

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

*Faculdade de Ciências Farmacêuticas*

*Câmpus de Araraquara*

**Efeito da concentração subinibitória de amoxicilina e ciprofloxacino sobre  
alguns fatores relacionados à virulência de**

*Staphylococcus aureus*

*Elisabeth Eyko Aoki*

Araraquara

2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

*Faculdade de Ciências Farmacêuticas*

*Câmpus de Araraquara*

**Efeito da concentração subinibitória de amoxicilina e ciprofloxacino sobre  
alguns fatores relacionados à virulência de**

*Staphylococcus aureus*

***Elisabeth Eyko Aoki***

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, como pré-requisito para obtenção do título de doutor em Biociência e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração Microbiologia.

Orientadora: ***Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi***

Araraquara

2008

### Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**A638e** Aoki, Elisabeth Eyko  
Efeito da concentração subinibitória de amoxicilina e ciprofloxacino sobre alguns fatores relacionados à virulência de *Staphylococcus aureus* / Elisabeth Eyko Aoki. – Araraquara, 2008.  
93 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociência e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Maria Stella Gonçalves Raddi

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Fator de virulência. 3. Amoxicilina. 4. Ciprofloxacino. 5. Concentração suninibitória. I. Raddi, Maria Stella Gonçalves, orient. II. Título.

**CDD: 616.969**

**CAPES: 40300005**

**ELISABETH EYKO AOKI**

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO SUBINIBITÓRIA DE AMOXICILINA E  
CIPROFLOXACINO SOBRE ALGUNS FATORES RELACIONADOS À  
VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus***

---

A Comissão examinadora dos trabalhos de Defesa de Tese de  
Doutorado, em sessão pública realizada em 17/11/2008, considerou a candidata:

**( X ) Aprovada**

**( ) Reprovada**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARIA STELLA GONCALVES RADDI  
(Orientador e Presidente)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. LOURDES BOTELHO GARCIA  
(Membro Titular)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. HERIDA REGINA NUNES SALGADO  
(Membro Titular)**

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. FERNANDO DE SÁ DEL FIOLE  
(Membro Titular)**

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. LUIZ MARCOS DA FONSECA  
(Membro Titular)**

*Dedico à minha mãe Takiko;  
ao meu pai Martin;  
à minha irmã Márcia;  
aos meus irmãos Fernando e Carlos;  
à minha sobrinha Fernanda e  
ao meu cunhado Marcelo*

## *Agradecimentos especiais*

*“Sabemos que todas as coisas concorrem para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito”.*

*(Romanos 8,28)*

### *À Deus*

*Pois muitas coisas aconteceram durante o período em que trabalhava nesta tese e, se hoje consegui terminá-la foi, sem dúvidas devido, ao grande amor de Deus por mim. Nestes anos eu pude experimentar Deus agindo nas pequenas coisas, pude ver que Ele nunca me abandonou, pude sentir Sua presença cuidando de cada etapa, pude evidenciar a Sua força para superar os obstáculos, pois desde o início este sonho foi consagrado a Ele. Por isso hoje eu quero louvar e agradecer a Deus pela realização deste sonho.*

*“...como Medianeira materna, Maria apresenta a Cristo os nossos desejos, as nossas súplicas e transmite-nos os dons divinos, intercedendo continuamente em nosso favor.”*

*(Papa João Paulo II)*

### *À Nossa Senhora*

*Pois durante esses anos de doutoramento muitas vezes supliquei a intercessão de Nossa Senhora, e sei que muitas graças eu obtive através dela. Por isso hoje eu quero agradecer à mãe de Jesus e minha mãe.*

### *À minha mãe*

*Pois sempre foi para mim sinônimo de força e garra, sendo exemplo, nunca desanimando nem mesmo diante da doença, ensinando-me sempre a seguir em frente, à traçar os melhores caminhos com os melhores valores, sempre instruindo-me que o verdadeiro porto seguro é Deus e a família. Sempre com uma palavra de ânimo e carinho nos momentos de angústia, de cansaço, de vontade de desistir, e revelando-me através de gestos delicados e simples os passos a serem seguidos para chegar até aqui. Mulher batalhadora que nunca mediu esforços para educar seus filhos, sempre nos ensinando a lutar por nossos ideais e sempre rezando por nós. Muito obrigada por tudo. Te amo muito! Que Deus te abençoe!*

### *Ao meu pai*

*Pois sempre me ensinou que é preciso trabalhar e lutar para alcançar os meus ideais. Exemplo de honestidade. Muito obrigada por tudo. Te amo muito! Que Deus te abençoe!*

### *À minha irmã Márcia*

*Pois sempre me incentivou e me ajudou nos momentos de desânimo, com quem sempre pude, posso e poderei contar quando precisar ultrapassar barreiras. Tenho certeza que não poderia ter conquistado este sonho se você não estivesse ao meu lado. Muito obrigada por tudo. Te amo muito! Que Deus te abençoe!*

### *Ao meu irmão Fernando*

*Pois sempre pude contar com o seu apoio, por ser diferente de mim, sempre foi o meu ponto de equilíbrio quando a minha emoção falava mais alto, pois sempre pude, posso e poderei contar com a sua razão e seu apoio. Esta conquista não teria sido possível se você não fizesse parte da minha vida. Muito obrigada por tudo. Te amo muito! Que Deus te abençoe!*

### *Ao meu irmão Carlos*

*Pois sempre que precisei pude contar, sempre foi meu amiguinho, sempre se preocupou comigo e sempre rezou por mim quando precisei. Muito obrigada por tudo. Te amo muito! Que Deus te abençoe!*

### *À minha sobrinha e afilhada Fernanda*

*Pois sempre encheu de alegria a minha vida nos momentos difíceis, pois com seu jeitinho inocente de criança, mesmo não sabendo o verdadeiro significado dessas palavras, sempre me dizia: “fica caaaalllma madinha, já vai dar tudo certo”, e já era suficiente para me encher de ânimo e forças para terminar este trabalho, pois sempre pensava que assim que terminasse poderia brincar mais tempo com ela. Muito obrigada minha pequena. Te amo muito! Que Deus te abençoe!*

### *Ao meu cunhado Marcelo*

*Pois de uma forma indireta sempre pude contar, pois faz parte da minha família. Muito obrigada. Que Deus te abençoe!*

### *À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Stella Gonçalves Raddi,*

*Minha orientadora, que aceitou o desafio de me orientar nesta tese. Obrigada pelo conhecimento científico que muito contribuiu para o meu crescimento profissional. Mas quero agradecer principalmente pela sua paciência me fazendo compreender melhor a vida e pelo seu compromisso de me mostrar os caminhos para o universo da pesquisa. E por todo carinho, amizade, dedicação, confiança e, por todo tempo destinado a me auxiliar em todas as minhas dificuldades. Que Deus te abençoe!*



## **Agradecimentos**

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> **Luiz Marcos da Fonseca**, obrigada pela colaboração para execução deste trabalho, por aceitar compor a banca examinadora deste trabalho e pelas excelentes sugestões oferecidas.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Lourdes Botelho Garcia**, obrigada por aceitar compor a banca examinadora deste trabalho e pelas excelentes sugestões oferecidas. Quero também agradecer pelo conhecimento científico, pois desde a minha graduação, especialização e mestrado você tem contribuído para o meu crescimento profissional. Obrigada por todo carinho, amizade, por me ouvir nos momentos de alegrias e de dificuldades, pelos conselhos, dedicação, confiança e por me incentivar a lutar para conseguir um objetivo.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Hérida Regina Nunes Salgado** e ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> **Fernando de Sá Del Fiol**, obrigada por aceitar compor a banca examinadora deste trabalho e pelas excelentes sugestões oferecidas.

Às minhas amigas **Margareth Naomi Hashimoto, Jocimara Costa Mazzola, Vânia Cibele Mingueti Câmara, Joyce Karla Tsuzuki e Sami Yokoo**, obrigada por todo carinho, apoio, conselhos e ombro amigo, pois sempre pude contar em todos os momentos, sejam de dor ou de alegria.

Ao meu amigo **Luiz Gustavo S. Monnazzi**, obrigada por ser meu amigo, pelo seu carinho, apoio e pelos momentos de descontração. Pois mesmo quando não tínhamos tempo para conversar, sabia que sempre poderia contar com sua amizade.

À minha amiga **Gabriela Maria Pavan Arruda de Camargo**, obrigada pela sua amizade, carinho e pelos momentos de descontração.

Ao **Ary**, obrigada pelo seu carinho, por ser uma pessoa especial na minha vida. Pois apesar de tudo, você foi muito importante, pois muitas vezes foi capaz de trazer mais alegria para os meus dias, principalmente quando estava desanimada e cansada.

Ao pessoal do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Regional de Maringá, principalmente: **Talma, Vânia, Angelita, Crispim, Solange, Cecília, Nathalie,**

**Mirian Zarpelon, Mara, Milton, Valdeci, Mirian Andó, Gisele, Cris, Érika e Paulo** obrigada pela amizade, pelo incentivo e pela ajuda, pois sem o auxílio de vocês nos plantões este sonho não teria se concretizado.

À minha amiga **Silvia de Souza Dantas**, obrigada pela amizade e orações.

À minha amiga **Cibele Bonacorsi**, obrigada pela ajuda, ensinamentos e, principalmente, pelos momentos de descontração, pelas horas que passamos estudando na salinha 38, pela amizade e companhia, pelas duas viagens que fizemos. Pois você foi fundamental para conclusão deste trabalho, não somente no sentido prático, mas principalmente no sentido emocional, pois estava sempre presente nos meus momentos de desânimo, de tristeza e de alegrias. Pois realmente você é uma amiga que Deus me presenteou.

À minha amiga **Mariana Santoro**, obrigada pela amizade, por me ajudar na parte técnica e com os materiais quando não tinha tempo de organizar.

Aos meus amigos **Maria do Carmo Doria Martins e Antonio Francisco Martins Neto**, obrigada principalmente pela amizade, pelos momentos de descontração, pelo apoio, pelo carinho, pelos almoços e jantares que vocês me ofereceram, pelas duas viagens que fizemos (viagens abençoadas por Nossa Senhora), por me agüentar nos momentos de desabafo. Obrigada D’Carmo pela ajuda na parte técnica do meu trabalho e pelo almoço do dia da defesa, que você me ajudou a organizar e que preparou com tanto carinho e dedicação.

Ao **Rodrigo Kitagawa**, obrigada por me ensinar, me ajudar na parte técnica deste trabalho e pela amizade. À **Rita** obrigada pela amizade e carinho.

À **Nancy**, obrigada pela ajuda nos experimentos com células.

À **Micheli Sassa e Tete**, obrigada pela amizade, carinho e por me auxiliar na parte prática deste trabalho..

Aos **amigos do grupo Raio de Luz**, obrigada pela amizade e pelas orações.

À **Natália (menininha)**, Aline e **Dani**, obrigada pela amizade.

Ao **Marcos** (funcionário da Bioquímica) e a **Marisa** (funcionária da Imunologia) obrigada pela ajuda na parte técnica deste trabalho.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação, **Sonia, Laura e Cláudia**, e da Biblioteca, **Ana Cristina , Irani e Rita**, da FCF (UNESP - Araraquara), obrigada pela dedicação, carinho, atenção e paciência.

À todos que de alguma forma contribuíram para que este sonho se tornasse realidade: Muito obrigada.

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

### LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE TABELAS

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
<b>3.1.</b>	Microrganismo .....	25
<b>3.2.</b>	Antimicrobianos .....	25
<b>3.3.</b>	Animais .....	25
<b>3.4.</b>	Linhagem celular .....	26
<b>3.5.</b>	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	26
<b>3.6.</b>	Avaliação do efeito da concentração subinibitória de amoxicilina e ciprofloxacino .....	27
<b>3.6.1.</b>	No crescimento de <i>S. aureus</i> .....	27
<b>3.6.2.</b>	Na atividade hemolítica de <i>S. aureus</i> .....	27
<b>3.6.3.</b>	Na indução de citolisinas de <i>S. aureus</i> .....	28
<b>3.6.4.</b>	Na fagocitose de <i>S. aureus</i> .....	29
<b>3.6.4.1.</b>	Indução de exsudato celular para obtenção de PMNs de rato .....	29
<b>3.6.4.2.</b>	Separação e quantificação de PMNs por gradiente de densidade .....	29
<b>3.6.4.3.</b>	Avaliação da viabilidade dos PMNs durante o tempo do ensaio .....	30
<b>3.6.4.4.</b>	Preparo da suspensão bacteriana .....	30

3.6.4.5.	Ensaio quimiluminescente .....	31
3.6.4.6.	Ensaio de adesão/fagocitose em lâmina por microscopia óptica .....	32
3.6.5.	Na geração de estresse oxidativo .....	32
3.7.	Análise estatística .....	33
4.	<b>RESULTADOS</b> .....	34
4.1.	Concentração inibitória mínima (CIM) .....	34
4.2.	Efeito da concentração subinibitória de amoxicilina e ciprofloxacino .....	35
4.2.1.	No crescimento de <i>S. aureus</i> .....	35
4.2.2.	Na atividade hemolítica de <i>S. aureus</i> .....	36
4.2.3.	Na indução de citolisinas de <i>S. aureus</i> .....	37
4.2.4.	Na fagocitose de <i>S. aureus</i> .....	39
4.2.4.1.	Ensaio quimiluminescente .....	39
4.2.4.2.	Ensaio de adesão/fagocitose em lâmina .....	45
4.2.5.	Na geração de estresse oxidativo .....	46
5.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	48
6.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	60
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	61
8.	<b>APÊNDICE</b> .....	77

## RESUMO

O efeito de amoxicilina e ciprofloxacino, agentes antimicrobianos com diferentes mecanismos de ação, sobre alguns fatores relacionados à sua virulência em *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi comparado. Efeito pós-antimicrobiano, atividade hemolítica para hemácias de carneiro, atividade de citolisinas extracelulares para células McCoy, susceptibilidade à fagocitose dependente e não dependente de opsonização, por neutrófilos de *Rattus albinus norvegicus*, foram avaliados em bactérias crescidas na presença de concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$  CIM) do antimicrobiano e a capacidade de induzir estresse oxidativo foi determinada diretamente sobre as células bacterianas através da detecção da produção de ânion superóxido. Amoxicilina e ciprofloxacino demonstraram efeito sobre o crescimento de *S. aureus* estatisticamente significativo em relação ao controle, sendo maior para amoxicilina. A atividade hemolítica foi diminuída na presença de amoxicilina e ambos antimicrobianos induziram aumento na atividade de citolisinas extracelulares. A técnica de quimiluminescência dependente de luminol, utilizada para avaliar susceptibilidade à fagocitose através do *burst* oxidativo de polimorfonucleares neutrófilos, demonstrou que amoxicilina influenciou positivamente a fagocitose dependente de opsoninas e ciprofloxacino estimulou a fagocitose não opsonizada. Visto o *burst* oxidativo ser um método indireto para a demonstração de fagocitose, a confirmação de células bacterianas fagocitadas/aderidas foi realizada através da observação de esfregaços corados em microscopia ótica comum (1000 x). Apesar de ambos antimicrobianos induzirem aumento de ânion superóxido intracelular, detectado em ensaios de redução de *nitroblue tetrazolium (NBT)*, o ciprofloxacino induziu maior quantidade que a amoxicilina. A demonstração de que diferentes antimicrobianos possam atuar sobre diferentes aspectos relacionados ao microrganismo e seus fatores de

virulência, bem como na resposta do hospedeiro, sugere transformações conceituais nos critérios de escolha dos antimicrobianos para situações clínicas específicas.

**Palavras-chaves:** *Staphylococcus aureus*; concentração subinibitória; amoxicilina, ciprofloxacino; fatores de virulência.

