libby SJ, Fang FC (2008) A Nitric Oxide–Inducible Lactate Dehydrogenase Enables Staphylococcus aureus to Resist Innate Immunity; Science. 319: 1-21. doi: 10.1126/science.1155207.
24. Macedo EMC, Amorim MAF, Silva ACS, Castro CMMB (2010) Effects of copper, zinc and magnesium deficiency on the immune system of severely malnourished children. Rev Paul Pediatr. 28(3):329-36.
25. Sarni ROS, Souza FIS, Cocco RR, Mallozi MC, Solé D (2010) Micronutrients, immunologic system and allergic diseases. Rev. bras. alerg. imunopatol. 33(1): 8-13.
26. Köhler J, Breitbacha K (2011) NADPH-oxidase but not inducible nitric oxide synthase contributes to resistance in a murine Staphylococcus aureus Newman pneumonia model. Microbes and Infection. 13(11): 914–922.

27. Nizet V (2007) Understanding how leading bacterial pathogens subvert innate immunity to reveal novel therapeutic targets. J Allergy Clin Immunol. 120(1): 13-22. doi:10.1016/j.jaci.2007.06.005.
28. Rivadeneira DE, Grobmyer SR, Naama HA, Mackrell PJ, Mestre JR, Stapleton PP, Daly JM (2010) Malnutrition-induced macrophage apoptosis. Surgery, 129(5): 617-25.
29. Grivicich I, Regner A, Rocha AB (2007) Apoptosis: Programmed Cell Death. R Bras Canc. 53(3): 335-343.
30. Ribeiro R, Sousa DWN, Oliveira TS, Fernandes KPS, Junior JAS (2012) Intense Physical Activity: Role of Nitric Oxide in Apoptosis. Ter Man. 10(48): 1-5.
31. Schroder K, Tschopp J (2010) The Inflammasomes. Cell, March, 140(19): 821–832.
32. Carvalho RLB, Berezin EM, Mimica ML (2012). Detection of lukS-PV and lukF-PV in Staphylococcus aureus pediatric isolates. Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo. 57(2): 59-62.

APÊNDICE D – Versão em inglês do ARTIGO II

Title of paper: Expression of receptors TLR-2, TLR-4, NLRP3 and of caspase-1 enzyme in alveolar macrophages of adult rats submitted to *in vitro* neonatal malnutrition and infected with methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[1].

Names of authors

Natália Gomes de Morais[2]

Thacianna Barreto da Costa[3]

Joana Maria Bezerra de Lira[4]

Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque[5]

Valéria Rêgo Alves Pereira[6]

Milena de Paiva Cavalcanti[7]

Célia Maria Machado Barbosa de Castro[8]

[1]Article from the thesis MORAIS, N.G., entitled "Effect of neonatal malnutrition on intracellular signaling and viability of alveolar macrophages infected in vitro with methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*" - Federal University of Pernambuco; 2014.

Affiliations of authors

[2]Assistant Professor at Federal University of São Francisco Valley.

[3]PhD student in Tropical Medicine at FEDERAL UNIVERSITY OF PERNAMBUCO.

[4]Undegraduate student in Scientific Initiation of the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami.

[5]PhD student in Biosciences and Biotechnology for Health, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation - CPqAM/FIOCRUZ

[6]Researcher at the Laboratory of Immunogenetics, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation - CPqAM/FIOCRUZ.

[7]Researcher in the laboratory of Immunoparasitology, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation - CPqAM/FIOCRUZ.

[8]Associate Professor 2 at Federal University of Pernambuco.

***Address for correspondence:**

Natália Gomes de Morais

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.

Phone: +55 81 21268484

Fax: +55 81 21268485

E-mail: natalia.morais@univasf.edu.br

Running Title of paper: Malnutrition and infection by MSSA and MRSA.

Keywords: Critical period of development; Programming; Macrophage; Neonatal malnutrition; MRSA.

Abstract

Objective: To evaluate the effect of neonatal malnutrition expression of TLR-2, TLR-4, NLRP3 receptors and caspase-1 enzyme after *in vitro* cell infection with methicillin resistant/sensitive *Staphylococcus aureus.* Methods: Male Wistar rats (n = 24) were divided into two distinct groups: Nourished (diet with 17% casein) and Malnourished (diet with 8% casein). Macrophages were recovered after surgical tracheostomy procedure, by collecting Broncho alveolar lavage. After isolation of mononuclear cells, four systems have been established: negative control, positive control and two testing systems, methicillin-resistant and methicillin-sensitive Staphylococcus aureus. The plates were incubated for 24 h at 37°C in a humidified atmosphere and 5% of CO_2. After this period, tests were performed to analyze the expression of standard recognition receptors and of the caspase-1 enzyme. In the statistical analysis, we used Student t and ANOVA, accepting $p < 0.05$. Results: Malnutrition led to reduced growth of the animals, from the expression of receptors TLR-2, TLR-4, NLRP3 and caspase-1 enzyme in macrophages infected with LPS. However, *Staphylococcus aureus* interaction versus macrophages promoted a greater gene expression of receptors and enzyme. Conclusion: The neonatal malnutrition model committed the expression of standard recognition receptors and of the caspase-1 enzyme. However, the relationship *S. aureus* and

neonatal malnutrition promoted intense transcription of such components of the innate immunity. Therefore, a deregulation of the expression of TLR, NLRP3 receptors and caspase-1 enzyme can induce extensive tissue injury and promote the permanence and spread these bacteria, especially the methicillin-resistant.

Introduction

The most vulnerable stage of growth and development of organic systems comprises the end of pregnancy, lactation and the first years of life, being the critical periods of physiological plasticity[1]. Early environmental insults directed at critical periods of development may cause permanent effects on structures and functions of the nervous, endocrine and immune systems, reverberating in adulthood. According to Palmer[2] after nutritional deficits, all body processes schedule an adaptive functional reduction as a strategy for survival.

The effects of nutrient deficiency on the immune response depend on the magnitude, duration and time of deficit. The expression profile of recognition receptors (TLRs, Toll-like receptors and RLN, Nod-like receptors) prepares to infection resistance or susceptibility[3]. The receiver-pathogen interaction is responsible for various cellular mechanisms such as phagocytosis and activation of intracellular signaling pathways, capable of inducing the proliferation and differentiation of cells of the immune system[3, 4].

Important events of microbicidal response dependent on the protein synthesis, as receptors' expression, production of free radicals, cytokines, pro-inflammatory mediators and clonal expansion[4, 5]. The malnutrition in the neonatal period promotes deficiency in calories and amino acids, essential in the synthesis of deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA), in the production of acute phase proteins and energy and, doing so, it may compromise the defense against pathogens[6].

Despite being opposed by a number of immune mechanisms, both nonspecific and specific, *S. aureus* has a number of exit strategies that allows the evasion of host defenses. This bacterium has an arsenal of virulence factors arranged on its surface or secreted into the external medium that may reduce the microbicidal response of the phagocyte, induce cells death and/or prevent the mechanism of action of the antibiotics[7].

Cutler[8] suggested that changes in the cell walls of *S. aureus* related to multi-resistance phenotype could exacerbate their virulence mechanisms. In 2009, França *et al.*[9]

found that infection with methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is associated with severe and fatal cases. However, it remains unclear whether the resistance is an independent risk factor for morbidity and mortality of infected individuals.

Malnutrition is an important risk factor for mortality in infections with methicillin-resistant *S. aureus*[9, 10]. However, the effect of malnutrition on susceptibility to infection with *S. aureus* is not investigated systematically. Thus, it is necessary to evaluate the expression of TLR-2, TLR-4, NLRP3 receptors and of caspase-1 enzyme in alveolar macrophages in adult rats subjected to neonatal malnutrition and *in vitro*-infected with methicillin resistant/sensitive *Staphylococcus aureus*.

Materials and Methods

Ethical Considerations. This research was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Center for Biological Sciences of the Federal University of Pernambuco (protocol number 23076.031259/2011-85).

Animals and diet. Twenty-four male, albino, 90-120 days old Wistar rats from the colony of the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco were used for the study. The animals were kept under controlled temperature (22 ± 1°C) with a light-dark photoperiod cycle of 12:12h and with free access to water and food. One day after birth, the litter was standardized in six male pups per mother. On that same day - on the first day of life - the litters were divided into two groups: nourished (N) - consisting of pups nursed by mothers undergoing a 17% casein-based protein diet (n=12); Malnourished (M) - pups nursed by mothers undergoing a 8% casein-based protein diet (n=12) during the first 21 days after birth. The 8% casein is widely used as an experimental model for the study of malnutrition, since it induces, on animals, a protein malnutrition. During the neonatal period, daily records were taken (in digital electronic scale - Mars, model S-4000-with a sensitivity of 0.1g), of body weight of each animal, in order to monitor body weight during nutritional manipulation. From the 22nd day of life until the end of the experiment, body weight was measured three times a week, in order to monitor the nutritional recovery of the animals. In this period, the animals were separated from their mothers, kept in collective cages containing three rats per cage and received standard diet of Vivarium (Labina Purina-Brazil) until adulthood (90-120 days).

Strains of *Staphylococcus aureus*. Methicillin-resistant (The American Type Culture Collection – ATCC 33591) and methicillin-sensitive *S. aureus* (ATCC 29213) were used, due

to their distinctive resistance profile and their importance in terms of public health. Bacteria were maintained in Tryptic Soy Broth Broth (TSB) supplemented with 20% glycerol and at -20°C until its use. Twenty-four hours prior to each experiment, the strains were plated on Blood Agar (blood agar supplemented with 5% sheep) plates and incubated at 37°C. At the beginning of the test, some colonies were transferred to tubes containing sterile PBS, in order to obtain, with the aid of a spectrophotometer at 570nm, a turbidity of 0.15nm. This absorbance, according to Morais *et al.*[11], corresponds to a concentration of approximately 10^6 bacteria/mL PBS (Phosphate Buffer Saline).

Bronchoalveolar lavage (BAL). The animals were anaesthetized with chloralose-urethane (0.5 and 12.5%, respectively) at a ratio of 8mL/kg (i.p.). The LBA was collected by a 0.9%-saline injection through a plastic cannula inserted into the trachea. Several aliquots of 3mL were injected and collected in conical polypropylene tubes 50mL (Falcon, Sigma).

Culture of alveolar macrophages. BAL samples were centrifuged at 268g for 15min. The precipitate corresponding to the cells was resuspended in RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium - Gibco-Invitrogen Corporation) containing 3% bovine fetal serum and antibiotics (penicillin 100U/mL and streptomycin 100µg/mL). The cells were transferred to 35mm-diameter culture plates (6-well Falcon) at a ratio of 10^6 cells/mL of RPMI 1640 each well. After an 1hour- incubation at 37°C and 5% CO_2, the supernatant was disregarded with non-adherent cells and 1mL of half RPMI was added. Cell cultures were incubated under the above conditions for cells' stabilization.

Systems. Four systems were established: negative control (C) containing only alveolar macrophages; positive control for TLR-2 (PC): 10µL of the lipopolysaccharide (10 mcg/mL) of bacteria of serotype *Porphyromonas gingivalis*; positive control for caspase, NLRP3 and (PC): 10µL of the macrophages lipopolysaccharide (10µg/mL) of the *Escherichia coli* serotype serotype incubated for 2 hours, and then with adenosine triphosphate (ATP 5mM) for 30 minutes; positive control for TLR-4 (PC): macrophage more 10µL of lipopolysaccharide of *Escherichia coli* serotype; MSSA, macrophages plus 100µL of bacterial inoculum on the sensitive strain (ATCC 29213) and MRSA, macrophages plus 100µL of bacterial inoculum of resistant strain (ATCC 33591). The plates were incubated for 24 hours at 37°C, humid atmosphere with 5% CO2.

Extraction of macrophages adhered to the cell culture plate. The extraction of macrophages was performed using Versene reagent (1x Gibco by life Technologies). For the

analysis of cell viability, the *pellet* of the cells was resuspended in 1mL PBS; for the analysis of molecular biology 800µL of Trizol was added and stored at -80 ° C.

Extraction of RNA macrophages frozen in Trizol. In each sample there was an addition of 200µL chloroform, incubated for 3 minutes at room temperature and centrifuged at 11.725g for 10 minutes. The RNA-containing supernatant (aqueous phase) was transferred to new tubes and precipitated by adding 500µL of isopropanol. The tubes were incubated at room temperature and then centrifuged using the same conditions. The supernatant was discarded, 1mL of 70% ethanol was added and centrifuged at 8848g for 5 minutes. The RNA *pellet* was incubated for 5 minutes at room temperature and resuspended with 30µL in RNAse free water (DEPC). RNA was quantified in a spectrophotometer NanoDrop™ (ThermoScientific, Waltham, Massachusetts) at a wavelength of 260nm and 280nm, and stored at -80ºC.

Reverse transcription of RNA into cDNA. Total RNA was converted to cDNA using the QuantiTect® Reverse Transcription kit through the automatic thermocycler Eppendorf mastercycler gradient. The cycling conditions used were: 42°C for 30 min and 96°C for 3min.

Primers. With the aid of software Primer Express (Applied Biosystems, version 2.0), primers were designded for the deteciton of receptors TLR-2, TLR-4 and NLRP3 (access number in Genback of the base sequences used NM_198769.2, NM_019178.1, NM_001191642, respectively). The designed primers were: TLR-2F 5'CACCTCAATGGGGTTGGTAA 3', TLR-2R 5'ATAGAAGTGGGGATGTGCAG 3'; TLR-4F 5' ATTTACAGAGGGGCAACCGC 3', TLR-4R 5'TGGCATTTTCTGCAACCAGC 3'; NLRP3F 5' TCTAGTCCAAGAGGAAAGTAAC3',NLRP3R5'CCTAGAAAAGACTGCTCGACTT 3'. The primers system for caspase-1 enzyme detection was obtained in the study of Chiba *et al.*[(12)]: caspase-1F 5'GAAAGAATTTGCTGCCTGCCCAGA3'; caspase-1R 5'GCTTGTCTTTCAAGCTTGGGCACT3'.

Evaluation of sensitivity, specificity and efficiency of primers. To evaluate the sensitivity (detection limit) serial dilutions (factor 10) of the positive controls cDNA were performed at concentrations of 1fg to 1ng. The test sensitivity was defined as the amplification of the target DNA's highest dilution when compared to the formation of primers dimers in samples without DNA. Efficiency was determined by the formula: $\varepsilon=(10^{1/slope})$ -1. To assess the specificity, the standardization of target samples was performed (cDNA of the positive controls with their respective primers) and testing samples (cDNA of positive controls with

nonspecific primers systems) was performed. The specificity (σ) was defined by the equation $\sigma = (1+ \varepsilon)^{\Delta Ct}$ where ε means amplification efficiency and Δ*Ct* the difference in values of the Cts (Cycle Threshold) of the target sample and test samples[13]. The results were expressed as *Ct*, σ e Log σ on a 10-basis.