## ABSTRACT

Amoxycillin and ciprofloxacin are antimicrobials with dissimilar mechanisms of action against bacteria. This is a comparative study of how each of these agents affects some of the factors related to the virulence of the pathogenic strain of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The post-antibiotic effect, hemolytic activity against sheep erythrocytes, cytolysin activity against McCoy cells and susceptibility to opsonin-dependent and independent phagocytosis by neutrophils from *Rattus albinus norvegicus* were assessed in bacteria grown in a subinhibitory concentration ( $\frac{1}{2}$  MIC) of each agent. Induction of oxidative stress was observed directly by detecting superoxide production in response to the bacteria. Both the antimicrobials exerted effect on the growth of *S. aureus*, which was significantly different from the growth of controls, though amoxycillin had the stronger effect. Hemolytic activity was diminished in the presence of amoxycillin, but both agents induced an increase in the activity of secreted cytolysins. By employing luminol-dependent chemiluminescence to assess the susceptibility of the bacteria to phagocytosis by detecting the respiratory burst in polymorphonuclear neutrophils, it was shown that amoxycillin had a positive effect on opsonin-dependent phagocytosis, while ciprofloxacin stimulated non-opsonized phagocytosis. Since detection of the respiratory burst is an indirect demonstration of phagocytosis, direct observation of stained slides under the light microscope at  $1000 \times$  magnification was used to confirm the presence of bacteria ingested by and adhering to neutrophils. While both agents induced a rise in the intracellular level of superoxide, assayed by nitroblue tetrazolium reduction, ciprofloxacin produced the stronger response. The demonstration that distinct antimicrobials can act on a microorganism and its virulence factors, as well as on the host



response, in distinct ways, may contribute to new approaches to choosing the best agents for specific clinical profiles.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*; subinhibitory concentration; amoxicillin; ciprofloxacin; virulence factors.

## LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES

$\mu\text{g}$	-	Micrograma
$\mu\text{L}$	-	Microlitro
$\Delta\text{QL}$	-	Varição de Quimiluminescência
$\Delta\text{QL}_{\text{Cinética}}$	-	Varição de Quimiluminescência (Cinética)
$\Delta\text{QL}_{\text{Máxima}}$	-	Varição de Quimiluminescência (Intensidade máxima)
<i>agr</i>		<i>accessory gene regulator</i>
ANOVA	-	Análise de variância
ATCC	-	American Type Culture Collection
BHI	-	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão cérebro e coração)
CBM	-	Concentração bactericida mínima
CIM	-	Concentração inibitória mínima
$\text{Cl}^-$	-	Cloreto
CifA	-	Fator de aglutinação A
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
Efb	-	Proteína ligante de fibrinogênio
ERO	-	Espécie reativa de oxigênio
FIOCRUZ	-	Fundação Oswaldo Cruz
FnBP	-	Proteína ligante de fibronectina
g	-	Grama
x g	-	Força da gravidade
$\text{HO}\cdot$	-	Radical hidroxil
HOCl	-	Ácido hipocloroso

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	Peróxido de hidrogênio
ICE	-	Integral da cinética de emissão
IME	-	Intensidade máxima de emissão
INCQS	-	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LTA	-	Ácido lipoteicóico
mg	-	Miligrama
mL	-	Mililitro
M	-	Molar
MPO	-	Mieloperoxidade
MSCRAMM		<i>Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
NADPH	-	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCCLS	-	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
nm	-	Nanometro
NBT	-	<i>Nitroblue tetrazolim</i>
NOS	-	Oxido nítrico sintase
°C	-	Grau Celsius
O <sub>2</sub>	-	Oxigênio molecular
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-	Ânion superóxido
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	-	Oxigênio singleto
PBS	-	Solução salina tamponada com fosfato
PBSD	-	Solução salina tamponada com fosfato Dulbecco
PBP	-	Proteína fixadora de penicilina
PMN	-	Polimorfonuclear neutrófilo
QL	-	Quimiluminescência
s	-	Segundo

<i>sae</i>	- <i>S. aureus exoprotein expression</i>
SAK	- Estafiloquinase
SCIN	- Proteína estafilocócica inibidora de complemento
SDO	- Superóxido dismutase
Sub-CIM	- Concentração subinibitória mínima
TSST 1	Toxina da síndrome do choque tóxico
UDO	- Unidade de densidade óptica
UFC	- Unidade formadora de colônia

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura química: (a) amoxicilina (A: Anel tiazolidínico; B: Anel beta-lactâmico; R: Cadeia lateral); (b) ciprofloxacino .....	18
<b>Figura 2</b> – <i>Staphylococcus aureus</i> (A: proteínas de superfície e secretadas; B e C cortes transversais da parede celular).....	19
<b>Figura 3</b> – Geração de espécies reativas do oxigênio durante o <i>burst</i> respiratório .....	22
<b>Figura 4</b> – Efeito dose-resposta de diferentes concentrações de amoxicilina e ciprofloxacino na inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> .....	34
<b>Figura 5</b> – Efeito da concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$ CIM) de amoxicilina e ciprofloxacino no crescimento de <i>S. aureus</i> .....	35
<b>Figura 6</b> – Relação dose-efeito na viabilidade de células McCoy do sobrenadante de cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> crescidos na presença da concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$ CIM) de amoxicilina .....	37
<b>Figura 7</b> – Relação dose-efeito na viabilidade de células McCoy do sobrenadante de cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> crescidos na presença da concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$ CIM) de ciprofloxacino.....	38
<b>Figura 8</b> – Quimiluminescência (QL) dos sistemas: PMNs/luminol/zymosan (controle de emissão de luz); PMNs/luminol/ <i>S. aureus</i> (controle); PMNs/luminol/ <i>S. aureus</i> tratado com amoxicilina (teste); PMNs/luminol/PBS (linha de base). Cinéticas representativas de, no mínimo, 3 experimentos independentes. Estímulos opsonizados .....	39

**Figura 9** – Quimiluminescência (QL) dos sistemas: PMNs/luminol/*zymosan* (controle de emissão de luz); PMNs/luminol/*S. aureus* (controle); PMNs/luminol/*S. aureus* tratado com amoxicilina (teste); PMNs/luminol/PBS (linha de base). Cinéticas representativas de, no mínimo, 3 experimentos independentes. Estímulos não opsonizados ..... 40

**Figura 10** – Quimiluminescência (QL) dos sistemas: PMNs/luminol/*zymosan* (controle de emissão de luz); PMNs/luminol/*S. aureus* (controle); PMNs/luminol/*S. aureus* tratado com ciprofloxacino (teste); PMNs/luminol/PBS (linha de base). Cinéticas representativas de, no mínimo, 3 experimentos independentes. Estímulos opsonizados ..... 42

**Figura 11** – Quimiluminescência (QL) dos sistemas: PMNs/luminol/*zymosan* (controle de emissão de luz); PMNs/luminol/*S. aureus* (controle); PMNs/luminol/*S. aureus* tratado com ciprofloxacino (teste); PMNs/luminol/PBS (linha de base). Cinéticas representativas de, no mínimo, 3 experimentos independentes. Estímulos não opsonizados ..... 43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Atividade hemolítica para hemácias de carneiro do sobrenadante de culturas de <i>S. aureus</i> na presença de concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$ CIM) de amoxicilina e ciprofloxacino .....	36
<b>Tabela 2</b> – Variação da quimiluminescência ( $\Delta QL$ ) para integral da cinética de emissão (ICE) do sistema PMN/luminol/ <i>S. aureus</i> na ausência e presença de concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$ CIM) de amoxicilina .....	41
<b>Tabela 3</b> – Variação da quimiluminescência ( $\Delta QL$ ) para intensidade máxima de emissão (IME) do sistema PMN/luminol/ <i>S. aureus</i> na ausência e presença de concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$ CIM) de amoxicilina .....	41
<b>Tabela 4</b> – Variação da quimiluminescência ( $\Delta QL$ ) para integral da cinética de emissão (ICE) do sistema PMN/luminol/ <i>S. aureus</i> na ausência e presença de concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$ CIM) de ciprofloxacino .....	44
<b>Tabela 5</b> – Variação da quimiluminescência ( $\Delta QL$ ) para intensidade máxima de emissão (IME) do sistema PMN/luminol/ <i>S. aureus</i> na ausência e presença de concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$ CIM) de ciprofloxacino .....	44
<b>Tabela 6</b> – Porcentagem de neutrófilos fagocitantes e média de células bacterianas, opsonizadas e não opsonizadas, aderidas/fagocitadas por PMN cultivadas na presença de concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$ CIM) de amoxicilina .....	45

<b>Tabela 7</b> – Porcentagem de neutrófilos fagocitantes e média de células bacterianas, opsonizadas e não opsonizadas, aderidas/fagocitadas por PMN cultivadas na presença de concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$ CIM) ciprofloxacino .....	46
<b>Tabela 8</b> – Relação ânion superóxido intra e extracelular induzida por concentração subinibitória de amoxicilina e ciprofloxacino ( $\frac{1}{2}$ CIM), determinadas pela técnica de <i>NBT</i> , em <i>S. aureus</i> .....	47
<b>Tabela 9</b> – Médias de absorvância da cultura teste e controle utilizadas na construção da Figura 5 para a determinação do efeito pós-antimicrobiano da concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$ CIM) de amoxicilina e de ciprofloxacino no crescimento de <i>S. aureus</i> .....	91
<b>Tabela 10</b> – Efeito do sobrenadante de cultura de <i>S. aureus</i> crescidos na presença da concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$ CIM) de amoxicilina na viabilidade de células McCoy, através da técnica de vermelho neutro .....	92
<b>Tabela 11</b> – Efeito do sobrenadante de cultura de <i>S. aureus</i> crescidos na presença da concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$ CIM) de ciprofloxacino na viabilidade de células McCoy, através da técnica de vermelho neutro .....	92



## 1. INTRODUÇÃO

A eficácia de um antimicrobiano para uma bactéria específica foi, até a poucos anos, avaliada através da determinação *in vitro* da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), todavia essas concentrações não representam as variações dos níveis do antimicrobiano no decorrer do esquema terapêutico (JACOBS, 2007). Na antibioticoterapia intermitente, as curvas farmacocinéticas demonstram flutuações nas concentrações sangüíneas, podendo resultar em níveis subterapêuticos prolongados (DAL SASSO et al., 2003).

A literatura relata que agentes antimicrobianos, quando em concentração ou tempo insuficiente para causar morte ou inibição total do crescimento, causam modificações nas propriedades bacterianas que podem refletir em alterações de componentes somáticos e produtos extracelulares (HOWARD et al., 1993; WU et al., 1995). Concentrações subinibitórias (sub-CIMs) de antimicrobianos são capazes de alterar a morfologia e taxa de crescimento do microrganismo, expressão, produção e/ou liberação de enzimas e toxinas, bem como outros fatores envolvidos na virulência bacteriana (BRAGA, et al., 2000; BERNARDO et al., 2004). Tais alterações podem afetar diretamente as interações entre bactérias e hospedeiro, principalmente no que diz respeito aos fenômenos de adesão e fagocitose (WINRAM et al., 1998; GEMMEL; FORD, 2002; DAL SASSO et al., 2003).

A eficácia clínica de um antimicrobiano é reconhecida não apenas pela atividade bactericida/bacteriostática e farmacocinética como também pela ação que esse fármaco exerce sobre fatores relacionados à virulência do microrganismo, especialmente quando em concentrações abaixo das consideradas terapêuticas (DAL SASSO et al., 2003). Alguns antimicrobianos podem modular adesinas específicas ou fatores de virulência secretados (LI et al., 2005).

Os antimicrobianos variam quanto à estrutura química e podem ser divididos em diferentes grupos com base no seu mecanismo de ação, destacando-se, como de grande importância para *Staphylococcus aureus*, o grupo dos beta-lactâmicos. Nesse grupo encontram-se os antimicrobianos representados pelas penicilinas naturais e sintéticas. A estrutura básica das penicilinas consiste em um anel tiazolidina ligado a um anel beta-lactâmico (núcleo básico do ácido 6-aminopenicilâmico), ao qual se fixa uma cadeia lateral (R) que dá origem a diversos derivados. A ligação de diferentes radicais ao grupo amino do ácido 6-aminopenicilâmico determina as propriedades farmacológicas essenciais das moléculas resultantes. A amoxicilina é uma penicilina semi-sintética cuja estrutura química é apresentada na Figura 1a (CHAMBERS, 2005a).

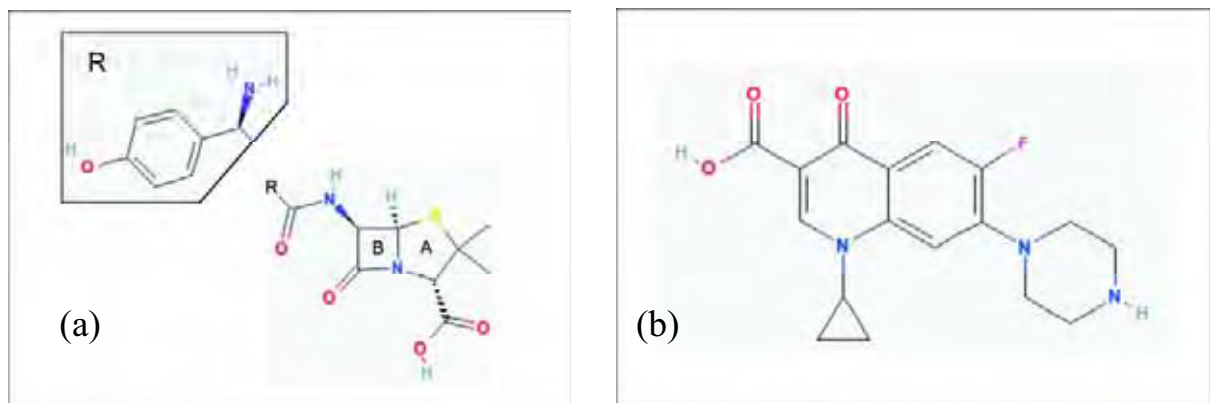
As penicilinas, de modo geral, interferem na síntese do peptidoglicano da parede celular, que é essencial para o crescimento bacteriano. O peptidoglicano é um componente heteropolimérico da parede, sendo formado por dois açúcares aminados (*N*-acetilglicosamina e ácido *N*-acetilmurâmico) e por um tetrapeptídeo sempre ligado ao ácido *N*-acetilmurâmico. As subunidades peptídicas de cadeias glicídicas adjacentes são unidas entre si por ligações diretas ou indiretas, que oferecem estabilidade mecânica rígida, em virtude da sua estrutura altamente cruzada. A composição das ligações cruzadas peptídicas é típica para cada espécie microbiana (ALTERTHUM, 2004; PETRI, 2006a).

A biossíntese do peptidoglicano, dividida em três etapas, envolve cerca de 30 enzimas, sendo que os antibióticos beta-lactâmicos, após se ligarem às proteínas fixadoras de penicilinas (PBP, com seis tipos possíveis), interferem na última etapa responsável pela reação de transpeptidação, que forma as ligações cruzadas das cadeias peptídicas acopladas ao arcabouço do peptidoglicano (ALTERTHUM, 2004; CHAMBERS, 2005a; PETRI, 2006a).

Atualmente, tem sido demonstrado que os antimicrobianos beta-lactâmicos inibem o crescimento bacteriano interferindo com a função de várias enzimas que participam da síntese

do peptidoglicano e não apenas com enzimas com função de transpeptidases. Indiretamente, esses antibióticos aumentam a atividade das autolisinas, denominadas de mureína hidrolases, responsáveis pela destruição do peptidoglicano (PETRI, 2006a).

Na década de 80, um grande grupo de novos fármacos antimicrobianos foi desenvolvido a partir do ácido nalidíxico. O ciprofloxacino (Figura 1b) é uma fluorquinolona que interfere com a síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA), inibindo a ação da topoisomerase II e da topoisomerase IV das bactérias (ALTERTHUM, 2004; CHAMBERS, 2005b; GOERKE et al., 2006; PETRI, 2006b). A inibição da topoisomerase II impede o relaxamento do DNA que é necessário para a transcrição e replicação. A inibição da topoisomerase IV interfere na separação do DNA cromossômico das células-filhas durante a divisão celular (CHAMBERS, 2005b; PETRI, 2006b).