Quantification of the expression of TLR-2, TLR-4, NLRP3 receptors and of the caspase-1 enzyme. The quantification of gene expression was obtained by quantitative PCR in real time (qPCR). Amplification of samples was performed by QuantiFast® Syber® green PCR kit in the ABI Prism 7500 apparatus (Applied Biosystems, CA, USA). The cycling conditions were: initial denaturation at 95°C/1 s, and annealing and 60ºC/1min extension in 40 cycles. The final volume of each reaction was 25µL, comprising 12.5µL SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), 8.5µL of water, 1µL of each primer *(*5pmoles) and 2µL of DNA template. The reactions were performed in duplicate for the quantification of each gene and the reaction negative controls (NTC). The method used to calculate the relative expression was the comparative standard curve. To construct the standard curve, serial dilutions (1:10) of cDNA at concentrations of 1fg to 1ng were made. The endogenous control used (reference gene) was the GAPDH (Glyceraldehydes-3-Phosphate Dehydrogenase), which primer systems used were: GAPDHF 5'ATCTTCCAGGAGCGAGATCCC 3' and GAPDHR 5' GTGGGCAAGGTCATCCCT 3'[14]. The mRNA expression of targets was achieved by two sequential normalization: by calibrator and by endogenous (negative control). The first normalization was performed as follows: target gene quantity/quantity of the reference gene, where quantity is the absolute quantity values on the basis of the standard curve gene. After normalization of the target gene, RQ (relative amount of mRNA) was obtained by normalizing the calibrator.

Sequencing. The sequencing of the samples was carried out at the Technology Platforms Nucleus of Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation (CPqAM/FIOCRUZ/PE) through the big-Dye Terminator v3.1 kit and the ABI 3100 Genect Analyzer – Applied Byosistems. The sequences were determined in both directions (using the same primers individually) and submitted to the NCBI - BLASTn for the analysis of homology with the genes.

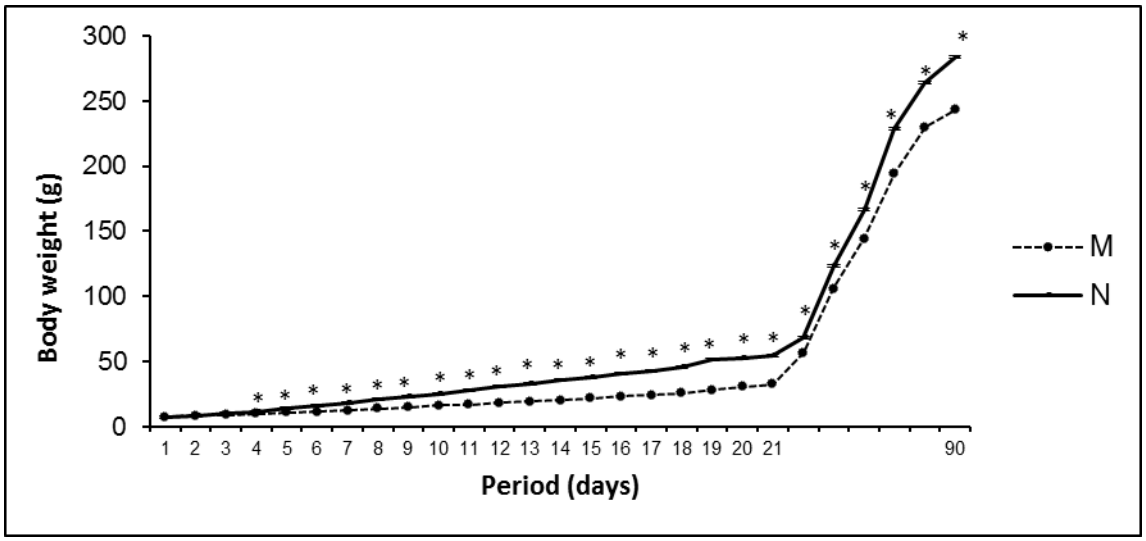
Statistical Analysis. To evaluate the evolution of body weight the Student t test was used. In relation to other analyzes, we used the Analysis of Variance (ANOVA) for parametric data. When ANOVA revealed a significant difference, the Tukey test was used to identify which

groups differed. Significance was set at p <0.05. The statistical program used for the analyzes was the Sigma Stat®.

Results

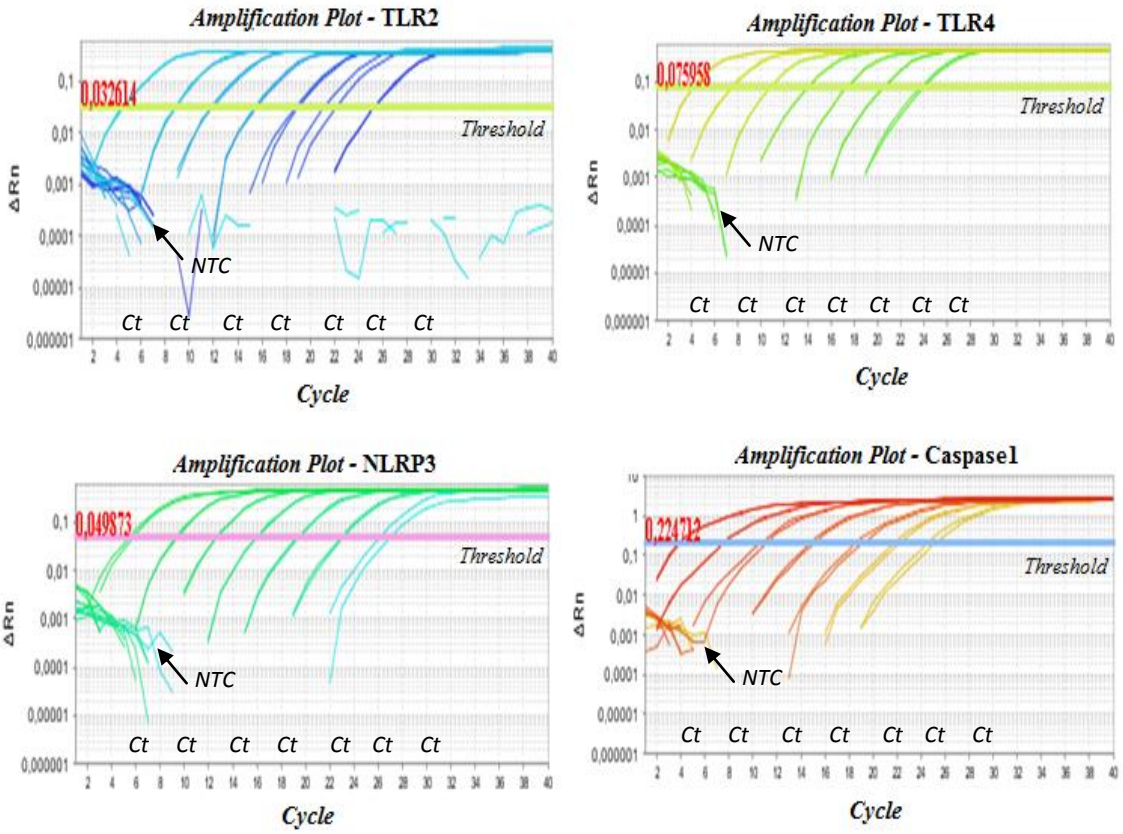
Body weight in malnutrition and nutritional supplementation. In the first days of life, the body weights (g) of the nourished and malnourished groups were similar, until the 3rd day. From the 4th until postnatal day 21, the values of body weights of the malnourished animals were lower than those of nourished animals (p<0.001). Between the 22nd and the 90th day of life, a nutritional supplementation occurred and weight values of the malnourished group were lower when compared to the fed group (p <0.001) (Figure 1).

Figure 1- Evolution of the weight curve during the neonatal malnutrition (21 days) and nutritional supplementation (23-90 days) on groups (N-Nourished and M-Malnourished). Student's t test. Results were expressed as mean ± standard deviation, n = 24. Differences between the nourished and malnourished groups were considered significant at p <0.05 and were represented by the symbol *



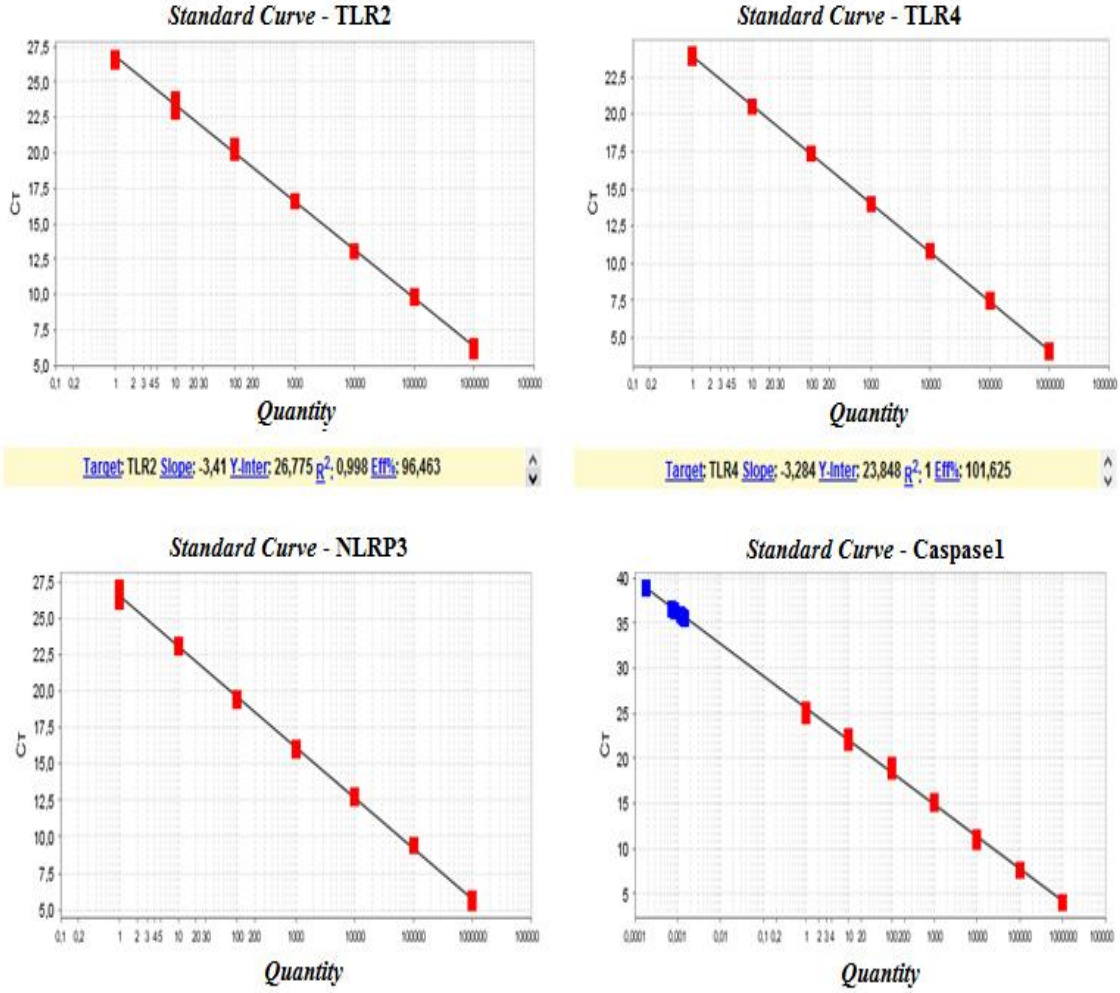
Primers Sensivity. In all primers systems, the sensivity (detection limit) was 1fg of cDNA (Figure 2).

Figure 2- Plot of cDNA amplification curves of the iNOS (LPS) positive control (on 1fg to 1ng concentrations). Caption: Threshold (detection threshold); Ct (Cycle Threshold); NTC (negative control of reaction).



Primers Efficiency. The efficiency of primers system from receptor TLR-2 was of 96.46% (R2= 0.998, ε = 0.9646 and slope= -3.41), of TLR-4: 100% (R2: 1.0 ε = 1.0 and slope= -3.28), of NLRP3: 94.48% (R2: 0.999, ε = 0.9448 e slope= -3.46) and of caspase-1 enzyme: 91.21% (R2: 0.996, ε = 0.9121 and slope= -3.6) (Figure 3).

Figure 3- Efficiency of the primers system based on serial dilutions (factor 10) of cDNA of positive controls, in concentrations from 1fg to 1ng. Caption: Quantity (absolute values)**;** Ct (Cycle Threshold)**.**

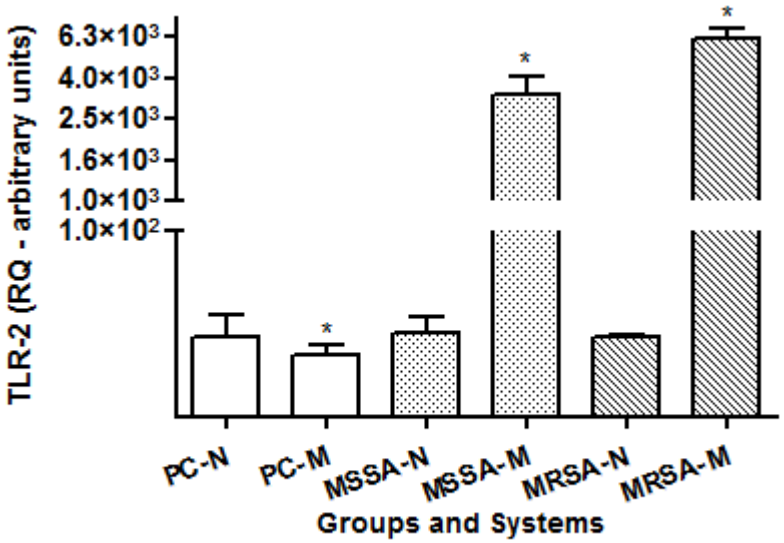


Primers Specifity. The primers system presented a high specifity**:** TLR-2 (Ct: 33.27, σ: 99994421.5; Ct: 29.28, σ: 6759138.4; Ct: 25.64, σ: 578689.886), TLR-4 (Ct: 24.11, σ: 5817608.74; Ct: 23.68, σ: 2561002.36; Ct: 22.83, σ: 4435081.39), NLRP3(Ct: 30.42, σ: 97915235.06; Ct: 28.50, σ: 335884212.3; Ct: 29.84, σ: 231007360.8) and caspase-1 (Ct:36.49, σ: 4706966491; Ct: 35.83, σ: 2960302462; Ct: 35.5, σ: 3204696788). When analyzing Log σ, the primers system to detect TLR-2 is 10^{8}, 10^{7}, 10^{6} times more specific for TLR-2 than for TLR-4, NLRP3 and caspase-1 receptors, respectively. For primers system of TLR-4, it was $10^{6,0}$, $10^{5,9}$, $10^{5,6}$ times more specific, while for NLRP3 it was $10^{8,6}$, $10^{7,0}$, $10^{6,9}$ times more specific and caspase-1 was $10^{9,8}$, $10^{9,1}$, $10^{8,9}$ times more specific.

Sequencing of the amplified samples in qPCR. The products obtained for each target were sequenced and the results were: amplicon TLR-2 - 100% homology with the TLR-2 receptor of *Rattus norvegicus*; amplicon TLR-4 - 100% homology with the TLR-4 receptor of *Rattus norvegicus*; amplicon NLRP3 - 95% homology with the NLR receptor family and the amplicon of caspase-1 obtained 99% homology with caspase-1 enzyme of *Rattus norvegicus*.

Quantification of the expression of TLR-2 receptor. The lowest RQ of TLR-2 receptor occurred on CP-PG in the malnourished group, when we compare it to the nourished one (PC-N: 0.525±0.1; PC-M: 0.21±0.15; MSSA-N: 0.61±0.74; MSSA-M: 3285.19±727.8; MRSA-N: 0.50±0.08; MRSA-M: 61638.6±749.38), $p<0.05$. By analyzing the bacterial systems, the highest expression was detected in the MRSA of the malnourished group, $p<0.05$ (Figure 4).

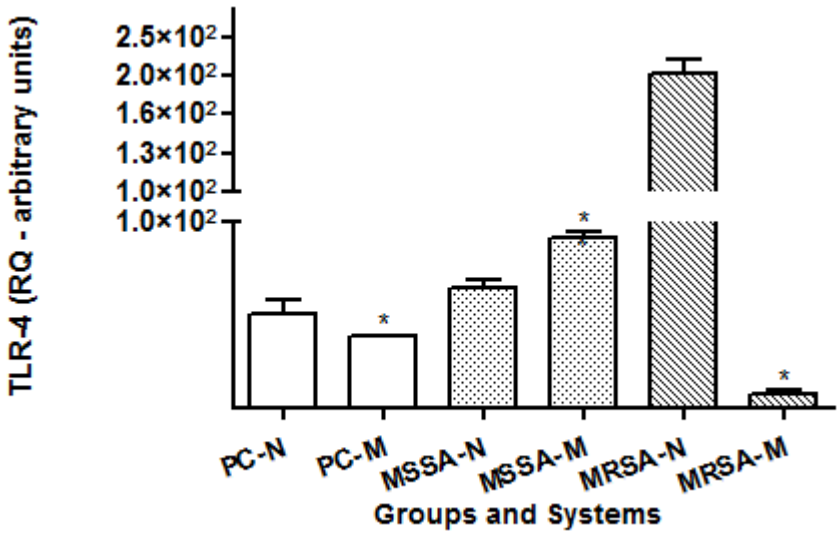
Figure 4- Relative expression of TLR-2 receptor in groups (N-Nourished; M-Malnourished) and systems (PC - positive control, MSSA - methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and MRSA - methicillin resistant *Staphylococcus aureus*). ANOVA and Tukey test. Results were expressed as mean ± standard deviation, n = 24. Differences between the nourished and malnourished groups were considered significant at $p<0.05$ and were represented by the symbol *



Quantification of the expression of the TLR-4 receptor. The difference between the nourished and malnourished group was observed in the CP-EC and in the MRSA with a lower RQ of TLR-4 in MRSA (PC-N: 1.01±1.0; PC-M: 0.34±0.01; MSSA-N: 3.75±2.09; MSSA-M: 43.73±20.08; MRSA-N: 201.77±116.9; MRSA-M: 0.02±0.004), $p<0.05$. The highest expression of this receptor was observed in the MRSA of the nourished group, $p<0.001$ (Figure 5).

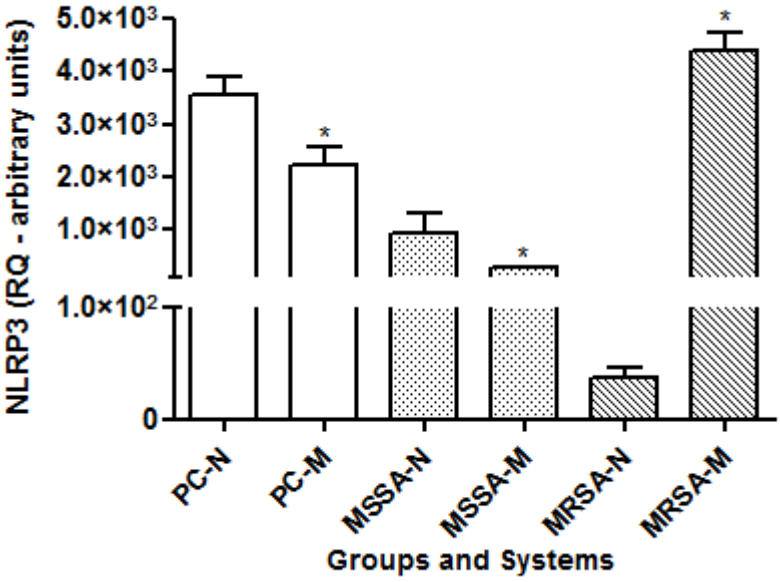
Figure 5- Relative expression of TLR-4 receptor in groups (N-Nourished; M-Malnourished) and systems (PC - positive control, MSSA - methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and MRSA - methicillin resistant *Staphylococcus aureus*). ANOVA and Tukey test. Results were

expressed as mean ± standard deviation, n = 24. Differences between the nourished and malnourished groups were considered significant at p <0.05 and were represented by the symbol *



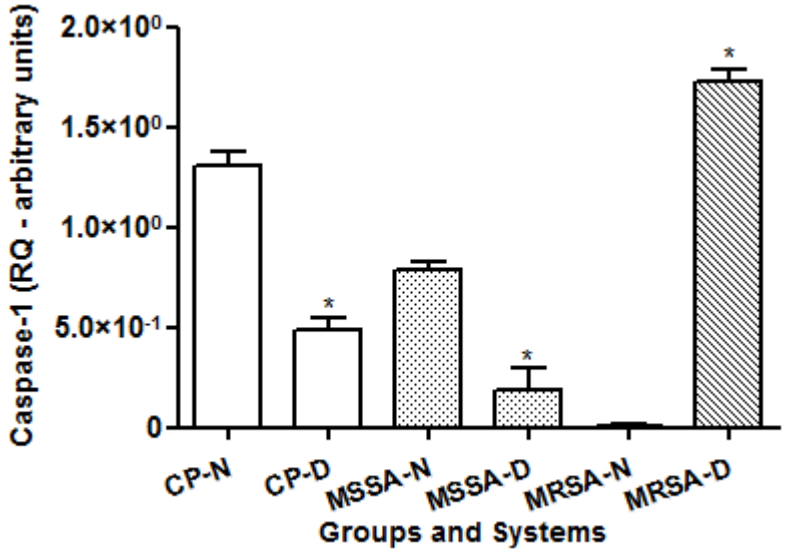
Quantification of the expression of NLRP3 receptor. The lowest RQ of NLRP3 was observed in the PC and MSSA of the malnourished group, when we compare it to the nourished group, with a more significant reduction in MSSA (PC-N: 3534.91±359.32; PC-M: 2231.36±345.45; MSSA-N: 952±345.85; MSSA-M: 295.55±12.09; MRSA-N: 37.69±8.14; MRSA-M: 4383.53±341.79), p<0.05. However, the greatest expression of this receptor was observed in MRSA of the malnourished group, p <0.001 (Figure 6).

Figure 6- Relative expression of the NLRP3 receptor in groups (N-Nourished; M-Malnourished) and systems (PC - positive control, MSSA - methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and MRSA - methicillin resistant *Staphylococcus aureus*). ANOVA and Tukey test. Results were expressed as mean ± standard deviation, n = 24. Differences between the nourished and malnourished groups were considered significant at p <0.05 and were represented by the symbol *



Quantification of the expression of caspase-1. The difference between the nourished and malnourished group was observed in PC and MSSA, with lower RQ in the PC (PC-N: 1.39±0.06; PC-M: 0.49±0.05; MSSA-N: 0.78±0.04; MSSA-M: 0.188±0.11; MRSA-N: 0.009±0.01; MRSA-M: 1.7±0.06), $p<0.05$. When analyzing bacterial systems a greatest expression of this enzyme is higher in MRSA of the malnourished group, $p <0.001$ (Figure 7).

Figure 7- Relative expression of caspase-1 enzyme in groups (N-Nourished; M-Malnourished) and systems (PC - positive control, MSSA - methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and MRSA - methicillin resistant *Staphylococcus aureus*). ANOVA and Tukey test. Results were expressed as mean ± standard deviation, n = 24. Differences between the nourished and malnourished groups were considered significant at $p <0.05$ and were represented by the symbol *



Discussion

Changes in the intake of certain nutrients during critical periods of immune system's plasticity can cause irreversible disturbances in microbicide response[2]. Although the restoration of a balanced postnatal diet can reduce the loss from an early nutritional aggression, its effects may remain for a long-term in the immune response[1]. In the present study, the neonatal malnutrition model was based on a 8% casein diet, characterized for being hypoproteic.

It was observed, from the 4th day of lactation, that that malnutrition caused deficit in body weight, evidenced by a retardation of weight gain that persisted during nutritional supplementation. These data are in agreement with those obtained by Costa *et al.*[15] and Araujo *et al.*[16]. Food restriction during development of the animal, can cause irreversible effects, depending on the period and also on the organ under development. If this restriction occurs during cell multiplication, the animals will not reach normal levels of the weight of some organs, even after nutritional recovery, due to the decrease in the number of cells[1].

Studies have demonstrated that a low protein diet during pregnancy and lactation induce permanent change in the structure and functionality of physiological systems, such as nervous, endocrine and immune response[17, 18]. This deleterious character to the development of immune function may be partly a consequence of the low availability of amino acids due to protein malnutrition. These compounds are substrates for receptor expression, enzymes synthesis, hormones, molecules that are essential for proper formation and maturation of the organ systems[2].

In this study, primers were designed for the detection of specific targets in order to reveal the effects of neonatal malnutrition on the immune response to infection by multidrug-resistant bacteria. Primers systems obtained showed high sensitivity, specificity and excellent efficiency of reaction. The accuracy of quantification of gene expression is based either on the specificity of the primers, including amplification and detection of targets, as well as the quality of reaction[13]. Thus, these detection systems can assist in future studies area. Due to the importance of these targets, these may become essential components for the diagnosis and therapy of diseases associated with immune response.

The expression of TLR-2 receptor was lower in macrophages infected *in vitro* with LPS from the malnourished group, if compared to the nourished group. The TLR-2 is expressed at high levels in neutrophils and plays a key role in the response to peptidoglycan, lipoteichoic acid and a variety of macromolecules of Gram positive bacteria[19]. Nietrs[20], through an *in vitro* study, found that macrophages from mice deficient in TLR-2 did not develop response to *S. aureus* peptidoglycan, making the body susceptible to the establishment of the infection.

In bacterial systems, intense expression of TLR-2 was observed for both MSSA and MRSA for the malnourished group, most notably for MRSA. Despite the increased transcription of mRNA, protein synthesis steps or intracellular signaling pathways may be compromised. According to Schaible, Kaufmann[6], a fine control of nutritional deficiency and the level of protein transcription exists, thus, low levels of RNA could be found for some proteins and, for others, they are not affected, or are high, however, the biological function is compromised.

The cell wall of *S. aureus* contains molecules bound to the peptidoglycan which, when interacting with TLR-2, not only act as pathogen-associated molecular patterns, triggering innate proinflammatory immune responses, but may also act as modulators of anti-inflammatory response[21]. Kurokawa *et al.*[22] biochemically characterized one component (D-alanylation teichoic acid) of the cell wall of *Staphylococcus aureus,* which acts interfering with peptidoglycan recognition by TLR-2 and promoting the induction of humoral response.

In the expression of TLR-4 there was a lower transcription in macrophages infected *in vitro* with LPS and MRSA in the malnourished group, when compared to nourished group. The protein-energy malnutrition causes a deficiency of calories and amino acids, essential in the synthesis of DNA, RNA, production of proteins and enzymes. Depending on the intensity

and duration of the nutritional changes, the consequences will have greater or lesser impact on the entire body in the future[5, 6]. Thus, one may suggest that macrophages from malnourished animals in the neonatal period were programmed to express low levels of this receptor.

In contrast, an increased expression of TLR-4 was found in the MRSA-nourished group was observed. The TLR-4 has the ability to recognize the lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria and lipoteichoic acid from Gram positive bacteria. This receptor would be considered a duplicate identification of Gram-positive bacteria in the extracellular space[23, 24]. The stimulation by bacteria and fungi through TLR-4 is able to mediate the induction of pro-inflammatory cytokines, while the recognition of micro-organisms by TLR-2 can lead to the release of anti-inflammatory mediators, in consequence of the interaction parasitology host[23].

The continuous act of interaction between pathogen and Toll-like receptors, trigger different cellular signaling pathways, including the involvement of NLR proteins and intracellular receptors (nucleotid-binding oligomerization domain receptor), which are central platforms of innate immunity. This sequence culminates with the production and secretion of several proinflammatory cytokines (IL-1β and IL-18), through the activation of a protein complex called the inflammasome. The NLRP3 inflammasome plays a critical role in the response against the *Staphylococcus aureus* bacteria[25].

The expression of NLRP3 receptor was lower in the positive control and MSSA in the malnourished group when compared to the nourished one. This result again confirms the hypothesis of the immune system programming by early nutritional aggressions, which induce permanent effects on structures and functions of the immune system and that may promote increased susceptibility to infections in adult life[26]. In response to an infection, the activation of inflammasomes helps to limit the invasion of micro-organism. *In vivo* experiments using a model of subcutaneous abscess by *S. aureus* revealed a critical role for NLRP3 -/- in recruitment of neutrophils and infection control[27].

In this study, an elevated transcription of mRNA of NLRP3 in MRSA in the malnourished group was observed. Despite the inflammasome constituting an important component of the innate immune response in host defense, its unregulated activation is associated to the induction of extensive tissue damage. *S. aureus* produces several toxins forming pores that are implicated in the pathogenesis of severe infections and are able to activate the NLRP3 inflammasome[27]. The α-hemolysin staphylococcal is an essential factor in the virulence of *S. aureus* in severe pneumonia. This cytolysin enables the NLRP3 inflammasome during

infection of the lung parenchyma by *S. aureus* in order to induce production of interleukin-1β and cell death [28, 29]. According to Kebaier *et al.*[29] rats NLRP3 -/- develop less severe pneumonia.

The NLRP3 inflammasomes are important regulators of inflammation and are essential for proteolytic activation of caspase-1[30]. By comparing the results of the NLRP3 with the expression of the enzyme caspase-1, the same transcription profile was observed. Corroborating these results, Mariathasan *et al.*[31] observed a weak but significant activation of caspase-1 after *S. aureus* infection in macrophages stimulated with LPS. Caspase-1 is required for the proteolytic processing and secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-1β and IL-18) and also for the induction of a type of cell death called pyroptosis. The pyroptosis is characterized by disruption of the plasma membrane and the release of pro-inflammatory intracellular contents[30].

In skin infections caused by *Staphylococcus aureus*, Soong *et al.*[32] found that this bacterium promotes the activation of caspase-1 and triggers the death of keratinocytes via pyroptosis. While the keratinocytes underwent degradation, *S. aureus* proliferated in the intracellular space of phagocytes, and thus escaped from toxicity of the pyroptosis proteolytic products. In severe pneumonia, when *S. aureus* activates the NLRP3 inflammasome, pyroptosis seems to protect this pathogen of phagocytes microbicidal response and promotes damage to the lung architecture, thus facilitating the penetration of bacteria through the epithelial barrier[29].

Given the results found in this study, one may suggest that the infection by MRSA associated with early nutritional aggression inducts severe inflammatory conditions and extensive tissue injury. Although the simultaneous activation of TLR and NLRP3 is important for rapid innate immune response, its exacerbated profile induces the process of uncontrolled cell death and, therefore, may promote the dissemination of the pathogen. Moreover, due to the higher expression of NLRP3, it is suggested that this receptor may be a possible target for future pharmacological interventions in severe infections by methicillin- resistant *S. aureus*.

Conclusion

The neonatal malnutrition model in use programmed a reduction on the expression of extracellular, intracellular receptors, and of the caspase-1 enzyme in alveolar macrophages infected *in vitro* with LPS. However, this response was not observed in *S. aureus* versus-host relationship, this interaction promoted greater transcription of the receptors and enzymes

RNA. Regarding the sensitivity to methicillin of *Staphylococcus aureus* strains, resistance appears to influence the mechanisms of evasion of microbicidal response by inducing an exacerbation of the immune response via NLRP3. This response profile was installed in order to promote tissue injury by facilitating the spread of the bacteria on the host organism. By associating neonatal malnutrition to MRSA infection one may suggest a greater propensity for developing severe and fatal infections, due to the impairment of microbicidal response and the intensity of the inflammatory process caused by the parasite-host relationship.