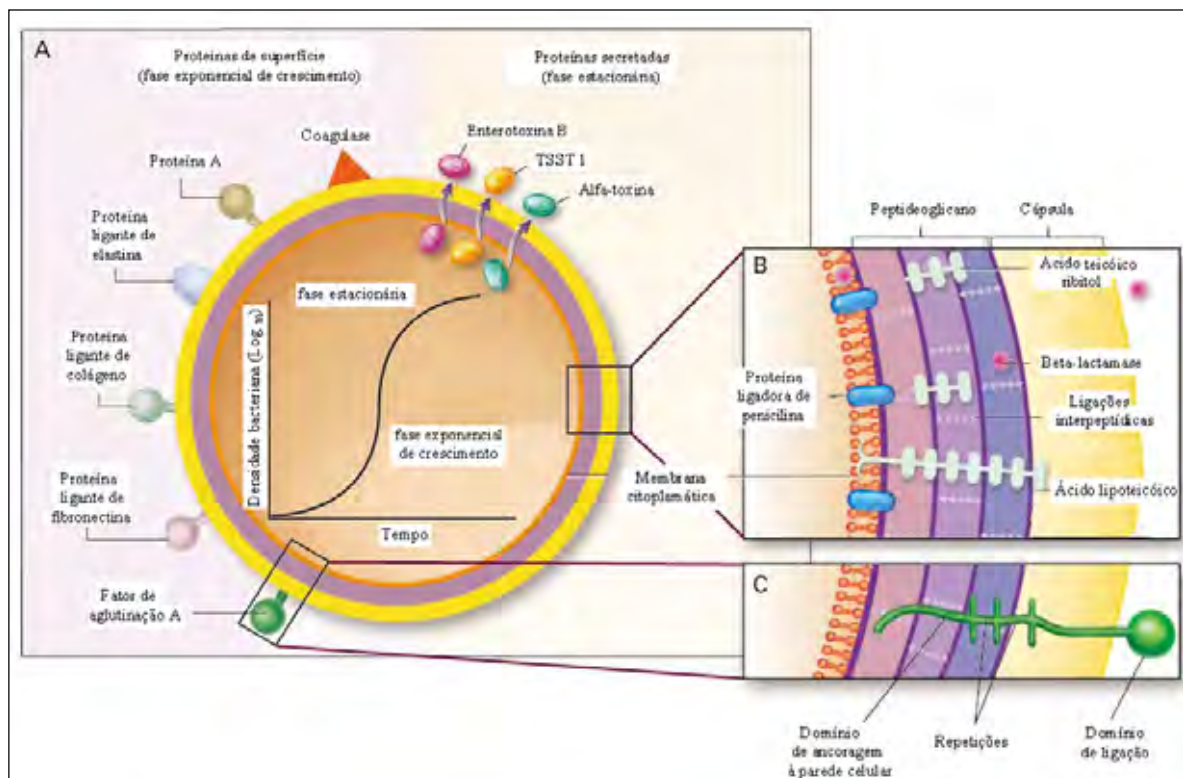


**Figura 1** – Estrutura química: (a) amoxicilina (A: Anel tiazolidínico; B: Anel beta-lactâmico; R: Cadeia lateral); (b) ciprofloxacino. Fonte:

(a) <[http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=33613&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=33613&loc=ec_rcs)>

(b) <[http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2764&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2764&loc=ec_rcs)>

*Staphylococcus aureus* continua sendo um dos microrganismos mais estudados por estar envolvido em uma grande diversidade de processos infecciosos e pela capacidade de desenvolver resistência antimicrobiana. Apesar de ser um microrganismo comensal da pele e mucosas, é um importante patógeno tanto de infecções comunitárias como hospitalares (LOTZ et al., 2006; KOSZCZOL et al., 2006). *S. aureus* possui estratégias complexas e efetivas para exercer sua patogenicidade, denominadas de fatores de virulência (moléculas de adesão, peptideoglicano, enzimas e toxinas extracelulares), as quais estão associadas a diferentes funções (Figura 2) (ARCHER et al., 1998; BRONNER et al., 2004; PALMQVIST et al., 2004).



**Figura 2** – *Staphylococcus aureus* (A: proteínas de superfície e secretadas; B e C cortes transversais da parede celular). Fonte: Adaptado de Lowy (1998)

Uma variedade de exotoxinas direcionadas ao metabolismo da célula hospedeira, sintetizada por *S. aureus*, tem potencial imediato de agressão. Dentre essas toxinas, a alfa-hemolisina é uma toxina formadora de poro com atividade citolítica, hemolítica e tóxica (DINGES et al., 2000). *S. aureus* também produz outras toxinas, incluindo diferentes hemolisinas (beta, gama e delta) e várias toxinas danificadoras de membrana que atuam em células-alvo rompendo as barreiras de permeabilidade celular através da formação de poros ou ação detergente (MENESTRINA et al., 2001; GEMMELL; FORD, 2002; VAN BELKUM et al., 2002). A expressão desses fatores é regulada por mecanismos específicos que variam com a fase e condições de crescimento bacteriano (BRONNER et al., 2004). A combinação de vários fatores de virulência torna o *S. aureus* um microrganismo capaz de evadir-se do sistema imune do hospedeiro (FOSTER, 2005).

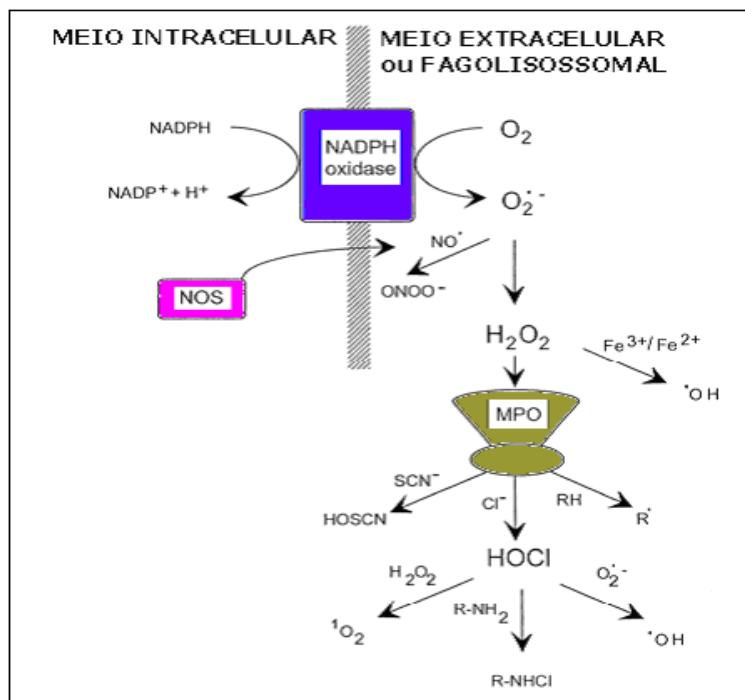
A fagocitose é uma estratégia defensiva importante na destruição de microrganismos invasores, sendo que a interação entre o microrganismo e células fagocitárias pode determinar a internalização e ativação de mecanismos adequados para a destruição da bactéria. O *S. aureus* apresenta componentes de superfícies, também considerados fatores de virulência, que conferem capacidade à bactéria de evadir-se desse sistema (ROOIJAKKERS et al., 2005c). Alguns antimicrobianos podem modular estruturas na superfície bacteriana envolvidas no processo fagocítico, contribuindo com a virulência (BRAGA et al., 2000; GEMMELL; FORD, 2002; LOTZ et al., 2006).

Em resposta a um estímulo antigênico observa-se o aparecimento de diferentes tipos celulares no tecido lesado. Em geral, o primeiro tipo celular a chegar ao local da infecção é o leucócito polimorfonuclear neutrófilo (PMN), seguido por fagócitos mononucleares (SERRANDER et al., 1999). Nesse local, essas células podem reconhecer patógenos opsonizados através de receptores de membrana para opsoninas ou por interações direta célula-célula. A ativação de células fagocíticas mediada por receptores ou lectinas dispara a

fagocitose por extensões fagocíticas (pseudópodes), mecanismo clássico de reconhecimento seqüencial do patógeno, as quais englobam o patógeno em um vacúolo (fagossomo). Concomitantemente duas funções fagocíticas são ativadas: liberação de enzimas e proteínas bactericidas dos lisossomos dos fagócitos, com a formação do fagolisossomo, e o disparo do *burst* oxidativo (LABRO, 2000).

O *burst* oxidativo ou respiratório de fagócitos envolve aumento no consumo de oxigênio não mitocondrial, acompanhado por ativação do *shunt* da hexose monofosfato (via do fosfogliconato), com a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (JANG et al., 1999). PMNs podem ser ativados por microrganismos opsonizados e não opsonizados, bem como por uma variedade de outros estímulos. Independente da natureza, o estímulo ativa a proteína quinase C, que fosforila a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) de membrana (PARIJ et al., 1998). O complexo NADPH oxidase catalisa a transferência de elétrons de NADPH (originado do *shunt* da hexose monofosfato) para oxigênio molecular ( $O_2$ ), gerando ânion superóxido ( $O_2^-$ ) no ambiente extracelular e dentro das vesículas fagocíticas (BABIOR, 2000). O  $O_2^-$  gerado serve como material inicial para a produção de uma vasta coleção de oxidantes reativos, incluindo halogênios oxidados, radicais livres como o radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (BABIOR, 1999) todos eficientes moléculas bactericidas. A maior parte do  $O_2^-$  é convertida em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e  $O_2$  por dismutação espontânea ou pela ação da superóxido dismutase (SOD) (JANG et al., 1999). A mieloperoxidase (MPO), localizada nos grânulos azurófilos dos PMNs, na presença do  $H_2O_2$ , catalisa a oxidação de cloreto ( $Cl^-$ ) para formar o ácido hipocloroso (HOCl), também um potente agente bactericida. O HOCl danifica proteínas, aminoácidos, lipídeos e ácidos nucléicos contribuindo para a morte bacteriana (BERGT et al., 2001). Desse modo, na fagocitose, uma série de espécies reativas com ação microbicida e citotóxica é produzida (HAMPTON et al., 1998; PASMANS et al., 2001). A Figura 3

esquematiza a geração de espécies reativas de oxigênio durante o *burst* respiratório de células fagocíticas.



**Figura 3** – Geração de espécies reativas de oxigênio durante o *burst* respiratório. Fonte: Adaptado de Hampton et al. (1998)

A produção de EROs é acompanhada da emissão de luz de baixa intensidade. A utilização de sondas quimiluminescentes, como o luminol, aumenta a sensibilidade da reação, pois são capazes de amplificar a quimiluminescência propiciando a detecção de baixos níveis de luz (STITES, 1994). O luminol monitora a produção de EROs no meio intra e extracelular, como o HOCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-•</sup> e <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. A luz emitida durante a quimiluminescência dependente de luminol é proporcional à atividade fagocítica e à produção de EROs (LINCOLN et al., 1995).

Durante o metabolismo respiratório, as bactérias também produzem EROs, entretanto quando a quantidade de radicais livres gerados é maior que a sua capacidade de detoxicação, as bactérias sofrem estresse oxidativo. O aumento de EROs foi observado na presença de

vários estímulos externos (agentes oxidantes, calor, radiação UV, acidez) (ALDSWORTH et al., 1999). O  $O_2^-$  é um potente oxidante de macromoléculas biológicas que pode interagir com vários componentes citoplasmáticos ou nucleares levando a célula à morte. O efeito bactericida de algumas substâncias antimicrobianas pode ser justificado como decorrente da capacidade de induzirem  $O_2^-$  (ALBESA et al., 2004).

Diversos agentes agressores, incluindo os antimicrobianos, podem aumentar a produção intracelular de EROs em bactérias como resposta ao estresse a que estão sendo submetidas, intensificando a ação antibacteriana (BARNES et al., 2005; BECERRA et al., 2006). Alterações no metabolismo oxidativo com aumento de EROs podem ter um importante efeito no mecanismo de ação de diferentes antimicrobianos (ALBESA et al., 2004).

Desde os anos 80, é reconhecido que concentrações subinibitórias de antimicrobianos acarretam modificações nas células bacterianas que podem intervir em fatores relacionados à virulência (GEMMELL et al., 1981; MILATOVIC et al., 1983; BRAGA; PIATTI, 1993; WORLITZSCH et al., 2001). Nessas condições, um determinado fator ou um antimicrobiano tem sido, na maioria das vezes, alvo isolado de estudos. Tendo em vista o complexo mecanismo de ação de antibióticos e/ou quimioterápicos e os novos conhecimentos envolvidos na regulação de fatores de virulência em *S. aureus*, a influência dos diversos antimicrobianos para uma mesma cepa deve ser considerada, visto a gama de opção terapêutica orientada apenas pela eficácia microbiológica. A demonstração da inibição de um ou mais fatores de virulência em *S. aureus* que possam potencializar a ação farmacológica do antimicrobiano, quando em concentração abaixo da considerada terapêutica, pode ser relevante na escolha desse agente, principalmente em pacientes imunodeprimidos.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Investigar a influência da concentração subinibitória de dois agentes antimicrobianos, com diferentes mecanismos de ação, sobre alguns fatores relacionados à virulência em uma cepa de *Staphylococcus aureus*.

### 2.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito da amoxicilina e ciprofloxacino na metade da concentração inibitória mínima ( $\frac{1}{2}$  CIM) sobre *S. aureus* subsp. *aureus*, cepa depositada como *Staphylococcus aureus* Rosenbach (ATCC nº 25923), quanto à capacidade de interferir no (a):

- a) Crescimento, utilizando técnica espectrofotométrica;
- b) Atividade hemolítica para hemácias de carneiro;
- c) Atividade de citolisinas, demonstrada em linhagem celular contínua (células McCoy) através da técnica de vermelho neutro;
- d) Fagocitose, opsonizada e não opsonizada, por neutrófilos polimorfonucleares de *Rattus albinus norvegicus*, evidenciada através de técnica quimiluminescente dependente de luminol;
- e) Geração de estresse oxidativo, demonstrada através do ensaio de redução de *nitroblue tetrazolium*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Microrganismo

*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (Apêndice 8.1.), cedido pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Manguinhos, RJ, Brasil.

#### 3.2. Antimicrobianos

Amoxicilina triidratada (Genix Indústria Farmacêutica Ltda, Lote: 05101107, Validade: 09/2008) e ciprofloxacino (DEG Importação de Produtos Químicos Ltda, Lote: CH0662DT06, Validade 01/03/2011) (32,0 mg) foram dissolvidos em água deionizada (1 mL). A partir dessa solução (32 mg/mL), foram preparadas as concentrações empregadas nos testes.

#### 3.3. Animais

*Rattus albinus norvegicus* (macho, 150-200g), fornecidos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, foram mantidos em biotério climatizado ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $55 \pm 5\%$  de umidade, 10-18 circulações/hora e ciclo claro/escuro de 12 h), com água e comida *ad libitum*. A execução dos ensaios utilizando animais recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara – UNESP (Parecer nº 02/2008 – Comitê de Ética em Pesquisa) (Apêndice 8.2.).

### **3.4. Linhagem celular**

Células McCoy B (ATCC 1696), adquiridas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil, foram mantidas em meio Eagle adicionado de 7,5% de soro fetal bovino. Células McCoy B são fibroblastos (linhagem contínua) originados de camundongos (Apêndice 8.3.).

### **3.5. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

A atividade de amoxicilina e ciprofloxacino sobre o crescimento bacteriano foi determinada através do método da microdiluição (NCCLS, 2003). O microrganismo foi, inicialmente, cultivado em placas contendo ágar sangue de carneiro a 5%, as quais foram incubadas por 24 horas a 37°C. Posteriormente, três colônias foram repicadas para caldo Müeller-Hinton o qual foi incubado a 37°C até obtenção de crescimento em fase exponencial, correspondente ao padrão 0,5 da escala de McFarland ( $UDO_{620}$  0,10). Orifícios de microplacas foram preenchidos com 100 µL de caldo Müeller-Hinton contendo concentrações de amoxicilina e de ciprofloxacino variando de 0,125 a 8 µg/mL e 100 µL da suspensão bacteriana. A inibição do crescimento induzida pelo antimicrobiano foi determinada através da diferença de absorvância em 620 nm (espectrofotômetro multicanal Spectra (Shell) & Rainbow (Shell) Readers da Tecan Austria Ges.mbH) obtida antes e após incubação da placa por 24 horas, a 37 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, por três vezes. Para o controle do crescimento, 100 µL da mesma suspensão bacteriana foram adicionados a 100 µL do caldo Müeller-Hinton. Os resultados foram utilizados para a determinação da concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$  CIM), que foi utilizada nos ensaios.

### **3.6. Avaliação do efeito da concentração subinibitória de amoxicilina e ciprofloxacino**

#### **3.6.1. No crescimento de *S. aureus***

O efeito da amoxicilina e ciprofloxacino sobre o crescimento bacteriano seguiu metodologia proposta por Tessier et al. (2000). O microrganismo foi, inicialmente, cultivado em placas contendo ágar sangue de carneiro a 5%, as quais foram incubadas por 24 horas a 37°C. Posteriormente, três colônias foram transferidas para BHI para obtenção de cultura em fase exponencial de crescimento, correspondente ao padrão 0,5 da escala de McFarland (UDO<sub>620</sub> 0,10). BHI contendo CIM de amoxicilina ou ciprofloxacino foi inoculado, volume a volume (v/v), com a suspensão bacteriana e incubado por 24 horas a 37°C. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 800 x g por 15 minutos, as células bacterianas lavadas por 3 vezes em solução salina tamponada (PBS, pH 7,2) e a suspensão bacteriana padronizada a UDO<sub>620</sub> 0,10. Duzentos e cinquenta microlitros (250 µL) de cada suspensão foram transferidos para orifícios de microplaca, a qual foi incubada a 37°C e leituras espectrofotométricas, em mesmo comprimento de onda, foram realizadas de 30 em 30 minutos, por um período de 12 horas (720 minutos). Esses experimentos foram acompanhados de cultura controle. Os testes foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, três vezes. Os dados foram analisados, comparativamente, através da relação direta entre absorvância e tempo de incubação.

#### **3.6.2. Na atividade hemolítica de *S. aureus***

A atividade hemolítica do microrganismo foi avaliada segundo metodologia proposta por Smith-Palmer et al. (2004). Tubos contendo BHI (controle) e BHI acrescidos de CIM de amoxicilina e ciprofloxacino foram inoculados, volume a volume (v/v), com suspensão bacteriana na fase exponencial de crescimento (UDO<sub>620</sub> 0,10), incubados por 24 horas a 37°C. Após esse período, as absorvâncias das culturas foram padronizadas para obtenção da mesma

UDO<sub>620</sub>. Os tubos foram centrifugados a 800 x g por 15 minutos e o sobrenadante das culturas filtrado, utilizando-se membrana com porosidade de 0,2 µm (Corning Incorporated, Alemanha). À 2 mL do sobrenadante foi adicionado 1 mL de suspensão de hemácias de carneiro a 1% em tampão fosfato, pH 7,2. Como controle negativo (ausência de hemólise) e controle positivo da reação (hemólise total) o sobrenadante foi substituído por mesmo volume de PBS e água destilada, respectivamente. Após incubação a 37°C, por 45 minutos, os tubos foram centrifugados a 800 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi, cuidadosamente, transferido para orifícios de microplacas (96 orifícios) para leitura das absorvâncias a 540 nm. Os testes foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, três vezes. A atividade hemolítica das culturas na ausência e presença do antimicrobiano foi determinada em relação ao controle (%).

### 3.6.3. Na indução de citolisinas de *S. aureus*

Células McCoy B (ATCC 1696) foram mantidas em meio Eagle adicionado de 7,5% de soro fetal bovino. Após tripsinização (2 mL de solução de tripsina 0,2% + Versene 0,02%), as células foram quantificadas em câmara de Neubauer e 200 µL do meio contendo, aproximadamente, 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> células/mL foram inoculados em orifícios de microplacas para cultura de tecido (96 orifícios), as quais foram incubadas a 37°C. Após 24 horas, o meio foi removido e cada orifício tratado com diferentes concentrações do sobrenadante da cultura (item 3.6.2.). As placas foram reincubadas por 24 horas e reveladas pela técnica do vermelho neutro que, após homogeneização, foram submetidas à leitura espectrofotométrica em 540 nm e filtro de referência 620 nm (FRESHNEY, 1994). Os testes foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, três vezes, acompanhados de crescimento celular controle.

### **3.6.4. Na fagocitose de *S. aureus***

Os ensaios de fagocitose foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca, do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas Câmpus de Araraquara, UNESP.

#### **3.6.4. 1. Indução de exsudato celular para obtenção de PMNs de rato**

Dez mililitros de uma solução de glicogênio de ostra a 0,5% (p/v) em NaCl a 0,85% (p/v) foram injetados, via intraperitoneal, em rato macho (*Rattus albinus norvegicus*) com peso médio de 200 g. Após 12 horas, o animal foi sacrificado e a cavidade abdominal lavada com 20 mL de PBS Dulbecco (PBS) sem cálcio, contendo 10 UI heparina/mL. O lavado foi coletado por aspiração, com seringa e agulha, transferido para tubo cônico siliconizado e centrifugado a 300 x g, por 3 minutos. Após 2 lavagens com PBS sem cálcio, foi realizada a separação dos PMNs.

#### **3.6.4. 2. Separação e quantificação de PMNs por gradiente de densidade**

Em tubos siliconizados cônicos, com capacidade para 15 mL, foram adicionados 5 mL de histopaque densidade 1077 e, vagarosamente, o mesmo volume da suspensão celular. Os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 800 x g, o sedimento lavado duas vezes em PBS sem cálcio e ressuspenso no mesmo tampão para obtenção de suspensão contendo  $2 \times 10^6$  células/mL (contagem realizada em câmara de Neubauer), a qual foi mantida em banho de gelo durante os experimentos. A eficácia da separação foi verificada através da contagem diferencial das células, em esfregaço obtidos em citocentrífuga (FANEN) após a coloração pelo método de Leishman, através da observação de 500 células por preparação, em microscópio óptico comum (1.000 x). Suspensões contendo, no mínimo, 90% de PMNs foram utilizadas nos ensaios.

### 3.6.4. 3. Avaliação da viabilidade dos PMNs durante o tempo do ensaio

A viabilidade de PMNs, durante o período da reação, foi determinada utilizando a técnica colorimétrica do vermelho neutro (BORENFREUND; PUERNER, 1985). Tampão PBS (100  $\mu$ L) contendo  $6 \times 10^6$  células/mL foi distribuído em orifícios de microplaca para cultura de tecido, sobre o qual foram adicionados 200  $\mu$ L de solução de vermelho neutro (1 mg/mL em PBS) no tempo inicial ( $t = 0$ ) e final ( $t = 60$  min) da reação quimiluminescente. Após incubação por 3 horas, a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> (5 a 7%), o sobrenadante foi desprezado e a viabilidade dos PMNs determinada pela técnica do vermelho neutro (FRESHNEY, 1994). A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro multicanal, em comprimento de onda de 540 nm e filtro de referência 620 nm. Os testes foram realizados em triplicata e acompanharam todos os ensaios.

### 3.6.4. 4. Preparo da suspensão bacteriana

*S. aureus* foi semeado em placa contendo ágar BHI, a qual foi incubada a 37°C por 24 horas. Três colônias foram repicadas para tubos contendo BHI os quais foram incubados a 37°C até a obtenção de crescimento em fase exponencial (UDO<sub>620</sub> 0,10). À 20 mL de solução de amoxicilina (0,5  $\mu$ g/mL) e de ciprofloxacino (0,5  $\mu$ g/mL) em BHI foram adicionados 20 mL da suspensão bacteriana, obtendo-se assim concentração final de 0,25  $\mu$ g/mL ( $\frac{1}{2}$  CIM). Após incubação por 24 horas, os tubos foram centrifugados (800 x g, 15 min). Em seguida, o sedimento foi lavado 3 vezes com PBS sem cálcio e ressuspenso no mesmo tampão para obtenção de suspensão bacteriana com UDO<sub>620</sub> 0,30, utilizada nos ensaios quimiluminescentes por fornecer maior magnitude da emissão de luz (KITAGAWA et al., 2004). Para realização de experimentos com *S. aureus* opsonizado, soro do animal doador de PMNs foi adicionado, volume a volume, à suspensão bacteriana com UDO<sub>620</sub> 0,60 e incubado

por 30 minutos. Os experimentos foram acompanhados de cultura bacteriana crescida na ausência de amoxicilina e ciprofloxacino.

#### 3.6.4. 5. Ensaio quimiluminescente

As reações seguiram recomendações descritas por Silva (2000), realizadas em luminômetro BioOrbit modelo 1251, dotado de dispensadores automatizados. O aparelho estava interfaceado a um microcomputador e os resultados foram processados através do *software* Multiuse versão 2.0. Em tubo de reação, após 10 minutos de incubação, o estímulo foi adicionado ( $t=0$ ) obtendo-se volume final de 1 mL. O tempo da reação foi de 60 minutos (3600 segundos). Os estímulos utilizados foram: *zymosan* na concentração de 700  $\mu\text{g/mL}$  (partículas de *zymosan* foram utilizadas como controle de reação, pois são fagocitadas pelos leucócitos levando à produção de EROs), suspensões bacterianas (opsonizadas e não opsonizadas) incubadas, respectivamente, na presença da concentração subinibitória de amoxicilina, ciprofloxacino e na ausência dos antimicrobianos. O sistema PMN/luminol/PBSD sem a adição do estímulo foi definido como a linha de base.

As reações foram realizadas à 37°C, monitoradas por 60 minutos, obedecendo ao seguinte protocolo geral à 37°C:

- a) PBSD pH 7,4;
- b) Suspensão de leucócitos (PMNs  $2 \times 10^6$  células/mL);
- c) Sonda quimiluminescente luminol ( $2 \times 10^{-5}$  M);
- d) Estímulos (*S. aureus* 0,3 UDO e *zymosan* 1 mg/mL);
- e) Volume final da reação 1 mL.

Para realização dos ensaios, foram adicionados aos tubos de reação: tampão PBSD, suspensão de PMNs e sonda quimiluminescente. Posteriormente, os tubos foram posicionados na câmara de leitura do luminômetro e a reação foi disparada através da adição dos estímulos



imunológicos, utilizando dispensador externo. O pico máximo de emissão de luz e o valor da integral foram calculados para todas as curvas geradas. Os ensaios foram realizados com, no mínimo, três animais em experimentos independentes.

A variação da quimiluminescência ( $\Delta QL$ ) expressou a intensidade máxima de emissão (IME) e integral da cinética de emissão (ICE), após correção com a linha de base (células sem estímulo), representada da seguinte forma:

$$\Delta QL_{\text{Máxima}} = \text{IME das células estimuladas} - \text{IME das células sem estímulo}$$

$$\Delta QL_{\text{Cinética}} = \text{ICE das células estimuladas} - \text{ICE das células sem estímulo}$$

#### **3.6.4. 6. Ensaio de adesão/fagocitose em lâmina por microscopia óptica**

O ensaio seguiu metodologia proposta por Pessoa e Dias (1987) com algumas modificações. Suspensão de PMNs (item 3.6.4. 2.) e *S. aureus* (item 3.6.4.4.) na proporção de 50 bactérias por PMN foi incubada por 10 minutos a 37°C. Os experimentos foram realizados com *S. aureus* opsonizados e não opsonizados. Esfregaços foram realizados em citocentrífuga (FANEN) e, após secagem, corados por Leishman. Para 100 PMNs observados em microscopia óptica por experimento, o número médio de bactérias fagocitadas/aderidas foi calculado. Os resultados do controle e teste foram analisados comparativamente.

#### **3.6.5. Na geração de estresse oxidativo**

Tubos contendo suspensão bacteriana (0,1 mL) com  $UDO_{620}$  1,0 em PBS foram incubados com 0,1 mL de amoxicilina ou ciprofloxacino (0,5  $\mu\text{g/mL}$  de PBS) e 0,5 mL de solução *NBT* (1 mg/mL de PBS) por 30, 120 e 360 minutos. Após esse período, 0,1 mL de HCl (0,1 M) foi adicionado, os tubos centrifugados a 1500 x g durante 15 minutos e a absorvância do sobrenadante foi determinada à 540 nm ( $O_2^-$  extracelular,  $(O_2^-)_e$ ). O sedimento

foi tratado com 0,4 mL de DMSO sobre o qual foi adicionado 0,8 mL de PBS e a UDO determinada em mesmo comprimento de onda ( $O_2^-$  intracelular,  $(O_2^-)_i$ ). Os experimentos foram acompanhados de suspensão bacteriana na ausência do antimicrobiano ( $O_2^-$  basal extra e intracelular). O aumento da geração de  $O_2^-$  extra e intracelular induzido pelo antimicrobiano foi relacionado à concentração basal. Os testes foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, três vezes.

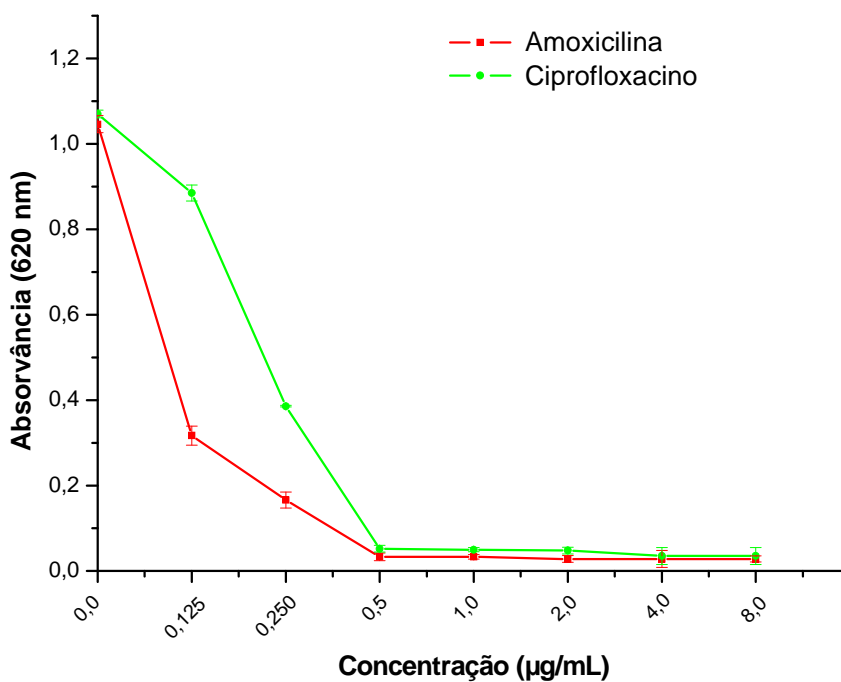
### **3.7. Análise estatística**

A interpretação dos resultados obtidos nos ensaios propostos foi realizada através de análise de variância (ANOVA), sendo 0,05 o nível de significância (LAPPONI, 1997).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Concentração inibitória mínima (CIM)

O efeito de amoxicilina e de ciprofloxacino sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus*, determinado através de técnica espectrofotométrica, está apresentado na Figura 4. A CIM foi definida como sendo a menor concentração do antimicrobiano que promoveu um declínio no valor da absorvância, o qual foi mantido nas concentrações seguintes. A CIM de amoxicilina e de ciprofloxacino para *S. aureus* foi de 0,50 µg/mL.

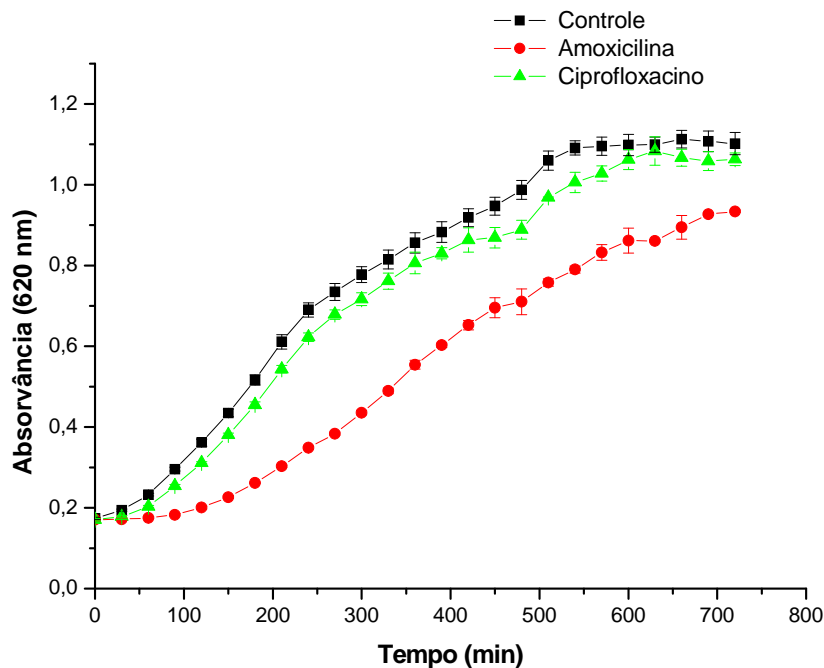


**Figura 4** - Efeito dose-resposta de diferentes concentrações de amoxicilina e ciprofloxacino na inibição do crescimento de *S. aureus*

## 4.2. Efeito da concentração subinibitória de amoxicilina e ciprofloxacino

### 4.2. 1. No crescimento de *S. aureus*

O efeito da concentração subinibitória de amoxicilina e de ciprofloxacino no crescimento do *S. aureus*, por um período de 12 horas (720 minutos), é apresentado na Figura 5. Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores de absorvância das culturas testes e controle foi observado durante o período analisado (Apêndice 8.6., Tabela 9). O efeito direto da concentração subinibitória na restauração do crescimento bacteriano foi maior para amoxicilina em relação ao observado para o ciprofloxacino.