Acknowledgements

The authors wish to thank Laboratory of Immunopathology Keizo Asami – LIKA/UFPE and Laboratory Aggeu Magalhães Research Center - CPqAM/FIOCRUZ, for their provided advice and support.

Financial support

Coordination for the Improvement of Higher Level or Education- Personnel (CAPES – grant 01/2010) and National Council for Science and Technology (CNPq - n° 14/2011 - protocol number: 478808/2011-9), Brazil, for their financial support.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Authorship

MORAIS, NG participated in the elaboration of the research project, the experimental strategy, data collection, tabulation, the discussion of the results and writing of the article. COSTA, TB participated in the preparation of the experimental groups, maintenance of animals in the biotherium and collecting data. LIRA, JMB participated in the preparation of the experimental groups, maintenance of animals in the biotherium and collecting samples. ALBUQUERQUE, SCG participated in designing the research project and experimental strategy. PEREIRA, VRA; PAIVA-CAVALCANTI, M; CASTRO, CMMB took part in the research project, the discussion of the results and drafting of the article.

References

1- Fisher RE, Steele M, Karrow AA (2012) Fetal Programming of the Neuroendocrine-Immune System and Metabolic Disease. Journal Pregnancy. 1:1-11. doi:10.1155/2012/792934.

2- Palmer AC (2011) Nutritionally Mediated Programming of the Developing Immune System. American Society for Nutrition. 2: 377–395. doi:10.3945/an.111.000570.

3- Mcgettrick AF, O'neill LAJ (2010) Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. Current Opinion in Immunology. 22(1):20-7.

4- Hilmi D, Parcina M, Stollewerk D, Ostrop J, Josten M, Meilaender A, Zaehringer U, Wichelhaus Ta, Bierbaum G, Heeg K, Wolz C, Bekeredjian-Ding I. (2014) Heterogeneity of Host TLR-2 Stimulation by *Staphylocoocus aureus* Isolates. PLOS ONE. 9(5): 1-11.

5- Iliakis D, Kressig RW (2014) The relationship between malnutrition and immune. Therapeutische Umschau. 71(1):55-61. doi: 10.1024/0040-5930/a000481.

6- Schaible UE, Kaufmann SHE (2007) Malnutrition and Infection: Complex Mechanisms and Global Impacts. PLoS Medicine. 4(5): 806-812. doi:10.1371/journal/pmed.0040115.t001.

7- Sun K, Metzger DW (2014) Influenza infection suppresses NADPH oxidase-dependent phagocytic bacterial clearance and enhances susceptibility to secondary methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. The Journal of Immunology. 192(7):3301-7. doi: 10.4049/jimmunol.1303049.

8-Cutler RR (1979) Relationship between antibiotic resistance, the production of "virulence factors", and virulence for experimental animals in *Staphylococcus aureus*. Journal of Medical Microbiology. 2: 55-62.

9-França TGD, Ishikawa LLW, Zorzella-Pezavento SFG, Chiuso-Minicucci F, Guerino CPF, Cunha MLRS, Sartori A (2009) Immunization protected well nourished mice but not undernourished ones from lung injury in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. BMC Microbiology. 9(240): 1-7.

10- Opilla M (2008) Epidemiology of bloodstream infection associated with parenteral nutrition. American Journal of Infection Control. 36: 5-8.

11- Morais NG, Costa TB, Almeida TM, Severo MS, De Castro CMMB. "Parâmetros imunológicos de macrófagos frente à infecção por *Staphylococcus aureus* meticilina sensível/resistente". Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2013; 49(2): 84-90. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442013000200002.

12- Chiba T, Itoh T, Tabuchi M, Nakazawa T, Satou T (2012) Interleukin-1β Accelerates the Onset of Stroke in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. Mediators of Inflammation. 1(1): 1-11.

13- Too HP (2003) Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. Molecular Brain Research. 114: 146-154.

14- Gonçalves SC, Régis-da-Silva CG, Brito MEF, Brandão-Filho SP, Paiva-Cavalcanti M (2012) Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of leishmaniasis. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 18(2): 188-197.

15- Costa TB, Morais NG, Almeida TM, Severo MS, De Castro CMMB (2012) Early malnutrition and production of IFN-γ, IL-12 and IL-10 by macrophages/lymphocytes: in vitro study of cell infection by methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Revista Brasileira de Nutrição. 25(5): 607-619. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732012000500006.

16- Araujo FRG, De Castro CMMB, Rocha JA, Sampaio B, Diniz MFA, Eve LB, Montarroyos UR (2012) Perialveolar bacterial microbiota and bacteraemia after dental alveolitis in adult rats that had been subjected to neonatal malnutrition. British Journal of Nutrition, 107: 996–1005. doi: 10.1017/S000711451100393X.

17- Macedo EMC, Amorim MAF, Silva ACS, Castro CMMB (2010) Effects of copper, zinc and magnesium deficiency on the immune system of severely malnourished children. Revista Paulista de Pediatria. 28(3):329-36.

18- Bento-Santos A, Silveira LR, Manhães-De-Castro R, Leandro CG (2012) Perinatal undernutrition and hypothalamic control of food intake and energy metabolism in the skeletal muscle. Revista Brasileira de Nutrição. 25(3):403-413.

19- Jann NJ, Schmaler M, Ferracin F, Landmann R (2011) TLR-2 enhances NADPH oxidase activity and killing of Staphylococcus aureus by PMN. Immunology Letters. 135(1–2): 17–23.

20- Nieters A, Beckmann L, Deeg E, Becker N (2006) Gene polymorphisms in Toll-like receptors, interleukin-10, and interleukin-10 receptor alpha and lymphoma risk. Genes and Immunity, Hampshire. 7(6): 615-24.

21- Mele T, Madrenas J (2010) TLR-2 signalling: At the crossroads of commensalism, invasive infections and toxic shock syndrome by *Staphylococcus aureus*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 42(7): 1066–1071.

22- Kurokawa K, Gong J, Ryu K, Zheng L, Chae J, Kim M, Lee BL (2011) Biochemical characterization of evasion from peptidoglycan recognition by Staphylococcus aureusD-alanylated wall teichoic acid in insect innate immunity. Developmental & Comparative Immunology. 35(8): 835–839.

23- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 124: 783-801.

24- Kurokawa K, Gong J, Ryu K, Zheng L, Chae J, Kim M, Lee BL (2011) Biochemical characterization of evasion from peptidoglycan recognition by *Staphylococcus aureus* D-alanylated wall teichoic acid in insect innate immunity. Developmental & Comparative Immunology. 35(8): 835–839.

25- Paiva-Oliveira EL, Silva AC, Silva RM, Sevenini LA, Melo HÁ, Lagrota-Candido JM, Quirino-Santos T (2012) Inflamassoma e sua Repercussão Clínica: Revisão da Literatura. Revista de Ciências Médicas e Biológicas. 11:340-347.

26- Pereira KNF, Vitoriano ILS, Melo MPP, Aragão RS, Toscano AE, Silva HJ, De Castro RM (2009). Effects of malnutrition and/or neonatal inhibition of serotonin reuptake in neuromuscular development of the gastrointestinal tract: review of literature. Neurobiology. 72(2): 215-21.

27- Franchi L, Muñoz-Planillo R, Núñez G (2012) Sensing and Reacting to Microbes via the Inflammasomes. Nature Immunology. 13(4):325-332.

28- Graves SF, Kobayashi SD, DeLeo FR (2010) Community-associated methicillin resistant Staphylococcus aureus immune evasion and virulence. Journal of Molecular Medicine. 8:109–14.

29- Kebaier C, Chamberland RR, Allen IC, Gao X, Broglie PM, Hall JD, Jania C, Doerschuk CM, Tilley SL, Duncan JA (2012) Staphylococcus aureus α-Hemolysin Mediates Virulence in a Murine Model of Severe Pneumonia Through Activation of the NLRP3 Inflammasome. The Journal of Infectious Diseases. 205(5): 807–817. doi: 10.1093/infdis/jir846.

30- Latz E (2010) The inflammasomes: mechanisms of activation and function. Current Opinion in Immunology. 22: 28–33.

31- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. Nature. 440: 228–232.

32- Soong G, Chun J, Parker D, Prince A (2012) *Staphylococcus aureus* Activation of Caspase 1/Calpain Signaling Mediates Invasion Through Human Keratinocytes. The Journal of Infectious Diseases. 205(10): 1571-1579.

ANEXOS

ANEXO A- Comitê de Ética

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

Recife, 10 de abril de 2012.

Oficio 430/12

Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Profa.Célia Maria Machado Barbosa de Castro**
Processo nº 23076.031259/2011-85

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 e sinalização intracelular de macrófagos alveolares infectados, in vitro, com Staphylococcus aureus Meticilina sensível e Meticilina resistente".***

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,

Profa. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA
UFPE

Observação: Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição - UFPE; Animais: Ratos, Linhagem: Wistar; Sexo: Machos; Idade: adulto 90 dias; Peso: ±253g; Nº de Animais previsto no projeto: 50 animais.

ANEXO B –*Comprovante de submissão –European Journal Nutrition*

EJON: Submission Confirmation for Effect of neonatal malnutrition on expression of nitric oxide synthase enzyme, production of free radicals and in vitro feasibility of alveolar macrophages infected with methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus.
1 mensagem

Editorial Office (EJON) <em@editorialmanager.com> 25 de setembro de 2014 12:11
Responder a: "Editorial Office (EJON)" <eurjnutr@gmail.com>
Para: Natalia Gomes Morais <morais.ngm@gmail.com>

Dear Mrs Natalia Gomes Morais,

Your submission entitled "Effect of neonatal malnutrition on expression of nitric oxide synthase enzyme, production of free radicals and in vitro feasibility of alveolar macrophages infected with methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus." has been received by journal European Journal of Nutrition

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

The URL is http://ejon.edmgr.com/.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Springer Journals Editorial Office
European Journal of Nutrition

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding.
Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

ANEXO C –Instruções para autores –European Journal Nutrition

Types of Papers

- Accepted article types: Original Articles, Reviews, Short Communications, Letters to the Editors.
- Declaration of Conflict of Interest is mandatory for all submissions. Please refer to the section "Integrity of research and reporting" in the Instructions for Authors.
- Original Articles must not exceed 25 manuscript pages of max. 32 lines each. Exceptions can be made only with the agreement of the responsible Editor.
- Short Communications should not have more than 4 authors, and not contain more than 1000 words and 10 references. Summary and key words are not required. Preliminary results of highly innovative studies may be submitted as Short Communications.

Letters to the Editors should not have more than 4 authors, and not contain more than 1000 words and 10 references. Summary and key words are not required. Letters are expected to provide substantive comments on papers published in the EJN. Both the letter and a reply, if appropriate, are published together whenever possible.

Please submit Original Articles, Reviews, Short Communications electronically via Editorial Manager using the hyperlink “Submit online"

Please send Letters to the Editor directly to the following e-mail address: eurjnutr@gmail.com

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:
Purpose (stating the main purposes and research question)
Methods
Results
Conclusions
Keywords
Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.
TEXT
Text Formatting
Manuscripts should be submitted in Word.
The text of a research paper should be divided into Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Conflict of Interest, and References.
Materials and Methods must include statement of Human and Animal Rights.
Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
Use italics for emphasis.
Use the automatic page numbering function to number the pages.
Do not use field functions.
Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
Use the equation editor or MathType for equations.
Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
LaTeX macro package (zip, 182 kB)
Headings
Please use no more than three levels of displayed headings.
Abbreviations
Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.
Footnotes
Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.
Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.
Always use footnotes instead of endnotes.
Acknowledgments
Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.
Line numbering:
Please activate the line numbering function for your manuscript.
REFERENCES
Citation
Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:
1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].

3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. Eur J Appl Physiol 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. N Engl J Med 965:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. J Mol Med. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork –

photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the
highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the
quality of the artwork provided.
Electronic Figure Submission
Supply all figures electronically.
Indicate what graphics program was used to create the artwork.
For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.
Line Art
Definition: Black and white graphic with no shading.
Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
Halftone Art
Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.
Combination Art
Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.
Color Art
Color art is free of charge for online publication.
If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).
Figure Lettering
To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
Do not include titles or captions within your illustrations.
Figure Numbering
All figures are to be numbered using Arabic numerals.
Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,
"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.
Figure Captions
Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.
Figure Placement and Size
When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.
Permissions
If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.
Accessibility
In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that
All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1
ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL
Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.
Submission
Supply all supplementary material in standard file formats.
Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations
Always use MPEG-1 (.mpg) format.
Text and Presentations
Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
A collection of figures may also be combined in a PDF file.
Spreadsheets
Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).
Specialized Formats
Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.
Collecting Multiple Files
It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.
Numbering
If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", “... additional data are given in Online Resource 4”.
Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.
Captions
For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.
Processing of supplementary files
Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.
Accessibility
In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that
The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)
INTEGRITY OF RESEARCH AND REPORTING
Ethical standards
Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.
It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.
These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.
The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements
Conflict of interest

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.

ANEXO D – Comprovante de submissão – British Journal of Nutrition

British Journal of Nutrition - Manuscript ID BJN-RA-14-0093

1 mensagem

bjn.edoffice@cambridge.org <bjn.edoffice@cambridge.org> 24 de setembro de 2014 15:26
Para: morais.ngm@gmail.com

24-Sep-2014

Dear Prof. MORAIS,

Your manuscript entitled "Expression of receptors TLR-2, TLR-4, NLRP3 and of caspase-1 enzyme in alveolar macrophages of adult rats submitted to in vitro neonatal malnutrition and infected with methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus." has been successfully submitted online for consideration for publication in British Journal of Nutrition. Your manuscript ID is BJN-RA-14-0093. If we have any queries regarding your submission we will contact you within the next few days.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence. If there are any changes in your contact details, please log in to ScholarOne Manuscripts at http://mc.manuscriptcentral.com/bjn and edit your user information as appropriate. You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to http://mc.manuscriptcentral.com/bjn Thank you for submitting your manuscript to British Journal of Nutrition.

Yours sincerely,
Juanita Goossens-Roach
Editorial Assistant
British Journal of Nutrition

bjn.edoffice@cambridge.org

+44 (0) 1223 325977

http://mc.manuscriptcentral.com/bjn

ANEXO E– Instruções para autores – British Journal of Nutrition

Directions to Contributors
British Journal of Nutrition
(Revised September 2014)
British Journal of Nutrition (BJN) is an international peer-reviewed journal that publishes original papers and review articles in all branches of nutritional science. The underlying aim of all work should be to develop nutritional concepts.

SUBMISSION

This journal uses ScholarOne Manuscripts for online submission and peer review.
Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

SCOPE

The British Journal of Nutrition encompasses the full spectrum of nutritional science and reports of studies in the following areas will be considered for publication: Epidemiology, dietary surveys, nutritional requirements and behaviour, metabolic studies, body composition, energetics, appetite, obesity, ageing, endocrinology, immunology, neuroscience, microbiology, genetics, and molecular and cell biology. The focus of all manuscripts submitted to the journal must be to increase knowledge in nutritional science.
The journal does NOT publish papers on the following topics: Case studies; papers on food technology, food science or food chemistry; studies of primarily local interest; complementary medicine; studies on pharmaceutical agents or that compare the effects of nutrients to those of medicines; substances that are considered primarily as medicinal agents; studies in which a nutrient or extract is administered by a route other than orally (unless the specific aim of the study is to investigate parenteral nutrition) nor studies using non-physiological amounts of nutrients (unless the specific aim of the study is to investigate toxic effects).

In vivo and in vitro models

Studies involving animal models of human nutrition and health or disease **will only be considered for publication** if the amount of a nutrient or combination of nutrients used could reasonably be expected to be achieved in the human population.
Studies involving *in vitro* models **will only be considered for publication** if the amount of a nutrient or combination of nutrients is demonstrated to be within the range that could reasonably be expected to be encountered in vivo, and that the molecular form of the nutrient or nutrients is the same as that which the cell type used in the model would encounter in vivo.

Extracts

Studies involving extracts **will only be considered for publication** if the source of starting material is readily accessible to other researchers and that there are appropriate measures for quality control, that the method of extraction is described in sufficient detail with appropriate quality control measures, that the nutrient composition of the extract is characterised in detail and that there are measures to control the quality of the composition of the extract between preparations, and that the amount of extract used could reasonably be expected to be achieved in in the human population (or in animals if they are the specific target of an intervention).
Studies involving extracts in *in vitro* models **will only be considered for publication** if the above guidelines for studies involving extracts are followed, and that the amount and molecular form of the extract is the same as that which would be encountered by the cell type used in the model in vivo.

Manuscripts submitted to BJN that are outside of the journal's scope or do not meet the above requirements will be rejected immediately.

1

REVIEW PROCESS

British Journal of Nutrition uses a single blind review process.

As part of the online submission process, authors are asked to affirm that the submission represents original work that has not been published previously, and that it is not currently being considered by another journal. Authors must also confirm that each author has seen and approved the contents of the submitted manuscript. Finally, authors should confirm that permission for all appropriate uses has been obtained from the copyright holder for any figures or other material not in his/her copyright, and that the appropriate acknowledgement has been made to the original source.

At submission, authors are asked to nominate at least four potential referees who may then be asked by the Editorial Board to help review the work. Manuscripts are normally reviewed by two external peer reviewers and a member of the Editorial Board.

When substantial revisions are required to manuscripts after review, authors are normally given the opportunity to do this once only; the need for any further changes should at most reflect only minor issues. If a paper requiring revision is not resubmitted within 2 months, it may, on resubmission, be deemed a new paper and the date of receipt altered accordingly.

PUBLISHING ETHICS

British Journal of Nutrition considers all manuscripts on the strict condition that:

1) The manuscript is your own original work, and does not duplicate any other previously published work;

2) The manuscript has been submitted only to the journal - it is not under consideration or peer review or accepted for publication or in press or published elsewhere;

3) All listed authors know of and agree to the manuscript being submitted to the journal; and

4) The manuscript contains nothing that is abusive, defamatory, fraudulent, illegal, libellous, or obscene.

The Journal adheres to the Committee on Publication Ethics (COPE) guidelines on research and publications ethics.

Text taken directly or closely paraphrased from earlier published work that has not been acknowledged or referenced will be considered plagiarism. Submitted manuscripts in which such text is identified will be withdrawn from the editorial process. If a concern is raised about possible plagiarism in an article published in *British Journal of Nutrition*, this will be investigated fully and dealt with in accordance with the COPE guidelines.

ARTICLE TYPES

British Journal of Nutrition publishes the following: Research Articles, Review Articles, Systematic Reviews, Horizons in Nutritional Science, Workshop Reports, Invited Commentaries, Letters to the Editor, Obituaries, and Editorials.

Research Articles, Reviews, Systematic Reviews, Horizons Articles, Letters to the Editor and Workshop Reports should be submitted to http://mc.manuscriptcentral.com/bjn. Please contact the Editorial Office on bjn.edoffice@cambridge.org regarding any other types of article.

Review Articles

BJN is willing to accept critical reviews that are designed to advance knowledge, policy and practice in nutritional science. Current knowledge should be appropriately contextualised and presented such that knowledge gaps and research needs can be characterised and prioritised, or so that changes in policy and practice can be proposed along with suggestions as to how

any changes can be monitored. The purpose or objective of a review should be clearly expressed, perhaps as question in the Introduction, and the review's conclusions should be congruent with the initial objective or question. Reviews will be handled by specialist Reviews Editors. Please contact the Editorial Office with any queries regarding the submission of potential review articles. All reviews, including systematic reviews and meta-analyses, should present the 2
uncertainties and variabilities associated with the papers and data being reviewed; in particular BJN cautions against uncritical acceptance of definitions and non-specific global terminology, the advice of advisory bodies, and reference ranges for example.

Reviews: These articles are written in a narrative style, and aim to critically evaluate a specific topic in nutritional science.

Horizons in Nutritional Science: These are shorter than Review articles and aim to critically evaluate recent novel developments that are likely to produce substantial advances in nutritional science. These articles should be thought-provoking and possibly controversial.

Systematic Reviews and meta-analyses: The journal endorses the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) Statement, a guideline to help authors report a systematic review and meta-analysis (see British Medical Journal (2009) 339, b2535). A systematic review or meta-analysis of randomised trials and other evaluation studies should follow the PRISMA guidelines.

Letters to the Editor

Letters are invited that discuss, criticise or develop themes put forward in papers published in BJN. They should not, however, be used as a means of publishing new work. Acceptance will be at the discretion of the Editorial Board, and editorial changes may be required. Wherever possible, letters from responding authors will be included in the same issue as the original article.

DETAILED MANUSCRIPT PREPARATION INSTRUCTIONS

Language

Papers submitted for publication must be written in English and should be as concise as possible. We recommend that authors have their manuscript checked by someone whose first language is English before submission, to ensure that submissions are judged at peer review exclusively on academic merit.

We list a number of third-party services specialising in language editing and / or translation, and suggest that authors contact as appropriate. Use of any of these services is voluntary, and at the author's own expense.

Spelling should generally be that of the *Concise Oxford Dictionary* (1995), 9th ed. Oxford: Clarendon Press.

Authors are advised to consult a current issue in order to make themselves familiar with BJN as to typographical and other conventions, layout of tables etc. Sufficient information should be given to permit repetition of the published work by any competent reader of BJN.

Published examples of BJN article types can be found below:

Research Article

Review Article

Horizons Article

Letter to the Editor

Authorship

The Journal conforms to the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) definition of authorship, as described by P.C. Calder (*Br J Nutr* (2009) **101**, 775).

The contribution of individuals who were involved in the study but do not meet these criteria should be described in the Acknowledgments section.

Ethical standards

The required standards for reporting studies involving humans and experimental animals are detailed in an Editorial by G.C. Burdge (*Br J Nutr* (2014) **112**).

Experiments involving human subjects

The notice of contributors is drawn to the guidelines in the World Medical Association (2000) Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects, with notes of clarification of 2002 and 2004 (http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/), the *Guidelines on the Practice of Ethics* 3

Committees Involved in Medical Research Involving Human Subjects (3rd ed., 1996; London: The Royal College of Physicians) and the Guidelines for the ethical conduct of medical research involving children, revised in 2000 by the Royal College of Paediatrics and Child Health: Ethics Advisory Committee (*Arch Dis Child* (2000) **82**, 177–182). Articles reporting randomised trials must conform to the standards set by the

Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) consortium.

Required disclosures: A paper describing any experimental work on human subjects must include the following statement in the Experimental Methods section: "This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and all procedures involving human subjects/patients were approved by the [insert name of the ethics committee; a specific ethics number may be inserted if you wish]. Written [or Verbal] informed consent was obtained from all subjects/patients. [Where verbal consent was obtained this must be followed by a statement such as: Verbal consent was witnessed and formally recorded]." For clinical trials, the trial registry name, registration identification number, and the URL for the registry should be included.

PLEASE NOTE: From 1 October 2014, as a condition for publication, all randomised controlled trials that involve human subjects submitted to BJN for review must be registered in a public trials registry. A clinical trial is defined by the ICMJE (in accordance with the definition of the World Health Organisation) as any research project that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes. Registration information must be provided at the time of submission, including the trial registry name, registration identification number, and the URL for the registry.

Experiments involving the use of other vertebrate animals

Papers that report studies involving vertebrate animals must conform to the 'ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research' detailed in Kilkenny *et al***.** **(***J Pharmacol Pharmacother* (2010) **1**,94-99) and summarised at www.nc3rs.org.uk. Authors must ensure that their manuscript conforms to the checklist that is available from the nc3Rs website. The attention of authors is drawn particularly to the ARRIVE guidelines point 3b ('Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology', point 9c ('Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment') and point 17a ('Give details of all important adverse events in each experimental group'). The Editors will not accept papers reporting work carried out involving procedures that cause or are considered likely to cause distress or suffering which would confound the outcomes of the experiments, or experiments that have not been reviewed and approved by an animal experimentation ethics committee or regulatory organisation.

Required disclosures: Where a paper reports studies involving vertebrate animals, authors must state in the Experimental Methods section the institutional and national guidelines for the care and use of animals that were followed and that all experimental procedures involving animals were approved by the [insert name of the ethics committee or other approving body; wherever possible authors should also insert a specific ethics/approval number].

Manuscript Format

The requirements of BJN are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals produced by the ICMJE.

Typescripts should be prepared with 1.5 line spacing and wide margins (2 cm), the preferred font being Times New Roman size 12. At the ends of lines, words should not be hyphenated unless hyphens are to be printed. **Line numbering and page numbering are required.**

Manuscripts should be organised as follows:

Cover Letter

Papers should be accompanied by a cover letter including a brief summary of the work and a short explanation of how it advances nutritional science. The text for the cover letter should be entered in the appropriate box as part of the online submission process.

Title Page

The title page should include:

1. The title of the article;
2. Authors' names;

4

3. Name and address of department(s) and institution(s) to which the work should be attributed for each author;
4. Name, mailing address, email address, telephone and fax numbers of the author responsible for correspondence about the manuscript;
5. A shortened version of the title, not exceeding 45 characters (including letters and spaces) in length;
6. At least four keywords or phrases (each containing up to three words).

Authors' names should be given without titles or degrees and one forename may be given in full. Identify each author's institution by a superscript number (e.g. A.B. Smith1) and list the institutions underneath and after the final author.

If the paper is one of a series of papers that have a common main title followed by a subtitle specific to the individual paper, numbering should not be used to indicate the sequence of papers. The format should be 'common title: specific subtitle', with a short common title, e.g. 'Partitioning of limiting protein and energy in the growing pig: testing quantitative rules against experimental data'.

Abstract

Each paper must open with an unstructured abstract of **not more than 250 words**. The abstract should be a single paragraph of continuous text without subheadings outlining the aims of the work, the experimental approach taken, the principal results (including effect size and the results of statistical analysis) and the conclusions and their relevance to nutritional science.

Introduction

It is not necessary to introduce a paper with a full account of the relevant literature, but the introduction should indicate briefly the nature of the question asked and the reasons for asking it. It should be **no longer than two manuscript pages**.

Experimental methods

The methods section must include a subsection that describes the methods used for statistical analysis (see the section on statistical analysis in the appendix below) and the sample size must be justified by the results of appropriate calculations and related to the study outcomes.
For studies involving humans subjects or experimental animals, the Methods section must include a subsection that reports the appropriate ethical approvals for the study (see Ethical Standards above).
All analytical procedures must be accompanied by a statement of within and between assay precision.
PCR analysis: Where experiments involve measurement of mRNA including microarray analysis, for analysis of individual genes, mRNA should be measured by quantitative RTPCR. A statement about the quality and integrity of the RNA must be provided together with the results of eletrophoretic analysis of the purity of the PCR products. Unless published elsewhere, full details of the oligonuceoltide primers and of the PCR protocol must be stated either in the text or in Supplementary Material. The stability of reference genes used for normalisation of PCR data must be reported for the experimental conditions described. Where possible, analysis of mRNA levels should be accompanied by assessment of either protein levels or activities.
Microarray analysis: Studies involving microarray analysis of mRNA must conform to the "Minimum Information about a Microarray Experiment" (MIAME) guidelines including deposition of the raw data in an appropriate repository (the Access Code must be state din the Methods). All microarray experiments must be accompanied by appropriate validation by quantitative RTPCR.

Results

These should be given as concisely as possible, using figures or tables as appropriate. Data must not be duplicated in tables and figures.

Discussion

While it is generally desirable that the presentation of the results and the discussion of their significance should be presented separately, there may be occasions when combining these sections may be beneficial. Authors may also find that additional or alternative sections such as 'conclusions' may be useful. The discussion should be **no longer than five manuscript pages**.

5

Acknowledgments

Here you may acknowledge individuals or organizations that provided advice and/or support (non-financial). Formal financial support and funding should be listed in the following section.

Financial Support

Please provide details of the sources of financial support for all authors, including grant numbers. For example, "This work was supported by the Medical research Council (grant number XXXXXXX)". Multiple grant numbers should be separated by a comma and space, and where research was funded by more than one agency the different agencies should be separated by a semi-colon, with "and" before the final funder. Grants held by different authors should be identified as belonging to individual authors by the authors' initials. For example, "This work was supported by the Wellcome Trust (A.B., grant numbers XXXX, YYYY), (C.D., grant number ZZZZ); the Natural Environment Research Council (E.F., grant number FFFF); and the National Institutes of Health (A.B., grant number GGGG), (E.F., grant number HHHH)".

This disclosure is particularly important in the case of research that is supported by industry. Support from industry not only includes direct financial support for the study but also support in kind such as provision of medications, equipment, kits or reagents without charge or at reduced cost and provision of services such as statistical analysis; all such support must be disclosed here and if no such support was received this must be stated.

Where no specific funding has been provided for research, please provide the following statement: "This research received no specific grant from any funding agency, commercial or not-for-profit sectors."

In addition to the source of financial support, please state whether the funder contributed to the study design, conduct of the study, analysis of samples or data, interpretation of findings or the preparation of the manuscript. If the funder made no such contribution, please provide the following statement: "[Funder's name] had no role in the design, analysis or writing of this article."

Conflict of Interest

Please provide details of all known financial, professional and personal relationships with the potential to bias the work. Where no known conflicts of interest exist, please include the following statement: "None."

For more information on what constitutes a conflict of interest, please see the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) guidelines.

Authorship

Please provide a very brief description of the contribution of each author to the research. Their roles in formulating the research question(s), designing the study, carrying it out, analysing the data and writing the article should be made plain.

References

Number references consecutively in the order in which they first appear in the text using superscript Arabic numerals in parentheses, e.g. 'The conceptual difficulty of this approach has recently been highlighted(1,2–4)'. If a reference is cited more than once the same number should be used each time. References cited only in tables and figure legends should be numbered in sequence from the last number used in the text and in the order of mention of the individual tables and figures in the text.

Names and initials of authors of unpublished work should be given in the text as 'unpublished results' and not included in the References.

At the end of the paper, on a page(s) separate from the text, references should be listed in numerical order using the Vancouver system. When an article has more than three authors only the names of the first three authors should be given followed by '*et al.*' The issue number should be omitted if there is continuous pagination throughout a volume. Titles of journals should appear in their abbreviated form using the NCBI LinkOut page. References to books and monographs should include the town of publication and the number of the edition to which reference is made. References to material available on websites should include the full Internet address, and the date of the version cited.

Examples of correct forms of references are given below.

Journal articles

1. Setchell KD, Faughnan MS, Avades T *et al*. (2003) Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of 13C-labeled tracers in premenopausal women. *Am J Clin Nutr* **77**, 411–419.