**Figura 5** – Efeito da concentração subinibitória ( $1/2$  CIM) de amoxicilina e ciprofloxacino no crescimento de *S. aureus*

#### 4.2.2. Na atividade hemolítica de *S. aureus*

A atividade hemolítica do sobrenadante de *S. aureus* crescidos na presença da concentração subinibitória de amoxicilina demonstrou diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) de hemólise (64,6%) em relação ao controle, entretanto esta atividade não foi estatisticamente significativa na presença de concentração subinibitória de ciprofloxacino (94,1%). A Tabela 1 apresenta o valor médio das absorvâncias do sobrenadante das culturas e controles utilizados nos ensaios.

**Tabela 1** – Atividade hemolítica para hemácias de carneiro do sobrenadante de culturas de *S. aureus* na presença de concentração subinibitória ( $1/2$  CIM) de amoxicilina e ciprofloxacino

	Atividade hemolítica (absorvância em 540 nm) <sup>1</sup>				valor- <i>P</i> <sup>2</sup>
	Sobrenadante		Controle		
	Controle	Teste	PBS	Água	
amoxicilina	0,186 ± 0,003	0,120 ± 0,013	0,089 ± 0,00061	0,423 ± 0,0023	0,000004*
ciprofloxacino	0,326 ± 0,060	0,307 ± 0,065	0,070 ± 0,024	0,367 ± 0,065	0,6948130

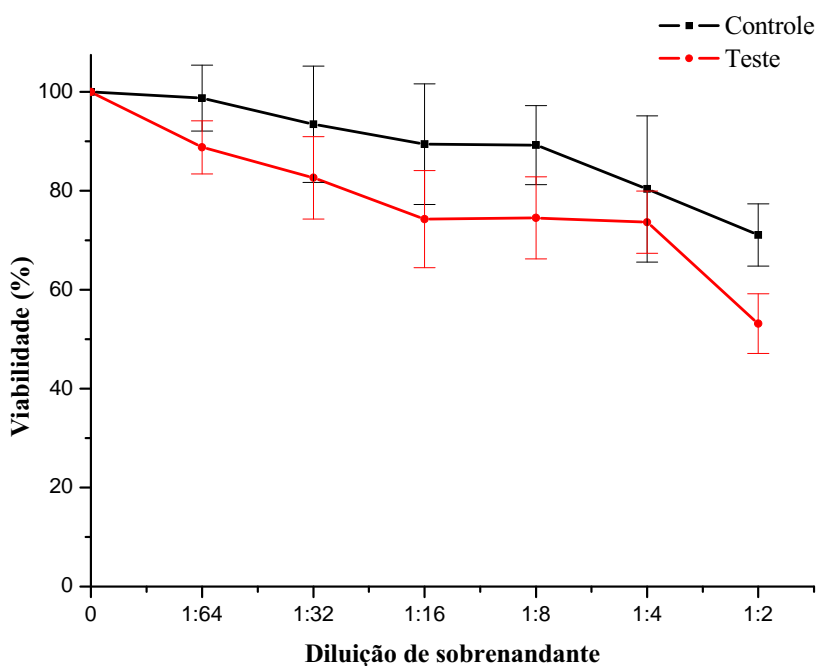
<sup>1</sup> Valor apresentado como média ± desvio padrão

<sup>2</sup> Em relação ao controle e o teste (cultura bacteriana na presença de amoxicilina e de ciprofloxacino)

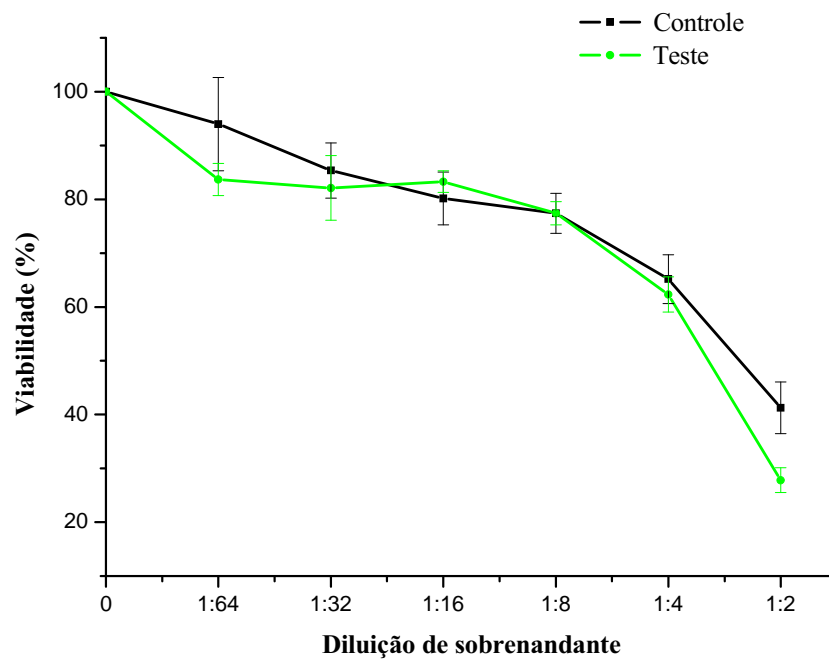
\* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

#### 4.2.3. Na indução de citolisinas de *S. aureus*

A relação dose-efeito na viabilidade de células McCoy do sobrenadante das culturas bacterianas na presença e ausência da concentração subinibitória dos agentes antimicrobianos é representada nas Figuras 6 e 7. As diluições 1:2 do sobrenadante das culturas de *S. aureus* expostos à concentração subinibitória de amoxicilina ( $p^* = 0,0240$ ) e de ciprofloxacino ( $p^* = 0,0023$ ) demonstraram diferença significativa de citotoxicidade em relação ao sobrenadante da cultura na ausência dos antimicrobianos. Os dados utilizados na construção das Figuras 6 e 7 são apresentados no Apêndice 8.7., Tabelas 10 e 11, respectivamente.



**Figura 6** – Relação dose-efeito na viabilidade de células McCoy do sobrenadante de cultura de *Staphylococcus aureus* crescidos na presença da concentração subinibitória ( $1/2$  CIM) de amoxicilina

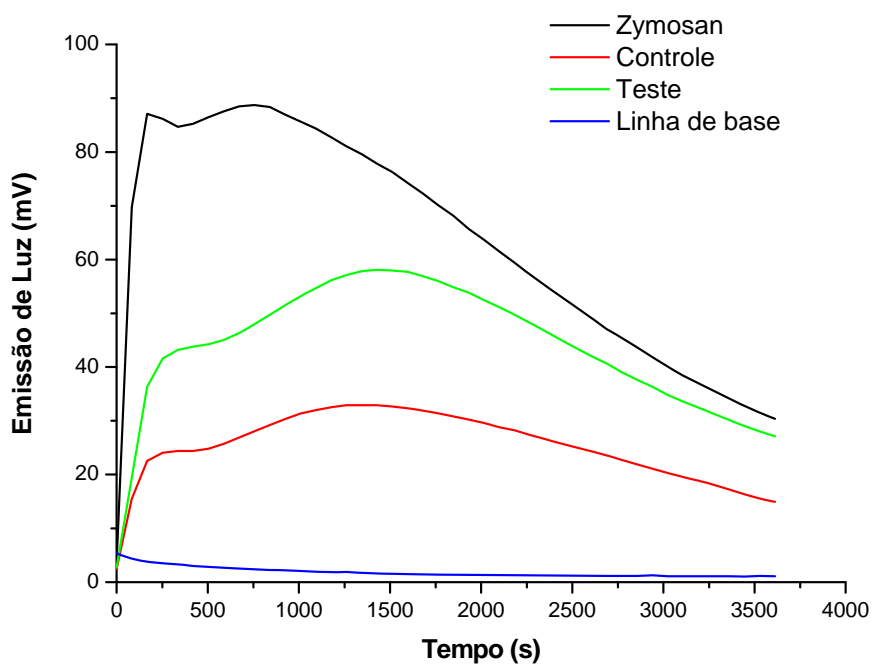


**Figura 7** – Relação dose-efeito na viabilidade de células McCoy do sobrenadante de cultura de *Staphylococcus aureus* crescidos na presença de concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$  CIM) de ciprofloxacino

#### 4.2.4. Na fagocitose de *S. aureus*

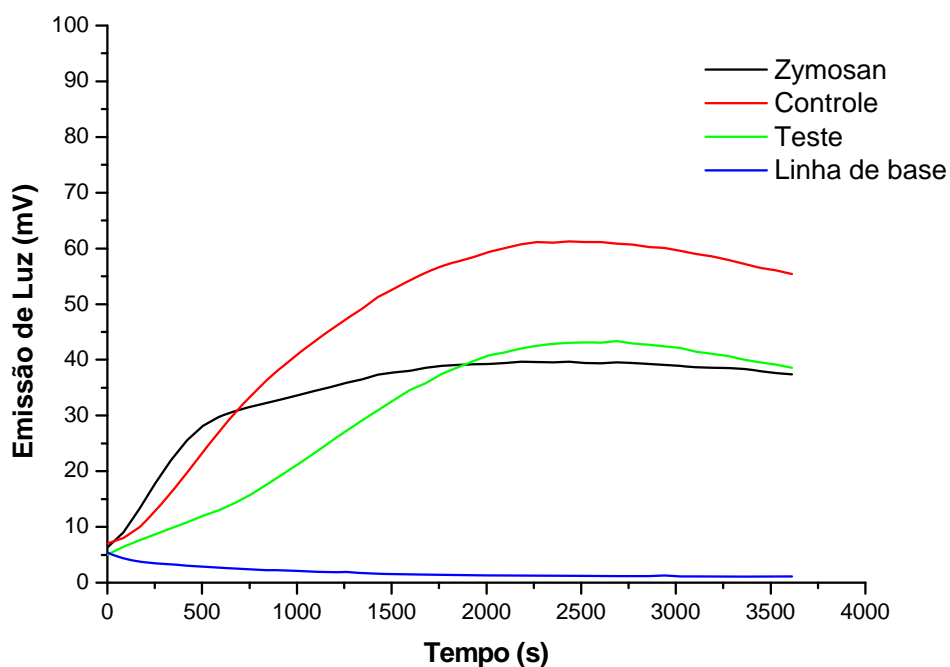
##### 4.2.4.1. Ensaio quimiluminescente

O perfil da cinética dos ensaios quimiluminescentes para *S. aureus* opsonizados e não opsonizados cultivados na presença de concentração subinibitória de amoxicilina está apresentado nas Figuras 8 e 9, respectivamente. A cinética de cada experimento é demonstrada no Apêndice 8.8.1.



**Figura 8** - Quimiluminescência (QL) dos sistemas: PMNs/luminol/zymosan (controle de emissão de luz); PMNs/luminol/*S. aureus* (controle); PMNs/luminol/*S. aureus* tratado com amoxicilina (teste); PMNs/luminol/PBS (linha de base). Cinéticas representativas de, no mínimo, 3 experimentos independentes. Estímulos opsonizados





**Figura 9** - Quimiluminescência (QL) dos sistemas: PMNs/luminol/*zymosan* (controle de emissão de luz); PMNs/luminol/*S. aureus* (controle); PMNs/luminol/*S. aureus* tratado com amoxicilina (teste); PMNs/luminol/PBS (linha de base). Cinéticas representativas de, no mínimo, 3 experimentos independentes. Estímulos não opsonizados

A análise da integral da cinética de emissão (ICE) e intensidade máxima de emissão (IME) da cultura controle em relação ao teste, através da ANOVA, mostra que nos experimentos utilizando bactérias opsonizadas houve um aumento significativo na fagocitose do microrganismo quando crescido na presença de amoxicilina, todavia esse aumento não foi evidenciado nos experimentos com a bactéria não opsonizada (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 2** - Variação da quimiluminescência ( $\Delta QL$ ) para integral da cinética de emissão (ICE) do sistema PMN/luminol/*S. aureus* na ausência e presença de concentração subinibitória ( $1/2$  CIM) de amoxicilina

	$\Delta QL$ para ICE <sup>1</sup>		valor-P <sup>2</sup>
<i>S. aureus</i> opsonizados	Controle	$8,83 \times 10^7 \pm 14917282$	0,023244*
	Teste	$1,56 \times 10^8 \pm 29427577$	
<i>S. aureus</i> não opsonizados	Controle	$1,67 \times 10^8 \pm 36279142$	0,170028
	Teste	$1,08 \times 10^8 \pm 49563001$	

<sup>1</sup> Valor apresentado como média  $\pm$  desvio padrão

<sup>2</sup> Obtido através da comparação da ICE do controle e do teste

\* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

**Tabela 3** - Variação da quimiluminescência ( $\Delta QL$ ) para intensidade máxima de emissão (IME) do sistema PMN/luminol/*S. aureus* na ausência e presença de concentração subinibitória ( $1/2$  CIM) de amoxicilina

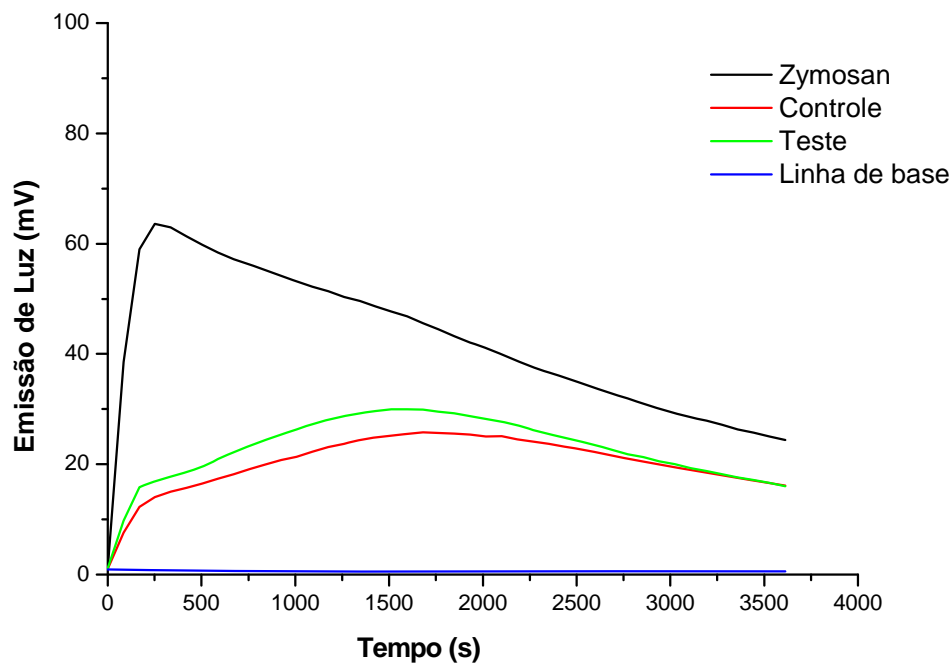
	$\Delta QL$ para IME <sup>1</sup>		valor-P <sup>2</sup>
<i>S. aureus</i> opsonizados	Controle	$33020,98 \pm 8193,797$	0,018436*
	Teste	$57884,31 \pm 7650,84$	
<i>S. aureus</i> não opsonizados	Controle	$59321,33 \pm 14885,04$	0,296817
	Teste	$41044,67 \pm 21815,16$	

<sup>1</sup> Valor apresentado como média  $\pm$  desvio padrão

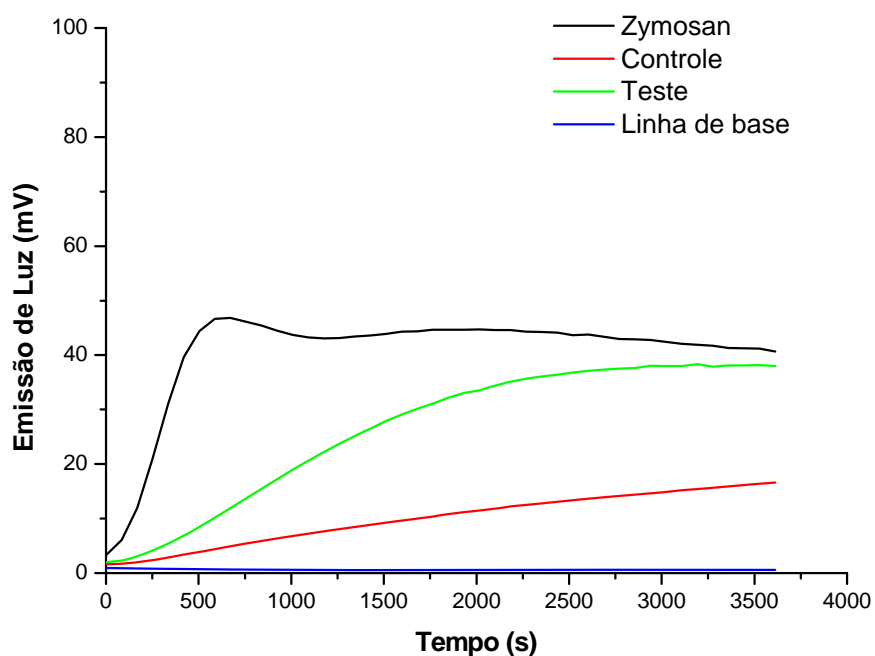
<sup>2</sup> Obtido através da comparação da IME do controle e do teste

\* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

A cinética da reação quimiluminescente para *S. aureus* opsonizados e não opsonizados cultivados na presença de concentração subinibitória de ciprofloxacino é apresentada nas Figuras 10 e 11, respectivamente. A cinética de cada experimento é demonstrada no Apêndice 8.8.2.. Através da ANOVA, a ICE e IME dos experimentos controle e teste (Tabelas 4 e 5) demonstram que nos experimentos onde os *S. aureus* foram opsonizados não houve um aumento significativo na fagocitose, entretanto para a bactéria não opsonizada houve diferença significativa em relação ao controle.