6

2. Barker DJ, Winter PD, Osmond C *et al*. (1989) Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* **ii**, 577–580.

3. Forchielli ML & Walker WA (2005) The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr* **93**, Suppl. 1, S41–S48.
4. Skurk T, Herder C, Kraft I *et al*. (2004) Production and release of macrophage migration inhibitory factor from human adipocytes. *Endocrinology* (Epublication ahead of print version).
Books and monographs
5. Bradbury J (2002) Dietary intervention in edentulous patients. PhD Thesis, University of Newcastle.
6. Ailhaud G & Hauner H (2004) Development of white adipose tissue. In *Handbook of Obesity. Etiology and Pathophysiology*, 2nd ed., pp. 481–514 [GA Bray and C Bouchard, editors]. New York: Marcel Dekker.
7. Bruinsma J (editor) (2003) *World Agriculture towards 2015/2030: An FAO Perspective*. London: Earthscan Publications.
8. World Health Organization (2003) *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases*. *Joint WHO/FAO Expert Consultation*. *WHO Technical Report Series* no. 916. Geneva: WHO.
9. Keiding L (1997) *Astma, Allergi og Anden Overfølsomhed i Danmark – Og Udviklingen 1987–199I* (*Asthma, Allergy and Other Hypersensitivities in Denmark, 1987–1991*). Copenhagen, Denmark: Dansk Institut for Klinisk Epidemiologi.
Sources from the internet
10. Nationmaster (2005) HIV AIDS – Adult prevalence rate. http://www.nationmaster.com/graph-T/hea_hiv_aid_adu_pre_rat (accessed June 2013).

Figures

Figures should be supplied as separate electronic files. Figure legends should be grouped in a section at the end of the manuscript text. Each figure should be clearly marked with its number and separate panels within figures should be clearly marked (a), (b), (c) etc. so that they are easily identifiable when the article and figure files are merged for review. Each figure, with its legend, should be comprehensible without reference to the text and should include definitions of abbreviations. The nature of the information displayed in the figures (e.g. mean (SEM)) and the statistical test used must be stated.

We recommend that only TIFF, EPS or PDF formats are used for electronic artwork. Other non-preferred but usable formats are JPG, PPT and GIF files and images created in Microsoft Word. Note that these non-preferred formats are generally NOT suitable for conversion to print reproduction. For further information about how to prepare your figures, including sizing and resolution requirements, please see our artwork guide.

In curves presenting experimental results the determined points should be clearly shown, the symbols used being, in order of preference, ○, ●, Δ, ▲, □, ■, ×, +. Curves and symbols should not extend beyond the experimental points. Scale-marks on the axes should be on the inner side of each axis and should extend beyond the last experimental point. Ensure that lines and symbols used in graphs and shading used in histograms are large enough to be easily identified when the figure size is reduced to fit the printed page. Statistically significant effects should be indicated with symbols or letters.

Colour figures will be published online free of charge, and there is a fee of £350 per figure for colour figures in the printed version. If you request colour figures in the printed version, you will be contacted by CCC-Rightslink who are acting on our behalf to collect colour charges. Please follow their instructions in order to avoid any delay in the publication of your article.

Images submitted with a manuscript should be minimally processed; some image processing is acceptable (and may be unavoidable), but the final image must accurately represent the original data. Grouping or cropping of images must be identified in the legend and indicated

by clear demarcation. Please refer to the Office of Research Integrity guidelines on image processing in scientific publication. Authors should provide sufficient detail of image-gathering procedures and process manipulation in the Methods sections to enable the accuracy of image presentation to be assessed. Authors should retain their original data, as Editors may request them for comparison during manuscript review.

Tables

Tables should be placed in the main manuscript file at the end of the document, not within the main text. Be sure that each table is cited in the text. Tables should carry headings describing their content and should be comprehensible without reference to the text. Tables should not be subdivided by ruled lines. 7

The dimensions of the values, e.g. mg/kg, should be given at the top of each column. Separate columns should be used for measures of variance (SD, SE etc.), the ± sign should not be used. The number of decimal places used should be standardized; for whole numbers 1.0, 2.0 etc. should be used. Shortened forms of the words weight (wt) height (ht) and experiment (Expt) may be used to save space in tables, but only Expt (when referring to a specified experiment, e.g. Expt 1) is acceptable in the heading.

Footnotes for table legends are given in the following order: (1) abbreviations, (2) superscript letters, (3) symbols. Abbreviations are given in the format: RS, resistant starch. Abbreviations in tables must be defined in footnotes in the order that they appear in the table (reading from left to right across the table, then down each column). Symbols for footnotes should be used in the sequence: *†‡§||¶, then ** etc. (omit * or †, or both, from the sequence if they are used to indicate levels of significance).

For indicating statistical significance, superscript letters or symbols may be used. Superscript letters are useful where comparisons are within a row or column and the level of significance is uniform, e.g. ‘a,b,cMean values within a column with unlike superscript letters were significantly different (P<0·05)’. Symbols are useful for indicating significant differences between rows or columns, especially where different levels of significance are found, e.g. ‘Mean values were significantly different from those of the control group: *P<0·05, **P<0·01, ***P<0·001’. The symbols used for P values in the tables must be consistent.

Supplementary material

Additional data (e.g. data sets, large tables) relevant to the paper can be submitted for publication online only, where they are made available via a link from the paper. The paper should stand alone without these data. Supplementary Material must be cited in a relevant place in the text of the paper.

Although Supplementary Material is peer reviewed, it is not checked, copyedited or typeset after acceptance and it is loaded onto the journal’s website exactly as supplied. You should check your Supplementary Material carefully to ensure that it adheres to journal styles. Corrections cannot be made to the Supplementary Material after acceptance of the manuscript. Please bear this in mind when deciding what content to include as Supplementary Material.

License to Publish form

Authors or their institutions retain copyright of papers published in BJN. The corresponding author should complete a License to Publish form on behalf of all authors, and upload this with the manuscript files **at the time of submission**. If the manuscript is not accepted, the form will be destroyed.

Accepted Manuscripts

PDF proofs are sent to authors in order that they make sure that the paper has been correctly set up in type. Only changes to errors induced by typesetting/copy-editing or typographical errors will be accepted.
Corrected proofs should be returned within 2 days by email to:
Emma Pearce
Production Editor
Cambridge University Press
Telephone: +44 1223 325032
Fax: +44 1223 325802
Email: bjnproduction@cambridge.org
If corrected proofs are not received from authors within 7 days the paper may be published as it stands.
A PDF file of the paper will be supplied free of charge to the corresponding author of each paper, and offprints may be ordered on the order form sent with the proofs.

CONTACT

Prospective authors may contact the Editorial Office directly on +44 (0) 1223 325977 (telephone) or bjn.edoffice@cambridge.org (email).
8

APPENDIX: MATHEMATICAL MODELLING, STATISTICS AND NOMENCLATURE

Mathematical modelling of nutritional processes

Papers in which mathematical modelling of nutritional processes forms the principal element will be considered for publication provided: (a) they are based on sound biological and mathematical principles; (b) they advance nutritional concepts or identify new avenues likely to lead to such advances; (c) assumptions used in their construction are fully described and supported by appropriate argument; (d) they are described in such a way that the nutritional purpose is clearly apparent; (e) the contribution of the model to the design of future experimentation is clearly defined.

Units

Results should be presented in metric units according to the International System of Units (see Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry, 3rd ed. (2007) Cambridge: RSC Publishing), and Metric Units, Conversion Factors and Nomenclature in Nutritional and Food Sciences (1972) London: The Royal Society – as reproduced in *Proceedings of the Nutrition Society* (1972) **31**, 239–247). SI units should be used throughout the paper. The author will be asked to convert any values that are given in any other form. The only exception is where there is a unique way of expressing a particular variable that is in widespread use. Energy values must be given in Joules (MJ or kJ) using the conversion factor 1 kcal = 4.184 kJ. If required by the author, the value in kcal can be given afterwards in parentheses. Temperature is given in degrees Celsius (ºC). Vitamins should be given as mg or μg, not as IU.
For substances of known molecular mass (Da) or relative molecular mass, e.g. glucose, urea, Ca, Na, Fe, K, P, values should be expressed as mol/l; for substances of indeterminate molecular mass (Da) or relative molecular mass, e.g. phospholipids, proteins, and for trace elements, e.g. Cu, Zn, then g/l should be used.
The 24 h clock should be used, e.g. 15.00 hours.
Units are: year, month, week, d, h, min, s, kg, g, mg, μg, litre, ml, μl, fl. To avoid misunderstandings, the word litre should be used in full, except in terms like g/l. Radioactivity should be given in becquerels (Bq or GBq) not in Ci. 1 MBq = 27·03 μCi (1Bq = 1 disintegration/s).

Statistical treatment of results

Data from individual replicates should not be given for large experiments, but may be given for small studies. The methods of statistical analysis used should be described, and references to statistical analysis packages included in the text, for example: Statistical Analysis Systems statistical software package version 6.11 (SAS Institute, Cary, NC, USA). The description should provide enough information for a statistician with access to the data to reproduce the results presented. Information such as analysis of variance tables should be given in the paper only if they are relevant to the discussion. A statement of the number of replicates, their average value and some appropriate measure of variability is usually sufficient. Authors must state whether their data follow a Gaussian distribution or not, and the choice of statistical tests must be consistent with the distribution of the data.

Justification for the sample size must be given. If the study is based on a power calculation, details of this should be provided including the desired effect size and power as well as the estimate of variability that was used.

Comparisons between means can be made by using either confidence intervals (CI) or significance tests. The most appropriate of such measures is usually the standard error of a difference between means (SED) or the standard errors of the means (SEM). The SEM represents the uncertainty associated with the estimation of a given mean and is not directly related to the SED or comparisons among means in mixed models as it is in fixed effects models. The SED estimates the uncertainty associated with the difference between two means; because it is used in various mean comparisons tests, SED can be implied within the tests *per se*. The standard deviation (SD) is more useful only when there is specific interest in the variability of individual values and no treatment means are being compared. The sample size (n per treatment) should also be stated in text or in the table. Standard analysis of variance assumes homogeneous variance. Unless there is heterogeneous variance, as tested by an appropriate statistic, or there is unequal n, a pooled SEM or SED simplifies tables and is preferred. The number of decimal places quoted should be sufficient but not excessive. If data transformations are being used, text should clearly state which variables have been transformed in which way and how that was decision was reached (e.g., tests for normality, diagnostic plots). 9

Authors should consider whether their study is rather of explorative (hypothesis-generating) or confirmative (hypothesis-testing) nature. This is particularly important when results from multiple tests are being presented, which can be the case when various treatments are being compared, multiple endpoints are considered, or different subgroups are being analysed. Such multiple testing issues occur often in exploratory studies, and authors should take care not to overstate findings in these situations. At least the number of significant results should be compared to the number of tests compared, where 1 in 20 findings would be expected by chance alone. Methods that control certain error rates (experiment-wise error rate, false discovery rate, etc…) such as post-hoc tests can be used in this context, but are not obligatory, as long as the exploratory nature of the results is made clear. In confirmative studies, pre-planned comparisons or primary endpoints should be stated upfront and analysed by appropriate tools such as contrast testing for pre-planned comparisons. Unnecessary multiple testing corrections with respect to secondary comparisons or endpoints should be avoided to not compromise the power of the study.

Measurements on the same experimental unit over time or in different sections of tissue generally are not independent. If the repeated measures are taken from the same animal or human subject, which are expected to be randomly chosen to represent a population, an appropriate mixed model should be fitted while investigating the best covariance of error

structures. All major statistical software packages offer a wide variety of structures; the one chosen should be stated.

If comparisons between means are made using CI, the format for presentation is, e.g. 'difference between means 0·73 (95 % CI 0·314, 1·36) g'. If significance tests are used, a statement that the difference between the means for two groups of values is (or is not) statistically significant should include the level of significance attained, preferably as an explicit *P* value (e.g. *P*=0·016 or *P*=0·32) rather than as a range (e.g. *P*<0·05 or *P*>0·05). It should be stated whether the significance levels quoted are one-sided or two-sided (when relevant). Where a multiple comparison procedure is used, a description or explicit reference should be given. Where appropriate, a superscript notation may be used in tables to denote levels of significance; similar superscripts should denote lack of a significant difference.

When the method of analysis is unusual, or if the experimental design is at all complex, further details (e.g., experimental plan, raw data, confirmation of assumptions, analysis of variance tables, etc.) should be included. Adequate detail should be provided for a subsequent reader to interpret and potentially repeat the approach used. For example, the statistical model should be provided or described in adequate detail, and all blocking factors and criteria should be provided. Regressions should provide appropriate estimates of parameter uncertainty (not necessarily provided by graphing software).

Chemical formulas

These should be written as far as possible on a single horizontal line. With inorganic substances, formulas may be used from first mention. With salts, it must be stated whether or not the anhydrous material is used, e.g. anhydrous CuSO4, or which of the different crystalline forms is meant, e.g. CuSO4.5H2O, CuSO4.H2O.

Descriptions of solutions, compositions and concentrations

Solutions of common acids, bases and salts should be defined in terms of molarity (M), e.g. 0.1 M-NaH2PO4. Compositions expressed as mass per unit mass (w/w) should have values expressed as ng, μg, mg or g per kg; similarly for concentrations expressed as mass per unit volume (w/v), the denominator being the litre. If concentrations or compositions are expressed as a percentage, the basis for the composition should be specified (e.g. % (w/w) or % (w/v) etc.). The common measurements used in nutritional studies, e.g. digestibility, biological value and net protein utilization, should be expressed as decimals rather than as percentages, so that amounts of available nutrients can be obtained from analytical results by direct multiplication. See *Metric Units, Conversion Factors and Nomenclature in Nutritional and Food Sciences*. London: The Royal Society, 1972 (para. 8).

Cell lines

The Journal expects authors to deposit cell lines (including microbial strains) used in any study to be published in publicly accessible culture collections, for example, the European Collection of Cell Cultures (ECACC) or the American Type Culture Collection (ATCC) and to refer to the collection and line or strain numbers in the text (e.g. ATCC 53103). Since the authenticity of subcultures of culture collection specimens that are distributed by individuals cannot be ensured, authors should indicate laboratory line or strain designations and donor sources as well as original culture collection identification numbers.

10

Gene nomenclature and symbols

The use of symbols and nomenclature recommended by the HUGO Gene Nomenclature Committee is encouraged. Information on human genes is also available from Entrez Gene, on mouse genes from the Mouse Genome Database and on rat genes from the Rat Genome Database.

Nomenclature of vitamins

Most of the names for vitamins and related compounds that are accepted by the Editors are those recommended by the IUNS Committee on Nomenclature. See *Nutrition Abstracts and Reviews* (1978) **48**A, 831–835.

The terms **vitamin A**, **vitamin C** and **vitamin D** may still be used where appropriate, for example in phrases such as 'vitamin A deficiency', 'vitamin D activity'.

The term **vitamin E** should be used as the descriptor for all tocol and tocotrienol derivatives exhibiting qualitatively the biological activity of α-tocopherol. The term **tocopherols** should be used as the generic descriptor for all methyl tocols. Thus, the term **tocopherol** is not synonymous with the term **vitamin E**.

The term **vitamin K** should be used as the generic descriptor for 2-methyl-1,4-naphthoquinone (menaphthone) and all derivatives exhibiting qualitatively the biological activity of phylloquinone (phytylmenaquinone).

The term **niacin** should be used as the generic descriptor for pyridine 3-carboxylic acid and derivatives exhibiting qualitatively the biological activity of nicotinamide.

The term **vitamin B6** should be used as the generic descriptor for all 2-methylpyridine derivatives exhibiting qualitatively the biological activity of pyridoxine.

Regarding **folate**, due to the wide range of C-substituted, unsubstituted, oxidized, reduced and mono- or polyglutamyl side-chain derivatives of pteroylmonoglutamic acid that exist in nature, it is not possible to provide a complete list. Authors are encouraged to use either the generic name or the correct scientific name(s) of the derivative(s), as appropriate for each circumstance.

The term **vitamin B12** should be used as the generic descriptor for all corrinoids exhibiting qualitatively the biological activity of cyanocobalamin. The term **corrinoids** should be used as the generic descriptor for all compounds containing the corrin nucleus and thus chemically related to cyanocobalamin. The term **corrinoid** is not synonymous with the term **vitamin B12**.

The terms **ascorbic acid** and **dehydroascorbic acid** will normally be taken as referring to the naturally-occurring L-forms. If the subject matter includes other optical isomers, authors are encouraged to include the L- or D- prefixes, as appropriate. The same is true for all those vitamins which can exist in both natural and alternative isomeric forms.

Weight units are acceptable for the amounts of vitamins in foods and diets. For concentrations in biological tissues, SI units should be used; however, the authors may, if they wish, also include other units, such as weights or international units, in parentheses. See *Metric Units, Conversion Factors and Nomenclature in Nutritional and Food Sciences* (1972) paras 8 and 14–20. London: The Royal Society.

Nomenclature of fatty acids and lipids

In the description of results obtained for the analysis of fatty acids by conventional GLC, the shorthand designation proposed by Farquhar JW, Insull W, Rosen P, Stoffel W & Ahrens EH (*Nutrition Reviews* (1959), **17**, Suppl.) for individual fatty acids should be used in the text, tables and figures. Thus, 18 : 1 should be used to represent a fatty acid with eighteen carbon atoms and one double bond; if the position and configuration of the double bond is unknown. The shorthand designation should also be used in the abstract. If the positions and configurations of the double bonds are known, and these are important to the discussion, then a fatty acid such as linoleic acid may be referred to as *cis*-9,*cis*-12-18 : 2 (positions of double bonds related to the carboxyl carbon atom 1). However, to illustrate the metabolic relationship between different unsaturated fatty acid families, it is sometimes more helpful to number the double bonds in relation to the terminal methyl carbon atom, *n*. The preferred nomenclature is

then: 18 : 3*n*-3 and 18 : 3*n*-6 for α-linolenic and γ-linolenic acids respectively; 18 : 2*n*-6 and 20 : 4*n*-6 for linoleic and arachidonic acids respectively and 18 : 1*n*-9 for oleic acid. Positional isomers such as α- and γ-linolenic acid should always be clearly distinguished. It is assumed that the double bonds are methylene-interrupted and are of the *cis*-configuration (see Holman RT in *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids* (1966) vol. 9, part 1, p. 3. Oxford: Pergamon Press). Groups of fatty acids that have a common chain length but vary in their double bond content or double bond position should be referred to, for example, as C20 fatty acids or C20 PUFA. The modern nomenclature for glycerol esters should be used, i.e. triacylglycerol, diacylglycerol, monoacylglycerol *not* triglyceride, diglyceride, monoglyceride. The form of fatty acids used in diets should be clearly stated, i.e. whether ethyl esters, natural or refined fats or oils. The composition of the fatty acids in the dietary fat and tissue fats should be stated clearly, expressed as mol/100 mol or g/100 g total fatty acids.
12

Nomenclature of micro-organisms

The correct name of the organism, conforming with international rules of nomenclature, should be used. If desired, synonyms may be added in parentheses when the name is first mentioned. Names of bacteria should conform to the current Bacteriological Code and the opinions issued by the International Committee on Systematic Bacteriology. Names of algae and fungi must conform to the current International Code of Botanical Nomenclature. Names of protozoa should conform to the current International Code of Zoological Nomenclature.

Nomenclature of plants

For plant species where a common name is used that may not be universally intelligible, the Latin name in italics should follow the first mention of the common name. The cultivar should be given where appropriate.

Other nomenclature, symbols and abbreviations

Authors should consult recent issues of BJN for guidance. The IUPAC rules on chemical nomenclature should be followed, and the recommendations of the Nomenclature Committee of IUBMB and the IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature and Nomenclature Commission of IUBMB in *Biochemical Nomenclature and Related Documents* (1992), 2nd ed., London: Portland Press (http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/bibliog/white.html). The symbols and abbreviations, other than units, are essentially those listed in *British Standard* 5775 (1979–1982), *Specifications for Quantities, Units and Symbols*, parts 0–13. Day should be abbreviated to d, for example 7 d, except for ‘each day’, ‘7th day’ and ‘day 1’.

Elements and simple chemicals (e.g. Fe and CO2) can be referred to by their chemical symbol (with the exception of arsenic and iodine, which should be written in full) or formula from the first mention in the text; the title, text and table headings, and figure legends can be taken as exceptions,. Well-known abbreviations for chemical substances may be used without explanation, thus: RNA for ribonucleic acid and DNA for deoxyribonucleic acid. Other substances that are mentioned frequently (five or more times) may also be abbreviated, the abbreviation being placed in parentheses at the first mention, thus: lipoprotein lipase (LPL), after that, LPL, and an alphabetical list of abbreviations used should be included. Only accepted abbreviations may be used in the title and text headings. If an author’s initials are mentioned in the text, they should be distinguished from other abbreviations by the use of stops, e.g. ‘one of us (P. J. H.)…’. For UK counties the official names given in the *Concise Oxford Dictionary* (1995) should be used and for states of the USA two-letter abbreviations should be used, e.g. MA (not Mass.) and IL (not Ill.). Terms such as ‘bioavailability’ or ‘available’ may be used providing that the use of the term is adequately defined.

Spectrophotometric terms and symbols are those proposed in *IUPAC Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units* (1979) London: Butterworths. The attention of authors is particularly drawn to the following symbols: m (milli, 10□3), μ (micro, 10□6), n (nano, 10□9) and p (pico, 10□12). Note also that ml (millilitre) should be used instead of cc, μm (micrometre) instead of μ (micron) and μg (microgram) instead of γ.
Numerals should be used with units, for example, 10 g, 7 d, 4 years (except when beginning a sentence, thus: 'Four years ago...'); otherwise, words (except when 100 or more), thus: one man, ten ewes, ninety-nine flasks, three times (but with decimal, 2.5 times), 100 patients, 120 cows, 136 samples.

ANEXO F – Carta de aprovação –Revista Brasileira de Nutrição

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS
SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO
NÚCLEO DE EDITORAÇÃO SBI

REVISTA DE NUTRIÇÃO/BRAZILIAN JOURNAL OF NUTRITION
INDEXADA EM BASES DE DADOS INTERNACIONAIS:
CHEMICAL ABSTRACT - CAB ABSTRACT - EMBASE
FSTA – POPLINE – POP LINE – NISC - SCOPUS – WEB SCIENCE
BASES NACIONAIS: LILACS – SciELO – PERI-
ODICOS (CAPES) (BI-NACIONAL
ISSN 1415-5273

Campinas, 5 de agosto de 2014 CA/NE/RN nº 1071/2014

Prezada Profa. Natália Gomes de Morais

Vimos por meio desta cumprimentá-la e, na oportunidade informar a V.Sa. que o seu trabalho intitulado "*Long-term effects of a neonatal malnutrition on the microbicide response, production of cytokines and survival of macrophages infected by Staphylococcus aureus sensitive/resistant to methicillin*" (protocolo 1219) foi aprovado para publicação na Revista de Nutrição e será publicado no volume 27(5) de 2014.

Em fase final de editoração/normalização entraremos em contato.

Informamos que o artigo receberá o número do DOI, somente na versão html, quando estiver disponibilizado no SciELO (http://www.scielo.br/rn). Lembrando que o autor deverá entrar no site e verificar o número após 30 dias do recebimento do exemplar impresso.

Dada a relevância do tema, gostaríamos de sugerir que fizesse a tradução do seu artigo para o inglês. A publicação do referido artigo na língua inglesa permitirá maior visibilidade do conhecimento científico e, consequentemente possibilitará maior fator de impacto da RN e do autor.

Em caso de concordância, informamos que a Revista de Nutrição dispõe de tradutor especializado - sr. James Allen e-mail <jamesallen20@gmail.com>.

Esclarecemos que o custo de tradução deverá ser realizada pelos próprios autores.

Salientamos que a partir de 2013, ainda estaremos recebendo artigos em português, mas a publicação será no idioma inglês, conforme a nova política editorial da Revista de Nutrição.

Confirme, por favor, o seu interesse na tradução do seu artigo no prazo máximo de 3 dias, a partir da emissão desta mensagem.

É com satisfação que compartilhamos com você a notícia de que a *Revista de Nutrição* obteve um Fator de Impacto® (FI) de 0,345 no JCR® 2011.

Valho-me do ensejo para agradecer sua valiosa colaboração, esperando contar com futuras contribuições.

Cordialmente

Profa. Dra. Vânia Aparecida Leandro Merhi
Profa. Dra. Silvana Srebernich
Revista de Nutrição
Editoras

ANEXO G - Instruções para autores –Revista Brasileira de Nutrição

Revista de Nutrição é um periódico especializado que publica artigos que contribuem para o estudo da Nutrição em suas diversas subáreas e interfaces. Com periodicidade bimestral, está aberta a contribuições da comunidade científica nacional e internacional.
Os manuscritos podem ser rejeitados sem comentários detalhados após análise inicial, por pelo menos dois editores da **Revista de Nutrição**, se os artigos forem considerados inadequados ou de prioridade científica insuficiente para publicação na Revista.

Categoria dos artigos

A Revista aceita artigos inéditos em português, espanhol ou inglês, com título, resumo e termos de indexação no idioma original e em inglês, nas seguintes categorias:
Original: contribuições destinadas à divulgação de resultados de pesquisas inéditas, tendo em vista a relevância do tema, o alcance e o conhecimento gerado para a área da pesquisa (limite máximo de 5 mil palavras).
Especial: artigos a convite sobre temas atuais (limite máximo de 6 mil palavras).
Revisão (a convite): síntese de conhecimentos disponíveis sobre determinado tema, mediante análise e interpretação de bibliografia pertinente, de modo a conter uma análise crítica e comparativa dos trabalhos na área, que discuta os limites e alcances metodológicos, permitindo indicar perspectivas de continuidade de estudos naquela linha de pesquisa (limite máximo de 6 mil palavras). Serão publicados até dois trabalhos por fascículo.
Comunicação: relato de informações sobre temas relevantes, apoiado em pesquisas recentes, cujo mote seja subsidiar o trabalho de profissionais que atuam na área, servindo de apresentação ou atualização sobre o tema (limite máximo de 4 mil palavras).
Nota Científica: dados inéditos parciais de uma pesquisa em andamento (limite máximo de 4 mil palavras).
Ensaio: trabalhos que possam trazer reflexão e discussão de assunto que gere questionamentos e hipóteses para futuras pesquisas (limite máximo de 5 mil palavras).
Seção Temática (a convite): seção destinada à publicação de 2 a 3 artigos coordenados entre si, de diferentes autores, e versando sobre tema de interesse atual (máximo de 10 mil palavras no total).
Categoria e a área temática do artigo: Os autores devem indicar a categoria do artigo e a área temática, a saber: alimentação e ciências sociais, avaliação nutricional, bioquímica nutricional, dietética, educação nutricional, epidemiologia e

estatística, micronutrientes, nutrição clínica, nutrição experimental, nutrição e geriatria, nutrição materno-infantil, nutrição em produção de refeições, políticas de alimentação e nutrição e saúde coletiva.

Pesquisas envolvendo seres vivos

Resultados de pesquisas relacionadas a seres humanos e animais devem ser acompanhados de cópia de aprovação do parecer de um Comitê de Ética em pesquisa.

Registros de Ensaios Clínicos

Artigos com resultados de pesquisas clínicas devem apresentar um número de identificação em um dos Registros de Ensaios Clínicos validados pelos critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do *Intemational Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE), cujos endereços estão disponíveis no site do ICMJE. O número de identificação deverá ser registrado ao final do resumo.

Os autores devem indicar três possíveis revisores para o manuscrito. Opcionalmente, podem indicar três revisores para os quais não gostaria que seu trabalho fosse enviado.

Procedimentos editoriais

Autoria

A indicação dos nomes dos autores logo abaixo do título do artigo é limitada a 6. O crédito de autoria deverá ser baseado em contribuições substanciais, tais como concepção e desenho, ou análise e interpretação dos dados. Não se justifica a inclusão de nomes de autores cuja contribuição não se enquadre nos critérios acima.

Os manuscritos devem conter, na página de identificação, explicitamente, a contribuição de cada um dos autores.

Processo de julgamento dos manuscritos

Todos os outros manuscritos só iniciarão o processo de tramitação se estiverem de acordo com as Instruções aos Autores. Caso contrário, **serão devolvidos para adequação às normas**, inclusão de carta ou de outros documentos eventualmente necessários.

Recomenda-se fortemente que o(s) autor(es) busque(m) assessoria lingüística profissional (revisores e/ou tradutores certificados em língua portuguesa e inglesa) antes de submeter(em) originais que possam conter incorreções e/ou inadequações morfológicas, sintáticas, idiomáticas ou de estilo. Devem ainda evitar o uso da primeira pessoa "meu estudo...", ou da primeira pessoa do plural "percebemos....", pois em texto científico o discurso deve ser impessoal, sem juízo de valor e na

terceira pessoa do singular.
Originais identificados com incorreções e/ou inadequações morfológicas ou sintáticas **serão devolvidos antes mesmo de serem submetidos à avaliação** quanto ao mérito do trabalho e à conveniência de sua publicação.
Pré-análise: a avaliação é feita pelos Editores Científicos com base na originalidade, pertinência, qualidade acadêmica e relevância do manuscrito para a nutrição.
Aprovados nesta fase, os manuscritos serão encaminhados aos revisores ad hoc selecionados pelos editores. Cada manuscrito será enviado para dois revisores de reconhecida competência na temática abordada, podendo um deles ser escolhido a partir da indicação dos autores. Em caso de desacordo, o original será enviado para uma terceira avaliação.
Todo processo de avaliação dos manuscritos terminará na segunda e última versão.
O processo de avaliação por pares é o sistema de *blind review*, procedimento sigiloso quanto à identidade tanto dos autores quanto dos revisores. Por isso os autores deverão empregar todos os meios possíveis para evitar a identificação de autoria do manuscrito.
Os pareceres dos revisores comportam três possibilidades: a) aprovação; b) recomendação de nova análise; c) recusa. Em quaisquer desses casos, o autor será comunicado.
Os pareceres são analisados pelos editores associados, que propõem ao Editor Científico a aprovação ou não do manuscrito.
Manuscritos recusados, mas com possibilidade de reformulação, poderão retornar como novo trabalho, iniciando outro processo de julgamento.

Conflito de interesse

No caso da identificação de conflito de interesse da parte dos revisores, o Comitê Editorial encaminhará o manuscrito a outro revisor *ad hoc*.
Manuscritos aceitos: manuscritos aceitos poderão retornar aos autores para aprovação de eventuais alterações, no processo de editoração e normalização, de acordo com o estilo da Revista.
Provas: serão enviadas provas tipográficas aos autores para a correção de erros de impressão. As provas devem retornar ao Núcleo de Editoração na data estipulada. Outras mudanças no manuscrito original não serão aceitas nesta fase.