**Figura 10** - Quimiluminescência (QL) dos sistemas: PMNs/luminol/zymosan (controle de emissão de luz); PMNs/luminol/*S. aureus* (controle); PMNs/luminol/*S. aureus* tratado com ciprofloxacino (teste); PMNs/luminol/PBS (linha de base). Cinéticas representativas de, no mínimo, 3 experimentos independentes. Estímulos opsonizados



**Figura 11** - Quimiluminescência (QL) dos sistemas: PMNs/luminol/*zymosan* (controle de emissão de luz); PMNs/luminol/*S. aureus* (controle); PMNs/luminol/*S. aureus* tratado com ciprofloxacino (teste); PMNs/luminol/PBS (linha de base). Cinéticas representativas de, no mínimo, 3 experimentos independentes. Estímulos não opsonizados

**Tabela 4** - Variação da quimiluminescência ( $\Delta$ QL) para integral da cinética de emissão (ICE) do sistema PMN/luminol/*S. aureus* na ausência e presença de concentração subinibitória ( $1/2$  CIM) de ciprofloxacino

	$\Delta$ QL para ICE <sup>1</sup>		valor-P <sup>2</sup>
<i>S. aureus</i> opsonizados	Controle	$7,1 \times 10^7 \pm 5013451$	0,176156
	Teste	$8,2 \times 10^7 \pm 10086365$	
<i>S. aureus</i> não opsonizados	Controle	$3,3 \times 10^7 \pm 16396223$	0,021216*
	Teste	$9,3 \times 10^7 \pm 49563001$	

<sup>1</sup> Valor apresentado como média  $\pm$  desvio padrão

<sup>2</sup> Obtido através da comparação da ICE do controle e do teste

\* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

**Tabela 5** - Variação da quimiluminescência ( $\Delta$ QL) para intensidade máxima de emissão (IME) do sistema PMN/luminol/*S. aureus* na ausência e presença de concentração subinibitória ( $1/2$  CIM) de ciprofloxacino

	$\Delta$ QL para IME <sup>1</sup>		valor-P <sup>2</sup>
<i>S. aureus</i> opsonizados	Controle	$25384,31 \pm 4016,759$	0,186452
	Teste	$31077,64 \pm 4711,814$	
<i>S. aureus</i> não opsonizados	Controle	$16060,98 \pm 8122,376$	0,016833*
	Teste	$38990,98 \pm 5930,99$	

<sup>1</sup> Valor apresentado como média  $\pm$  desvio padrão

<sup>2</sup> Obtido através da comparação da IME do controle e do teste

\* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

#### 4.2.4.2. Ensaio de adesão/fagocitose em lâmina

Diferença significativa entre *S. aureus* opsonizados crescidos e não crescidos na presença de amoxicilina foi observada quando as médias do número de bactérias aderidas/fagocitadas por PMN foram comparadas ( $p < 0,05$ ). Entretanto, não houve diferença significativa ( $p = 0,57293$ ) quando não opsonizadas (Tabela 6). Em relação ao ciprofloxacino, observou-se que não houve diferença significativa da média do número de bactérias aderidas/fagocitadas por PMN independente de opsonização ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle (Tabela 7).

**Tabela 6** – Porcentagem de neutrófilos fagocitantes e média de células bacterianas, opsonizadas e não opsonizadas, aderidas/fagocitadas por PMN cultivadas na presença de concentração subinibitória ( $1/2$  CIM) de amoxicilina

		Neutrófilos Fagocitantes (%)	Média do número de bactérias aderidas/fagocitadas por PMN <sup>1</sup>	valor-P <sup>2</sup>
<i>S. aureus</i> opsonizados	Controle	74,9 ± 6,07	Controle 5,2 ± 0,45	0,000584*
	Teste	93,8 ± 3,61	Teste 10,6 ± 0,8	
<i>S. aureus</i> não opsonizados	Controle	53,1 ± 6,47	Controle 2,53 ± 0,49	0,572933
	Teste	55,0 ± 4,57	Teste 2,86 ± 0,80	

<sup>1</sup> Valor apresentado como média ± desvio padrão

<sup>2</sup> Obtido através da comparação da média do número de bactérias aderidas/fagocitadas por PMN do controle com a média do número de bactérias aderidas/fagocitadas por PMN do teste

\* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

**Tabela 7** – Porcentagem de neutrófilos fagocitantes e média de células bacterianas, opsonizadas e não opsonizadas, aderidas/fagocitadas por PMN cultivadas na presença de concentração subinibitória ( $1/2$  CIM) de ciprofloxacino

	Neutrófilos Fagocitantes (%)		Média do número de bactérias aderidas/fagocitadas por PMN <sup>1</sup>		valor- <i>P</i> <sup>2</sup>
<i>S. aureus</i> opsonizados	Controle	74,9 ± 6,07	Controle	5,2 ± 0,45	0,465521
	Teste	76,5 ± 3,70	Teste	5,5 ± 0,50	
<i>S. aureus</i> não opsonizados	Controle	53,1 ± 6,47	Controle	2,53 ± 0,49	0,106832
	Teste	58,0 ± 4,10	Teste	3,33 ± 0,45	

<sup>1</sup> Valor apresentado como média ± desvio padrão

<sup>2</sup> Obtido através da comparação da média do número de bactérias aderidas/fagocitadas por PMN do controle com a média do número de bactérias aderidas/fagocitadas por PMN do teste.

#### 4.2.5. Na geração de estresse oxidativo

O teste de redução de *nitroblue tetrazolium* (NBT) permitiu detectar estresse oxidativo, através do aumento da taxa de produção de espécies reativas do oxigênio (EROs), das amostras testes em relação ao controle (Tabela 8) e diferenciar a resposta intracelular da extracelular. Observou-se que tanto a amoxicilina como o ciprofloxacino foi capaz de gerar estresse oxidativo em *S. aureus*, entretanto em menor intensidade para a amoxicilina. A geração de estresse foi tempo dependente, sendo maior intracelularmente no início da incubação.

**Tabela 8** – Relação ânion superóxido intra e extracelular induzida por concentração subinibitória de amoxicilina e ciprofloxacino ( $1/2$  CIM), determinadas pela técnica de *NBT*, em *S. aureus*

Antimicrobianos	$O_2^-$ *	Período de incubação (min)		
		30	120	360
amoxicilina	$(O_2^-)_i$ **	3,7	3,1	-
	$(O_2^-)_e$ ***	-	-	6,0
ciprofloxacino	$(O_2^-)_i$	7,0	9,4	-
	$(O_2^-)_e$	-	-	8,9

\*  $O_2^-$  na presença do antimicrobiano/  $O_2^-$  basal  
 \*\*  $(O_2^-)_i$  – relação ânion superóxido intracelular  
 \*\*\*  $(O_2^-)_e$  – relação ânion superóxido extracelular



## 5. DISCUSSÃO

Nas duas últimas décadas, a compreensão da relação entre parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos dos antimicrobianos foi ampliada e a correlação entre a potência *in vitro* e a eficácia *in vivo* passou a ter grande importância na seleção do agente e na determinação do esquema terapêutico apropriado (JACOBS, 2007). Estudos *in vitro* e *in vivo* vêm demonstrando que diferentes classes de antibióticos apresentam comportamento variável em relação à farmacodinâmica (NICOLAU, 2003; ODENHOLT et al., 2003; SCAGLIONE; PARABONI, 2008).

O sucesso da terapia antimicrobiana também pode estar associado à influência do antimicrobiano sobre vários fatores de virulência relacionados ao microrganismo. Efeito pós-antibiótico é o termo utilizado para descrever a supressão do crescimento bacteriano que persiste após a exposição do microrganismo ao antimicrobiano (SPANGLER et al., 1998). Esses efeitos são considerados de grande valor clínico, visto que *in vivo* a exposição a concentrações supra-inibitórias são sempre seguidas de subinibitórias (ODENHOLT, 2001). O efeito supressor do crescimento bacteriano, que é mantido mesmo em concentrações abaixo da CIM por muitos agentes, pode permitir a extensão do intervalo da administração do medicamento (HOWARD et al., 1993, SPANGLER et al., 2000).

Diferentes metodologias podem ser utilizadas para quantificar o crescimento de uma população bacteriana, os métodos diretos determinam o número de células e os indiretos analisam a massa da população que é diretamente proporcional ao número de células (TORTORA et al., 2005). No presente estudo, através da técnica espectrofotométrica, método indireto utilizado no monitoramento do crescimento bacteriano, foi possível evidenciar o efeito da sub-CIM ( $\frac{1}{2}$  CIM) de amoxicilina e ciprofloxacino no crescimento de *S. aureus*. Os

danos induzidos por essa concentração foram suficientes para alterar a dinâmica do crescimento bacteriano.

O efeito pós-antibiótico é um mecanismo dependente da recuperação bacteriana dos danos induzidos pelo agente antimicrobiano. A reparação ou re-síntese dos componentes celulares danificados por um antimicrobiano beta-lactâmico é relatada como responsável pela duração do efeito pós-antibiótico (LI et al., 1997). Há citação de que estafilococos não retornam ao crescimento normal por várias horas após a exposição à penicilina G (GUAN et al., 1992). Os benefícios da existência do efeito pós-antibiótico da sub-CIM de amoxicilina sobre *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus sanguis*, agentes etiológicos de endocardites, foram apontados como benéficos na profilaxia de infecções em procedimentos dental/oral (LEE, 2000).

A resposta farmacodinâmica de cepas de *Streptococcus pneumoniae* com diferentes graus de susceptibilidade à benzilpenicilina foi relatada não apresentar analogia com a CIM, isto é, independente da CIM observa-se os mesmos efeitos pós-antibiótico da CIM e sub-CIM, indicando ser um parâmetro não relacionado com a susceptibilidade da cepa (ODENHOLT et al., 2003). A resistência à metilina de *S. aureus* foi confirmada não afetar a duração do efeito pós-antibiótico para linezolida, inibidor de síntese protéica, utilizado no tratamento de cepas resistentes à oxacilina (MUNCKHOF et al., 2001).

A influência do efeito pós-antibiótico de várias classes de antimicrobianos em diferentes espécies bacterianas foi demonstrada em diversos trabalhos (ODENHOLT-TORNQVIST et al., 1995; FUENTES et al., 1998, ODENHOLT et al., 2003). A literatura relata que bactérias expostas ao ciprofloxacino apresentam a fase *lag* do crescimento estendida, na qual ocorre reparação do dano do DNA provocado pela exposição ao antimicrobiano (HOWARD et al., 1993). O efeito pós-antibiótico da sub-CIM de

ciprofloxacino para cepas de *S. aureus* meticilina resistente também foi demonstrado ser proporcional à concentração de antimicrobiano a qual as cepas são submetidas (LICATA et al., 1997). No presente estudo, o efeito pós-antibiótico de  $\frac{1}{2}$  CIM foi significativamente maior para a amoxicilina em relação ao observado para o ciprofloxacino, demonstrando que a supressão do crescimento de *S. aureus* pode ser mantida por maior tempo em baixas concentrações, sendo um efeito a ser considerado na dinâmica desse antimicrobiano.

Não obstante a atividade antibacteriana e duração do efeito pós-antibiótico induzidas por antimicrobianos serem relatadas em diversos estudos, outras alterações metabólicas e celulares relacionadas a múltiplos fatores de virulência podem ser observadas, aumentando ou diminuindo a capacidade do microrganismo de provocar danos ao hospedeiro (OHLSEN et al., 1998; GEMMELL; FORD, 2002; DAL SASSO et al., 2003). Nos últimos anos, um grande número de genes relacionados à virulência de *S. aureus* foi caracterizado, revelando mecanismos complexos de regulação, coerente com a extraordinária capacidade dessa bactéria em adaptar-se ao hospedeiro (BRONNER et al., 2004)

A virulência bacteriana é essencialmente determinada pela presença de proteínas da superfície celular e toxinas extracelulares que são reguladas e expressas em diferentes fases e/ou condições de crescimento (TEGMARK et al., 2000). As proteínas consideradas fatores de virulência de *S. aureus* estão enquadradas em duas categorias: 1) toxinas secretadas, que servem tanto para degradar os tecidos ou para modular o sistema imune do hospedeiro, e 2) proteínas de superfície, que estão envolvidas na aderência à célula do hospedeiro, na penetração intracelular e na evasão do sistema imune (BENTON et al., 2004).

Das, aproximadamente, 220 toxinas bacterianas conhecidas, cerca de 40% lesam membranas de células eucarióticas. De modo geral, as citolisinas formadoras de poro

compartilham mecanismo de ação semelhante, que envolve ligação à membrana, seguida de sua inserção, oligomerização e formação de poro (TORTORA et al., 2005).

A toxina melhor caracterizada é a alfa-hemolisina, reconhecida pela toxicidade para uma variedade de várias células de mamíferos, incluindo capacidade hemolítica para eritrócitos de carneiro (BHAKDI; TRANUM-JENSEN, 1991). A beta-hemolisina, diferente de outras toxinas citolíticas, é uma enzima que apresenta atividade de esfingomielinase, o que justifica diferenças na suscetibilidade de eritrócitos de diversas origens para esta enzima (HUSEBY et al., 2007). A delta-hemolisina, cuja função ainda não está bem definida, também é relatada ser capaz de danificar a membrana de uma variedade de eritrócitos e outras células de mamíferos (DINGES et al., 2000).

Um aumento na expressão de alfa-toxina foi inicialmente descrito ocorrer na presença de concentrações subinibitórias de beta-lactâmicos (KERNODLE et al., 1995; OHLSEN et al., 1998). Posteriormente, Worlitzsch et al. (2001) demonstraram que essa indução é cepa-dependente. A técnica utilizada para revelar da atividade hemolítica do sobrenadante da cultura de *S. aureus* demonstrou que na presença de ½ CIM (0,25 µg/mL) de amoxicilina *S. aureus* ATCC 25923 apresentou atividade hemolítica diminuída para hemácias de carneiro em relação à observada em cultura na ausência do antimicrobiano. Estudos *in vitro* demonstraram que a beta-hemolisina impede a polimerização da alfa-hemolisina em membranas celulares que contenham esfingomielinina (WADSTROM; MOOLBY, 1971), que, em parte, poderia justificar os resultados observados, visto ser *S. aureus* ATCC 25923 cepa produtora de beta-hemolisina (Apêndice 8.1).