Preparo do manuscrito

Submissão de trabalhos

Serão aceitos trabalhos acompanhados de carta assinada por todos os autores, com descrição do tipo de trabalho e da área temática,

declaração de que o trabalho está sendo submetido apenas à Revista de Nutrição e de concordância com a cessão de direitos autorais e uma carta sobre a principal contribuição do estudo para a área.
Caso haja utilização de figuras ou tabelas publicadas em outras fontes, deve-se anexar documento que ateste a permissão para seu uso.
Enviar os manuscritos via site <http://www.scielo.br/rn>, preparados em espaço entrelinhas 1,5, com fonte Arial 11. O arquivo deverá ser gravado em editor de texto similar ou superior à versão 97-2003 do Word (Windows).
É fundamental que o escopo do artigo **não contenha qualquer forma de identificação da autoria**, o que inclui referência a trabalhos anteriores do(s) autor(es), da instituição de origem, por exemplo.
O texto deverá contemplar o número de palavras de acordo com a categoria do artigo. As folhas deverão ter numeração personalizada desde a folha de rosto (que deverá apresentar o número 1). O papel deverá ser de tamanho A4, com formatação de margens superior e inferior (no mínimo 2,5cm), esquerda e direita (no mínimo 3cm).
Os artigos devem ter, aproximadamente, 30 referências, exceto no caso de artigos de revisão, que podem apresentar em torno de 50. Sempre que uma referência possuir o número de *Digital Object Identifier* (DOI), este deve ser informado.
Versão reformulada: a versão reformulada deverá ser encaminhada via <http://www.scielo.br/rn>. **O(s) autor(es) deverá(ão) enviar apenas a última versão do trabalho.**
O texto do artigo deverá empregar fonte colorida (cor azul) ou sublinhar, para todas as alterações, juntamente com uma carta ao editor, reiterando o interesse em publicar nesta Revista e informando quais alterações foram processadas no manuscrito, na versão reformulada. Se houver discordância quanto às recomendações dos revisores, o(s) autor(es) deverão apresentar os argumentos que justificam sua posição. O título e o código do manuscrito deverão ser especificados.
Página de rosto deve conter
a) título completo - deve ser conciso, evitando excesso de palavras, como "avaliação do....", "considerações acerca de..." 'estudo exploratório....";
b) *short title* com até 40 caracteres (incluindo espaços), em português (ou espanhol) e inglês;
c) nome de todos os autores por extenso, indicando a filiação institucional de cada um. Será aceita uma única titulação e filiação por autor. O(s) autor(es) deverá(ão), portanto, escolher, entre suas titulações e filiações institucionais, aquela que julgar(em) a mais importante.
d) Todos os dados da titulação e da filiação deverão ser apresentados por extenso, sem siglas.
e) Indicação dos endereços completos de todas as universidades às quais estão vinculados os autores;
f) Indicação de endereço para correspondência com o autor para a tramitação do original, incluindo fax, telefone e endereço eletrônico;
Observação: esta deverá ser a única parte do texto com a identificação

dos autores.

Resumo: todos os artigos submetidos em português ou espanhol deverão ter resumo no idioma original e em inglês, com um mínimo de 150 palavras e máximo de 250 palavras.

Os artigos submetidos em inglês deverão vir acompanhados de resumo em português, além do *abstract* em inglês.

Para os artigos originais, os resumos devem ser estruturados destacando objetivos, métodos básicos adotados, informação sobre o local, população e amostragem da pesquisa, resultados e conclusões mais relevantes, considerando os objetivos do trabalho, e indicando formas de continuidade do estudo.

Para as demais categorias, o formato dos resumos deve ser o narrativo, mas com as mesmas informações.

O texto não deve conter citações e abreviaturas. Destacar no mínimo três e no máximo seis termos de indexação, utilizando os descritores em Ciência da Saúde - DeCS - da Bireme <http://decs.bvs.br>.

Texto: com exceção dos manuscritos apresentados como Revisão, Comunicação, Nota Científica e Ensaio, os trabalhos deverão seguir a estrutura formal para trabalhos científicos:

Introdução: deve conter revisão da literatura atualizada e pertinente ao tema, adequada à apresentação do problema, e que destaque sua relevância. Não deve ser extensa, a não ser em manuscritos submetidos como Artigo de Revisão.

Métodos: deve conter descrição clara e sucinta do método empregado, acompanhada da correspondente citação bibliográfica, incluindo: procedimentos adotados; universo e amostra; instrumentos de medida e, se aplicável, método de validação; tratamento estatístico.

Em relação à análise estatística, os autores devem demonstrar que os procedimentos utilizados foram não somente apropriados para testar as hipóteses do estudo, mas também corretamente interpretados. Os níveis de significância estatística (ex. $p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$) devem ser mencionados.

Informar que a pesquisa foi aprovada por Comitê de Ética credenciado junto ao Conselho Nacional de Saúde e fornecer o número do processo.

Ao relatar experimentos com animais, indicar se as diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais - ou se qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório - foram seguidas.

Resultados: sempre que possível, os resultados devem ser apresentados em tabelas ou figuras, elaboradas de forma a serem auto-explicativas e com análise estatística. Evitar repetir dados no texto.

Tabelas, quadros e figuras devem ser limitados a cinco no conjunto e numerados consecutiva e independentemente com algarismos arábicos, de acordo com a ordem de menção dos dados, e devem vir em folhas individuais e separadas, com indicação de sua localização no texto. **É imprescindível a informação do local e ano do estudo.** A cada um se deve atribuir um título breve. Os quadros e tabelas terão as bordas laterais abertas.

O(s) autor(es) se responsabiliza(m) pela qualidadedas figuras (desenhos, ilustrações, tabelas, quadros e gráficos), que deverão ser elaboradas em tamanhos de uma ou duas colunas (7 e 15cm, respectivamente); **não é permitido o formato paisagem**. Figuras digitalizadas deverão ter extensão jpeg e resolução mínima de 400 dpi.

Gráficos e desenhos deverão ser gerados em programas de desenho vetorial (*Microsoft Excel, CorelDraw, Adobe Illustrator* etc.), acompanhados de seus parâmetros quantitativos, em forma de tabela e com nome de todas as variáveis.

A publicação de imagens coloridas, após avaliação da viabilidade técnica de sua reprodução, será custeada pelo(s) autor(es). Em caso de manifestação de interesse por parte do(s) autor(es), a Revista de Nutrição providenciará um orçamento dos custos envolvidos, que poderão variar de acordo com o número de imagens, sua distribuição em páginas diferentes e a publicação concomitante de material em cores por parte de outro(s) autor(es).

Uma vez apresentado ao(s) autor(es) o orçamento dos custos correspondentes ao material de seu interesse, este(s) deverá(ão) efetuar depósito bancário. As informações para o depósito serão fornecidas oportunamente.

Discussão: deve explorar, adequada e objetivamente, os resultados, discutidos à luz de outras observações já registradas na literatura.

Conclusão: apresentar as conclusões relevantes, considerando os objetivos do trabalho, e indicar formas de continuidade do estudo. **Não serão aceitas citações bibliográficas nesta seção.**

Agradecimentos: podem ser registrados agradecimentos, em parágrafo não superior a três linhas, dirigidos a instituições ou indivíduos que prestaram efetiva colaboração para o trabalho.

Anexos: deverão ser incluídos apenas quando imprescindíveis à compreensão do texto. Caberá aos editores julgar a necessidade de sua publicação.

Abreviaturas e siglas: deverão ser utilizadas de forma padronizada, restringindo-se apenas àquelas usadas convencionalmente ou sancionadas pelo uso, acompanhadas do significado, por extenso, quando da primeira citação no texto. Não devem ser usadas no título e no resumo.

Referências de acordo com o estilo *Vancouver*

Referências: devem ser numeradas consecutivamente, seguindo a ordem em que foram mencionadas pela primeira vez no texto, conforme o estilo *Vancouver*.

Nas referências com dois até o limite de seis autores, citam-se todos os autores; acima de seis autores, citam-se os seis primeiros autores, seguido de *et al*.

As abreviaturas dos títulos dos periódicos citados deverão estar de acordo com o *Index Medicus*.

Não serão aceitas citações/referências de **monografias** de conclusão de curso de graduação, **de trabalhos** de Congressos, Simpósios, *Workshops*, Encontros, entre outros, e de **textos não publicados** (aulas,

entre outros).
Se um trabalho não publicado, de autoria de um dos autores do manuscrito, for citado (ou seja, um artigo *in press*), será necessário incluir a carta de aceitação da revista que publicará o referido artigo.
Se dados não publicados obtidos por outros pesquisadores forem citados pelo manuscrito, será necessário incluir uma carta de autorização, do uso dos mesmos por seus autores.
Citações bibliográficas no texto: deverão ser expostas em ordem numérica, em algarismos arábicos, meia linha acima e após a citação, e devem constar da lista de referências. Se forem dois autores, citam-se ambos ligados pelo "&"; se forem mais de dois, cita-se o primeiro autor, seguido da expressão *et al*.
A exatidão e a adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo são de responsabilidade do autor. Todos os autores cujos trabalhos forem citados no texto deverão ser listados na seção de Referências.
Exemplos
Artigo com mais de seis autores
Oliveira JS, Lira PIC, Veras ICL, Maia SR, Lemos MCC, Andrade SLL, *et al*. Estado nutricional e insegurança alimentar de adolescentes e adultos em duas localidades de baixo índice de desenvolvimento humano. Rev Nutr. 2009; 22(4): 453-66. doi: 10.1590/S1415-52732009000400002.
Artigo com um autor
Burlandy L. A construção da política de segurança alimentar e nutricional no Brasil: estratégias e desafios para a promoção da intersetorialidade no âmbito federal de governo. Ciênc Saúde Coletiva. 2009; 14(3):851-60. doi: 10.1590/S1413-81232009000300020.
Artigo em suporte eletrônico
Sichieri R, Moura EC. Análise multinível das variações no índice de massa corporal entre adultos, Brasil, 2006. Rev Saúde Pública [Internet]. 2009 [acesso 2009 dez 18]; 43(Suppl.2):90-7. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php? script=sci_arttext&pid=S0034-89102009000900012&lng=pt&nrm=iso>. doi: 10.1590/S0034-89102009000900012.
Livro
Alberts B, Lewis J, Raff MC. Biologia molecular da célula. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.
Livro em suporte eletrônico
Brasil. Alimentação saudável para pessoa idosa: um manual para o profissional da saúde [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2009 [acesso 2010 jan 13]. Disponível em: <http://200.18.252.57/services/e-books/alimentacao_saudavel_idosa_profissionais_saude.pdf>.
Capítulos de livros
Aciolly E. Banco de leite. In: Aciolly E. Nutrição em obstetrícia e pediatria. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009. Unidade 4.
Capítulo de livro em suporte eletrônico
Emergency contraceptive pills (ECPs). In: World Health Organization.

Medical eligibility criteria for contraceptive use [Internet]. 4th ed. Geneva: WHO; 2009 [cited 2010 Jan 14]. Available from: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563888_eng.pdf>.

Dissertações e teses

Duran ACFL. Qualidade da dieta de adultos vivendo com HIV/AIDS e seus fatores associados [mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.

Texto em formato eletrônico

Sociedade Brasileira de Nutrição Parental e Enteral [Internet]. Assuntos de interesse do farmacêutico atuante na terapia nutricional. 2008/2009 [acesso 2010 jan 14]. Disponível em: <http://www.sbnpe.com.br/ctdpg.php?pg=13&ct=A>.

Programa de computador

Software de avaliação nutricional. DietWin Professional [programa de computador]. Versão 2008. Porto Alegre: Brubins Comércio de Alimentos e Supergelados; 2008. Para outros exemplos recomendamos consultar as normas do Committee of Medical Journals Editors (Grupo Vancouver) <http://www.icmje.org>.

Para outros exemplos recomendamos consultar as normas do Committee of Medical Journals Editors (Grupo Vancouver) <http://www.icmje.org>.

Lista de checagem

- Declaração de responsabilidade e transferência de direitos autorais assinada por cada autor.
- Verificar se o texto, incluindo resumos, tabelas e referências, está reproduzido com letras fonte Arial, corpo 11 e entrelinhas 1,5 e com formatação de margens superior e inferior (no mínimo 2,5cm), esquerda e direita (no mínimo 3cm).
- Indicação da categoria e área temática do artigo.
- Verificar se estão completas as informações de legendas das figuras e tabelas.
- Preparar página de rosto com as informações solicitadas.
- Incluir o nome de agências financiadoras e o número do processo.
- Indicar se o artigo é baseado em tese/dissertação, colocando o título, o nome da instituição, o ano de defesa.
- Incluir título do manuscrito, em português e em inglês.
- Incluir título abreviado (short title), com 40 caracteres, para fins de legenda em todas as páginas.
- Incluir resumos estruturados para trabalhos submetidos na categoria de originais e narrativos para manuscritos submetidos nas demais categorias, com um mínimo de 150 palavras e máximo de 250 palavras nos dois idiomas, português e inglês, ou em espanhol, nos casos em que se aplique, com termos de indexação
- Verificar se as referências estão normalizadas segundo estilo

Vancouver, ordenadas na ordem em que foram mencionadas pela primeira vez no texto, e se todas estão citadas no texto.
- Incluir permissão de editores para reprodução de figuras ou tabelas publicadas.
- Cópia do parecer do Comitê de Ética em pesquisa.

Documentos

Declaração de responsabilidade e transferência de direitos autorais

Cada autor deve ler e assinar os documentos (1) Declaração de Responsabilidade e (2) Transferência de Direitos Autorais, nos quais constarão:

- Título do manuscrito:
- Nome por extenso dos autores (na mesma ordem em que aparecem no manuscrito).
- Autor responsável pelas negociações:

1. Declaração de responsabilidade: todas as pessoas relacionadas como autoras devem assinar declarações de responsabilidade nos termos abaixo:

- "Certifico que participei da concepção do trabalho para tornar pública minha responsabilidade pelo seu conteúdo, que não omiti quaisquer ligações ou acordos de financiamento entre os autores e companhias que possam ter interesse na publicação deste artigo";
- "Certifico que o manuscrito é original e que o trabalho, em parte ou na íntegra, ou qualquer outro trabalho com conteúdo substancialmente similar, de minha autoria, não foi enviado a outra Revista e não o será, enquanto sua publicação estiver sendo considerada pela Revista de Nutrição, quer seja no formato impresso ou no eletrônico".

2. Transferência de Direitos Autorais: "Declaro que, em caso de aceitação do artigo, a Revista de Nutrição passa a ter os direitos autorais a ele referentes, que se tornarão propriedade exclusiva da Revista, vedado a qualquer reprodução, total ou parcial, em qualquer outra parte ou meio de divulgação, impressa ou eletrônica, sem que a prévia e necessária autorização seja solicitada e, se obtida, farei constar o competente agradecimento à Revista".

Assinatura do(s) autores(s) Data __ / __ / __

Justificativa do artigo

Destaco que a principal contribuição do estudo para a área em que se insere é a seguinte: _____

(Escreva um parágrafo justificando porque a revista deve publicar o seu artigo, destacando a sua relevância científica, a sua contribuição para as discussões na área em que se insere, o(s) ponto(s) que caracteriza(m) a sua originalidade e o conseqüente potencial de ser citado)

Dada a competência na área do estudo, indico o nome dos seguintes pesquisadores (três) que podem atuar como revisores do manuscrito. Declaro igualmente não haver qualquer conflito de interesses para esta indicação.