Na expressão de fatores de virulência em *S. aureus*, sistemas reguladores controlam os genes codificadores para esses fatores, sendo o *agr* (*accessory gene regulator*) o melhor descrito, mas outros sistemas já foram identificados (*sae*, *srr*, *arl*) (NOVICK, 2003). O lócus

*agr*, que consiste de cinco genes (*agrA*, *agrC*, *agrD*, *agrB*, *hld*), é descrito como tendo dupla ação, assim como reprime a transcrição de um número de proteínas associadas à parede celular (proteína A, coagulase, proteína ligante de fibronectina) ativa várias exoproteínas (alfa-toxina, beta-hemolisina, leucotoxinas) durante a fase pós-exponencial do crescimento. O segundo maior sistema identificado na regulação global é o locus *sae* (*S. aureus exoprotein expression*), cuja transcrição pode ser modulada por estímulos externos, incluindo concentrações subinibitórias de antimicrobianos (BRONNER et al., 2004).

Concentração subinibitória de beta-lactâmicos foi relatada induzir atividade hemolítica em *S. aureus* por ativar o sistema regulador *sae* (KURODA et al., 2003). Kuroda et al. (2007), utilizando cefoxitina (cefalosporina de 2ª geração, assim como os demais beta-lactâmicos, interfere na síntese da parede celular via inibição de enzimas envolvidas no processo de transpeptidação) como indutora do sistema SaeRS (regulador do locus *sae*), demonstram que a atividade hemolítica em ágar sangue de carneiro de cepa padrão de *S. aureus* metilicina resistente é induzida de maneira dose-dependente (concentrações de 0,5 a 6 µg/mL), mas que a intensidade do estímulo para a indução do sinal dependente do sensor SaeS quinase ainda não está definida. Estudo recente de Stevens et al. (2007) demonstrou que baixa concentração (0,2 µg/mL) de nafcilina tem a capacidade aumentar a produção de alfa-hemolisina enquanto alta concentração ( $\geq 2\mu\text{g/mL}$ ) resultou na redução desta toxina. Considerando os dados apresentados na literatura, podemos inferir o efeito da metodologia, cepa e concentração utilizadas nesse estudo no que diz respeito à demonstração da modulação de hemolisinas por amoxicilina para hemácias de carneiro.

Diferente dos beta-lactâmicos, baixas concentrações de antimicrobianos que interferem na síntese protéica (aminoglicosídeos) diminuem a atividade hemolítica em algumas cepas de *S. aureus* (WORLITZSCH et al., 2001). Ohlsen et al. (1998) avaliaram o efeito da concentração subinibitória de vários antimicrobianos, com diferentes mecanismos de

ação, na expressão alfa-toxina, sendo referido que o ofloxacino não induz aumento significativo dessa toxina. Outros dados da literatura sugerem que as fluorquinolonas aumentam em pequena intensidade os níveis de produção de alfa-toxina (WORLITZSCH et al., 2001). Nesse estudo, ½ CIM de ciprofloxacino demonstrou não alterar a atividade hemolítica de *S. aureus* ATCC 25923 para hemácias de carneiro.

A expressão de hemolisinas de *S. aureus* com atividade de citolisina também pode ser demonstrada *in vitro* sobre diferentes tipos celulares. Maior atividade citolítica para células McCoy foi observada no sobrenadante de culturas crescidas na presença da concentração subinibitória de amoxicilina e ciprofloxacino. *S. aureus* produz quatro hemolisinas e a maioria dos trabalhos investiga o efeito de antimicrobianos na atividade da alfa-toxina. A produção de alfa-hemolisina e beta-hemolisina é regulada independentemente pelo locus *agr* e *sae*, enquanto que a delta-hemolisina e gama-hemolisina apenas pelo *agr* (NOVICK, 2003).

Os fatores de virulência em *S. aureus* não estão distribuídos igualmente entre as diferentes cepas e nem sempre são regulados da mesma maneira entre elas (BRONNER et al., 2004). Uma análise global de exoproteínas de *S. aureus* meticilina-resistente conduzida *in vitro* por Burlak et al. (2007), utilizando abordagem proteômica, identificou 250 exoproteínas, das quais 20 na fase exponencial de crescimento e 33 no início da fase estacionária estão associadas à virulência. Onze exoproteínas conhecidas relacionadas à virulência diferem em quantidade entre cepas, incluindo alfa-hemolisina, estafiloquinase, coagulase, lipase, enterotoxina Q, V8 protease e cisteína protease, entretanto uma análise compreensiva dessas exoproteínas ainda não é conhecida.

Além da produção de exotoxinas, a virulência do *S. aureus* é essencialmente determinada por proteínas associadas à parede celular que são, coordenadamente, reguladas e expressas durante as diferentes fases e/ou condições de crescimento (PÖHLMANN-DIETZE

et al., 2000). Estudos demonstram que baixas concentrações de agentes antimicrobianos podem modular determinantes específicos da superfície bacteriana, interferindo na relação hospedeiro-bactéria (HOWARD et al., 1993; BRAGA et al., 2000; DAL SASSO et al., 2003; PALMQVIST et al., 2004).

Na fagocitose, o processo de fixação do complemento tem como objetivo facilitar o reconhecimento inicial do microrganismo por células efectoras do sistema imune, sendo a opsonização uma das funções do complemento. Três vias de ativação do complemento são conhecidas, sendo a via alternativa e a via da lectina componentes da imunidade inata, enquanto a via clássica requer interação específica entre anticorpo e antígeno. O evento central da ativação do complemento é a proteólise da proteína C3 para gerar produtos biologicamente ativos e a subsequente ligação covalente de um produto de C3, denominado de C3b, à superfície da célula microbiana, que atua como opsonina e favorece a fagocitose por neutrófilos e macrófagos, os quais ostentam receptores para essa molécula (ROOIJAKKERS et al., 2005b; ABBAS et al., 2008).

Dentre as moléculas de evasão do sistema imune descritas em *S. aureus*, a proteína A e estafiloquinase (SAK), reconhecidas pela capacidade de ligarem-se à fração Fc de IgG, bloqueiam receptores que têm habilidade de ativar o sistema complemento através da via clássica (DEDENT et al., 2007; ROOIJAKKERS et al., 2005a). A SAK, além de inibir a fagocitose por essa via, tem a capacidade de inibir a ligação C3b, molécula opsônica necessária para o reconhecimento bacteriano pelo sistema imune (FOSTER, 2005; ROOIJAKKERS et al., 2005a), interferindo assim nas outras vias de reconhecimento do patógeno.

O fator de aglutinação A (ClfA), também considerado anti-fagocítico, é uma proteína ligante de fibrinogênio que é ancorada na parede celular durante a fase estacionária do crescimento bacteriano, todavia, *in vivo* a densidade de células bacterianas não é suficiente

para que a aglutinação possa ocorrer (FOSTER, 2005). O efeito anti-fagocítico do ClfA foi, recentemente, demonstrado por Hair et al. (2008); por ser uma proteína que rapidamente transforma o C3b na forma inativa, inibe a ativação do complemento através da via alternativa, contribuindo para a evasão do microrganismo do sistema imune inato.

Na evasão da fagocitose mediada por opsoninas, proteínas presentes na superfície bacteriana passam a ter importância crucial, visto que a ativação do complemento é por si um fenômeno de superfície (ROOIJAKKERS et al., 2005c). Em curto espaço de tempo, várias outras novas moléculas responsáveis pela evasão do sistema imune foram descritas em *S. aureus*, sendo o sistema complemento o maior alvo dessa estratégia (JONGERIUS et al., 2007). Proteína estafilocócica inibidora do complemento (SCIN) é uma proteína moduladora do sistema complemento que, eficientemente, protege *S. aureus* da opsonização, pois atua inibindo as três vias de ativação por agir sobre a C3 convertase, enzima que catalisa a deposição de C3b na superfície bacteriana (ROOIJAKKERS et al., 2005b). A proteína ligante de fibrinogênio (Efb) foi demonstrada ligar-se diretamente ao fator C3 do complemento e bloquear a deposição de C3b na superfície bacteriana, impedindo a opsonização (LEE et al., 2004).

Vários genes acessórios codificam fatores de virulência, cuja expressão é controlada por reguladores. O locus *agr*, já mencionado, é um regulador positivo para as exotoxinas secretadas durante a fase pós-exponencial de crescimento, porém é regulador negativo para os fatores associados à superfície (DUNMAN et al., 2001). Assim, o sistema *agr* é descrito ter dupla ação: reprimir a transcrição de um número de proteínas associadas à parede celular (proteína A, coagulase, proteína ligante de fibronectina (FnBP), ClfA) e ativar várias exoproteínas (alfa-toxina, beta-hemolisina e leucocidinas) durante a fase pós-exponencial (BRONNER et al., 2004)



A fagocitose pode ser monitorada através do *burst respiratório* que induz produção de EROs (JANG et al., 1999). Através da técnica quimiluminescente utilizando luminol, demonstramos que a opsonização favoreceu a fagocitose de *S. aureus* crescidos na presença de amoxicilina, indicando que este antimicrobiano tem a capacidade de inibir fatores anti-opsonicos, proteínas de superfície que interferem diretamente na deposição de C3b ou na sua inativação, na superfície bacteriana. Essas observações sugerem que no tratamento de infecções estafilocócicas com amoxicilina, além da atividade antibacteriana, este antimicrobiano também pode favorecer o reconhecimento do microrganismo por fagócitos.

Baixas concentrações de agentes antimicrobianos podem modular adesinas específicas na superfície bacteriana envolvidas no processo fagocítico não dependente de opsonização (HOWARD et al., 1993; BRAGA et al., 2000; DAL SASSO et al., 2003; PALMQVIST et al., 2004). Na ausência do complemento, PMNs podem reconhecer vários componentes da parede celular bacteriana através de receptores *toll-like*, os quais desempenham papel crítico na resposta inata do hospedeiro à invasão de patógenos. Esses receptores são expressos em tecidos envolvidos na função imune, sendo que já foram caracterizados em leucócitos humano e murino (ROSKAMP et al., 2005).

Receptores *toll-like* reconhecem o ácido lipoteicóico (LTA) da parede bacteriana de estafilococos (ROOIJAKKERS et al., 2005c). O tratamento com antibióticos beta-lactâmicos foi relatado induzir a liberação de LTA, incorporado no peptidoglicano, de *S. aureus* (LOTZ et al., 2006). No presente estudo, a demonstração de que concentração subinibitória de amoxicilina ( $\frac{1}{2}$  CIM) acarretou diminuição da fagocitose não opsonizada de *S. aureus* ATCC 25923 por PMNs pode sugerir que este antimicrobiano tenha capacidade de inibir e/ou estimular expressão de proteínas de superfície envolvidas nesse processo.

Concentrações subinibitórias de algumas fluorquinolonas são capazes de afetar características do DNA, diminuindo alguns fatores responsáveis pela virulência bacteriana,

através de alterações na síntese de proteínas (BRAGA et al., 2002). Os resultados dos ensaios quimiluminescentes demonstraram não haver diferença no *burst* oxidativo de *S. aureus* opsonizados quando crescidos na presença de ciprofloxacino em relação ao controle, demonstrando que este antimicrobiano não interfere em proteínas de superfície responsáveis pela evasão do microrganismo do sistema imune dependente de opsonização, como demonstrado para amoxicilina. Entretanto, *S. aureus* não opsonizados quando crescidos na presença de ciprofloxacino foram mais susceptíveis à fagocitose em relação ao controle. O aumento na fagocitose de *S. aureus* induzido por 1/8 da CIM de diferentes quinolonas foi relatado por Sonstein e Burnham (1993), que sugeriram ser as quinolonas capazes de romper mecanismos reguladores que controlam a adesão bacteriana. Atualmente, já é reconhecido que a expressão de muitas estruturas que, especificamente, promovem adesão pode ser influenciada por estímulos externos, incluindo antimicrobianos (VAN BELKUM et al., 2002).

*S. aureus* e outras espécies bacterianas expressam proteínas de superfície denominadas MSCRAMM (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) que reconhecem cada matriz do hospedeiro. A importância desses componentes de superfície na virulência é reconhecida, incluindo aqueles específicos para fibronectina, colágeno, fibrinogênio e elastina (VAN BELKUM et al., 2002). É descrito que *S. aureus* crescido na presença de concentração subinibitória de ciprofloxacino tem maior capacidade de aderir-se a superfícies de polímeros recobertos com fibronectina, visto que esse antimicrobiano induz aumento nos níveis de proteínas ligantes de fibronectina (FnBPs) (BISOGNANO et al., 2000, Li et al., 2005). As FnBPs demonstram ter papel significativo na adesão e invasão de *S. aureus* em células epiteliais (LIANG; JI, 2007).

A literatura ainda relata que antimicrobianos podem gerar estresse oxidativo em bactérias (BARNES et al., 2005), sendo um fator adicional de grande importância na ação bactericida, independentemente do mecanismo de ação. A indução de EROs acima dos níveis

considerados normais foi um novo efeito relacionado à ação bactericida de ampicilina e gentamicina em cepas sensíveis de *Enterococcus faecalis*, pois esses antimicrobianos interferem na fisiologia contribuindo para morte do microrganismo (BARNES et al., 2005). O radical ânion superóxido, primeira ERO gerada durante o metabolismo oxidativo, foi apontado por Albesa et al. (2004) ter sua produção aumentada por diversos antimicrobianos (cloranfenicol, ciprofloxacino, ceftazidima e piperacilina), em diferentes níveis, por distintas espécies bacterianas sensíveis. A seletividade de ação do ciprofloxacino envolve a indução de um alto estresse oxidativo no microrganismo que justifica sua ação em lipídeos, DNA e outros componentes celulares (BECERRA et al., 2003).

Os resultados obtidos no presente estudo, utilizando a técnica da redução do *NTB*, demonstraram que a indução de  $O_2^-$  intracelular pelo ciprofloxacino em *S. aureus* ATCC 25923 foi cerca de duas a três vezes maior em relação ao induzido por amoxicilina, no mesmo período de tempo, efeito que também contribui para a morte bacteriana. As três maiores classes de antimicrobianos com ação bactericida, beta-lactâmicos (ampicilina), aminoglicosídeos (canamicina) e quinolonas (norfloxacino), foram demonstradas estimular a produção de doses letais de radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ), sugerindo ser uma ação comum entre esses antimicrobianos, independente do mecanismo de ação, entretanto antimicrobianos bacteriostáticos não induziram produção deste radical. Esses resultados sugerem que os radicais hidroxilas, decorrentes da atuação de antimicrobianos bactericidas, promovam alterações bioquímicas e genéticas, que geram um ambiente oxidativo altamente deletério para o microrganismo (KOHANSKI et al., 2007).

A demonstração de que diferentes antimicrobianos possam atuar sobre diferentes aspectos relacionados ao microrganismo e seus fatores de virulência, bem como na resposta do hospedeiro, marca transformações conceituais nos critérios de escolha dos antimicrobianos para situações clínicas específicas. A maioria das doenças estafilocócicas é multifatorial,

envolvendo a produção de vários fatores determinantes de virulência. A conquista de novas técnicas laboratoriais associadas à evolução da biologia celular e molecular, bioquímica, microbiologia e genética poderão oferecer avanços nos atuais princípios de seleção de antimicrobianos, bem como poderão permitir a escolha do antimicrobiano ideal para cada cepa de *S. aureus* isolada de diferentes processos infecciosos.

## 6. CONCLUSÃO

Levando-se em consideração os resultados obtidos no efeito da metade da concentração inibitória mínima ( $\frac{1}{2}$  CIM) de amoxicilina e ciprofloxacino sobre alguns fatores de virulência em *S. aureus* ATCC 25923, conclui-se que amoxicilina induz efeito mais prolongado na restauração do crescimento desse microrganismo e influencia positivamente a fagocitose dependente de opsoninas e que ciprofloxacino estimula a fagocitose não opsonizada e induz maior estresse oxidativo na bactéria. Este trabalho confrontou a ação de dois antimicrobianos, com diferentes mecanismos de ação, sobre os mesmos fatores de virulência, através de mesmas técnicas, em uma cepa bacteriana sensível. Nesse contexto, os efeitos acima ressaltados estão diretamente relacionados ao mecanismo de interação do antimicrobiano com a célula bacteriana.

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.

ALBESA, I.; BECERRA, M. C.; BATTÁN, P. C.; PÁEZ, P. L. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 317, p. 605-609, 2004.

ALDSWORTH, T. G.; SHARMAN, R. L.; DODD, C. E. R. Bacterial suicide through stress. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 56, p. 378-383, 1999.

ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 718p.

AMOXICILLIN – compound summary (CID: 33613). PubChem Compound. In: PubMed. Bethesda (MD): National Library of Medicine, 2008. Base de Dados. Disponível em: <[http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=33613&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=33613&loc=ec_rcs)>.

Acesso em: 08 set. 2008.

ARCHER, G. L. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. **Clin. Infect. Dis.**, v. 26, p. 1179-1181, 1998.

---

\*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências: NBR 6023: 2002 Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

- BABIOR, M. B. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, p. 1464-1476, 1999.
- BABIOR, M. B. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 109, p. 33-44, 2000.
- BARNES, A. I.; HERRERO, I. L.; ALBESA, I. New aspect of the synergistic antibacterial action of ampicillin and gentamicin. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 26, p. 146-151, 2005.
- BECERRA, M. C.; ERASO, A. K.; ALBESA, I. Comparison of oxidative stress induced by ciprofloxacin and pyoverdine in bacteria and in leukocytes to evaluate toxicity. **Luminescence**, v. 18, p. 334-340, 2003.
- BECERRA, M. C.; PÁEZ, P. L.; LARÓVERE, L. E.; ALBESA, I. Lipids and DNA oxidation in *Staphylococcus aureus* as a consequence of oxidative stress generated by ciprofloxacin. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 285, n. 1-2, p. 29-34, 2006.
- BENTON, B. M.; ZHANG, J. P.; BOND, S.; POPE, C.; CHRISTIAN, T.; LEE, L.; WINTERBERG, K. M.; SCHMID, M. B.; BUYSSE, J. M. Large-scale identification of genes required for full virulence of *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 8478-8489, 2004.
- BERGT, C.; MARSCHKE, G.; PANZENBOECK, U.; HEINECKE, J. W.; MALLE, E.; SÄTTLER, W. Human neutrophils employ the myeloperoxidase/hydrogen peroxide/chloride system to oxidatively damage apolipoprotein A-I. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 3523-3531, 2001.
- BERNARDO, K.; PAKULAT, N.; FLEE, S.; SCHAITH, A.; UTERMÖHLEN, O.; KRUT, O.; MÜLLER, S.; KRONKE, M. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce

*Staphylococcus aureus* virulence factor expression. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 546-555, 2004.

BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN, J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 733-751, 1991.

BISOGNANO, C.; VAUDAUX, P.; ROHNER, P.; LEW, D. P.; HOOPER, D.C. Induction of fibronectin-binding proteins and increased adhesion of quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* by subinhibitory levels of ciprofloxacin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 1428-1437, 2000.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Lett.**, v. 24, p. 119-124, 1985.

BRAGA, P. C.; PIATTI, G. Favourable effects of sub-MIC rifloxacin concentrations in decreasing the pathogen-host cell adhesion. **Pharmacol. Res.**, v. 28, p. 11-19, 1993.

BRAGA, P. C.; DAL SASSO, M.; SALA, M. T. Sub-MIC concentrations of cefodizime interfere with various factors affecting bacterial virulence. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 45, p. 15-25, 2000.

BRAGA, P. C.; DAL SASSO, M.; BOVIO, C.; ZAVARONI, E.; FONTI, E. Effects of gatifloxacin on phagocytosis, intracellular killing and oxidant radical production by human polymorphonuclear neutrophils. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 19, p. 183-187, 2002.



BRONNER, S.; MONTEIL, H.; PRÉVOST, G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 28, p. 183-200, 2004.

BURLAK, C.; HAMMER, C. H.; ROBINSON, M. A.; WHITNEY, A. R.; MCGAVIN, M. J.; KREISWIRTH, B. N.; DeLEO, F. R. Global analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exoproteins reveals molecules produced *in vitro* and during infection. **Cell. Microbiol.**, v. 9, p. 1172-1190, 2007.

CHAMBERS, H. F. Antibióticos beta-lactâmicos e outros inibidores da síntese de parede celular. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005a. 991p.

CHAMBERS, H. F. Sulfonamidas, trimetoprima e quinolonas. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005b. 991p.

CIPROFLOXACIN – compound summary (CID: 2764). PubChem Compound. In: PubMed. Bethesda (MD): National Library of Medicine, 2008. Base de Dados. Disponível em: <[http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2764&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2764&loc=ec_rcs)>.

Acesso em: 08 set. 2008.

DAL SASSO, M.; CULICI, M.; BOVIO, C.; BRAGA, P. C. Gemifloxacin: effects of sub-inhibitory concentrations on various factors affecting bacterial virulence. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 21, p. 325-333, 2003.

DEDENT, A. C.; McADOW, M.; SCHNEEWIND, O. Distribution of protein A on the surface of *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 4473-4484, 2007.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 16-34, 2000.

DUNMAN, P. M.; MURPHY, E.; HANEY, S.; PALACIOS, D.; TUCKER-KELLOGG, G; WU, S.; BROWN, E. L.; ZAGURSKY, R. J.; SHLAES, D.; PROJAN, S. J. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by *agr* and/or *sarA* loci. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 7341-7353, 2001.

FOSTER, T. J. Immune evasion by Staphylococci. **Microbiology**, v. 3, p. 948-958, 2005.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 3. ed. New York: Wiley-Liss Inc, 1994. 486p.

FUENTES, F. IZQUIERDO, J.; MARTIN, M. M.; GOMEZ-LUZ, M. L.; PRIETO, J. Postantibiotic an sub-MIC effects of azitromycin and isepamicin against *Staphylococcus aureus* and *Echerichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v. 42, p. 414-418, 1998.

GEMMELL, C. G.; PETERSON, P. K.; SCHMELING, D. KIM, Y.; MATHEWS, J.; WANNAMAKER, L.; QUIE, P. G. Potenciation of opionization and phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* followin growth in presence of clindamycin. **J. Clin. Invest.**, v. 67, p. 1249-1256, 1981.

GEMMELL, C. G.; FORD, C. W. Virulence factor expression by gram-positive cocci exposed to subinhibitory concentrations of linezolid. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50, p. 665-672, 2002.

GOERKE, C.; KÖLLER, J.; WOLZ, C. Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, p. 171-177, 2006.

GUAN, L.; BLUMENTHAL, R. M.; BURNHAM, J. C. Analysis of macromolecular biosynthesis to define the quinolone-induced postantibiotic effect in *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 36, p. 2118-2124, 1992.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007-3017, 1998.

HAIR, P. S.; WARD, M. D.; SEMMES, O. J.; FOSTER, T. J.; CUNNION, K. M. *Staphylococcus aureus* clumping factor A binds to complement regulator factor I and increases factor I cleavage of C3b. **J. Infect. Dis.**, v. 198, p. 125-133, 2008.

HOWARD, B. M. A.; PINNEY, R. J.; SMITH, J. T. Contributions of post-antibiotic lag and repair-recovery to the pos-antibiotic effects of ciprofloxacin on *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. **Chemotherapy**, v. 39, p. 22-31, 1993.

HUSEBY, M.; SHI, K.,; BROWN, C. K.; DIGRE, J.; MENGISTU, F.; SEO, K. S.; BOHACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M.; OHLENDORF, D. H.; EARHART, C. A. Structure and biological activities of beta toxin from , *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 8719-8726, 2007.

JACOBS, M. R. Combating resistance: application of the emerging science of pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 30, p. S122-S126, 2007.

JANG, D.S.; KANG, B.S.; RYU, S. Y.; CHANG, I. M.; MIN, K. R.; KIM, Y. Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. **Biochem. Pharmacol.**, v. 57, p. 705-712, 1999.

JONGERIUS, I.; KÖHL, J.; PANDEY, M. K.; RUYKEN, M.; Van KESSEL, K. P. M.; Van STRIJP, J. A. G.; ROOIJAKKERS, S. H. M. Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 2461-2471, 2007.

KERNODLE, D. S.; MCGRAW, P. A.; BARG, N. L.; MENSIES, B. E.; VOLADRI, R. K.; HARSHMAN, S. Growth of *Staphylococcus aureus* with nafcillin in vitro induces alpha-toxin production and increases the lethal activity of sterile broth filtrates in a murine model. **J. Infect. Dis.**, v. 172, p. 410-419, 1995.

KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. A new cytotoxicity naphthoquinone from *Paepalanthus latipes*. **Chem. Pharm. Bull.**, v.52, p.1487-1488, 2004.

KOHANSKI, M.A.; DWYER, D. J.; HAYETE, B.; LAWRENCE, C. A.; COLLINS, J. J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. **Cell**, v. 130, p. 797-810, 2007.

KOSZCZOL, C.; BERNARDO, K.; KRÖNKE, M.; KRUT, O. Subinhibitory quinupristin/dalfopristin attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 58, p.564-574, 2006.

KURODA, M.; KURODA, H.; OSHIMA, T.; TAKEUCHI, F.; MORI, H.; HIRAMATSU, K. Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. **Mol. Microbiol.**, v. 49, p. 807-821, 2003.

KURODA, H.; KURODA, M.; CUI, L.; HIRAMATSU, K. Subinhibitory concentrations of  $\beta$ -lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 268, p. 98-105, 2007.

LABRO, M. T. Interference of antibacterial agents with phagocyte function: immunomodulation or “immuno-fairy tales”? **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 615-650, 2000.

LAPPONI, J.C. **Estatística: usando Excel 5 e 7**. 10. ed. São Paulo: Lapponi, 1997. 420p.

LEE, L. Y. L.; HÖÖK, M.; HAVILAND, D.; WESTSEL, R. A.; YONTER, E. O.; SYRIBEYS, P.; VERNACHIO, J.; ERIC L.; BROWN, E. L. Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. **J. Infect. Dis.**, v. 190, p. 571-579, 2004.

LEE, S. Y. Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of amoxicillin on *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus sanguis*. **J. Chemother.**, v. 12, p. 379-384, 2000.

LI, C. R.; LEE, S. W.; KONG, C. H. Correlation between bactericidal activity and postantibiotic effect for five antibiotics with different mechanisms of action. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 40, p. 39-45, 1997.

LI, D.; RENZONI, A.; ESTOPPEV, T.; BISOGNANO, C.; FRANCOIS, P.; KELLEY, W. L.; LEW, P. D.; SCHRENZEL, J.; VAUDAUX, P. Induction of fibronectin adhesins in quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* by subinhibitory levels of ciprofloxacin or by sigma B transcription factor activity is mediated by two separate pathway. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p. 916-924, 2005.

LIANG, X.; JI Y. Comparative analysis of staphylococcal adhesion and internalization by epithelial cells. **Methods Mol. Biol.**, v. 391, p. 145-151, 2007.

LICATA, L.; SMITH, C. E.; GOLDSCHIMIDT, R. M.; BARRETT, J. F.; FROSCO, M. Comparison of the postantibiotic and postantibiotic sub-MIC effects of levofloxacin and ciprofloxacin on *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus penumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, p. 950-955, 1997.

LINCOLN, J. A.; LEFKOWITZ, D. L.; CAIN, T.; CASTRO, A.; MILLS, K. C.; LEFKOWITZ, S. S.; MOGUILEVSKY, N.; BOLLEN, A. Exogenous myeloperoxidase enhances bacterial phagocytosis and intracellular killing by macrophages. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 3042-3047, 1995.

LOTZ, S.; STARKE, A.; ZIEMANN, C.; MORATH, S.; HARTUNG, T.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Beta-lactam antibiotic-induced release of lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* leads to activation of neutrophil granulocytes. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v. 27, p. 5-15, 2006.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **N. Eng. J. Med.**, v. 339, p. 520-532, 1998.

MENESTRINA, G.; SERRA, M. D.; PRÉVOST, G. Mode of action of  $\alpha$ -barrel pore-forming toxins of the staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin family. **Toxicon**, v. 39, p. 1661-1672, 2001.

MILATOVIC, D.; BRAVENY, I.; VERHOEF, J. Clindamycin enhances opsonization of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 24, p. 413-417, 1983.

MUNCKHOF, W. J.; GILES, C.; TURNIDGE, J. D. Post-antibiotic growth suppression of linezolid against Gram-positive bacteria. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 47, p. 879-883, 2001.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; Approved Standard – 6<sup>th</sup> ed. (M7 –A6), v. 23, n. 2. Wayne, PA, **NCCLS 2003**.

NICOLAU, D. P. Optimizing outcomes with antimicrobial therapy through pharmacodynamic profiling. **J. Infect. Chemother.**, v. 9, p. 292-296, 2003

NOVICK, R. P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 48, p. 1429-1449, 2003.

ODENHOLT-TORNQVIST, I.; LÖWDIN, E.; CARS, O. Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of roxithromycin, clarithromycin, and azithromycin on respiratory tract pathogens. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p. 221-226, 1995.

ODENHOLT, I. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 17, p. 1-8, 2001.

ODENHOLT, I.; LÖWDIN, E.; CARS, O. In vitro studies of the pharmacodynamics of teicoplanin against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecium*. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 9, p. 930-937, 2003.

OHLSEN, K.; ZIEBUHR, W.; KOLLER, K. P.; HELL, W.; WICHELHAUS, T. A.; HACKER, J. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 2817-2823, 1998.

PARIJ, N.; NAGY, A. M.; FONDU, P.; NÈVE, J. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of human neutrophils. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 352, p. 299-305, 1998.

PALMQVIST, N.; PATTI, J. M.; TARKOWSKI, A.; JOSEFSSON, E. Expression of staphylococcal clumping factor A impedes macrophages phagocytosis. **Microbes Infect.**, v. 6, p. 188-195, 2004.



PASMANS, F.; HERDT, P.D.; NEROM, A. V.; HAESEBROUCK, F. Induction of the respiratory burst in turtle peritoneal macrophages by *Salmonella muenchen*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 25, p. 159-168, 2001.

PESSOA, M. H. R.; DIAS, M. F. B. F. A test for the evaluation of ingestion by neutrophils. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, p. 573-574, 1987.

PETRI, W. A. JR. Penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos betalactâmicos. In: BURTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman e Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006a. 1821p.

PETRI, W. A. JR. Sulfonamidas, sulfametaxazol-trimetoprima, quinolonas e agentes para infecção do trato urinário. In: BURTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman e Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006b. 1821p.

PÖHLMANN-DIETZE, P.; ULRICH, M.; KISER, K. B.; DÖRING, G.; LEE, J. C.; FOURNIER, J.M.; BOTZENHART, K.; WOLTZ, C. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator *agr*, and bacterial growth phage. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 4865-4871, 2000.

ROOIJAKKERS, S. H. M.; VAN WAMEL, W. J. B.; RUYKEN, K. P. M.; VAN KESSEL, K. P. M.; VAN STRIJP, J. A. G. Anti-opsonic properties of staphylokinase. **Microbes Infect.**, v. 7, p. 476-484, 2005a.

ROOIJAKKERS, S. H. M.; RUYKEN, M.; ROSS, A.; MOHAMED, R. D.; PRESANIS, J. S.; SIM, R. B.; Van WAMEL, W. J. B.; Van KESSEL, K. P. M.; Van STRIJP, J. A. G. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 920-926, 2005b.

ROOIJAKKERS, S. H. M.; VAN KESSEL, K. P. M.; VAN STRIJP, J. A. G. Staphylococcal innate immune evasion. **Trends Microbiol.**, v. 13, p. 596-601, 2005c.

ROSKAMP, L.; PEGORARO, M.; LUZ, P. R.; CRESTANI, S.; VAZ, R. S. Uma revisão sobre receptores opsônicos e não opsônicos. **RUBS**, v.1, p.12-16, 2005.

SCAGLIONE, F.; PARABONI, L. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of antibacterials in the intensive care unit: setting appropriate dosing regimens. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 32, 294-301, 2008.

SERRANDER, L.; LARSSON, J.; LUNDQVIST, H.; LINDMARK, M. FÄLLMAN, M.; DAHLGREN, C.; STENDAHL, O. Particles binding  $\beta_2$ -integrins mediate intracellular production of oxidative metabolites in human neutrophils independently of phagocytosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1452, p. 133-144, 1999.

SILVA, I. M. **Avaliação de estímulos específicos no *burst* respiratório de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos de rato (*Rattus albinus norvegicus*), através das sondas quimiluminescentes luminol e lucigenina.** 2000. 107f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Influence of subinhibitory concentrations of plants essential oils on the production of enterotoxins A and B and  $\alpha$ -toxin by *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 1023-1027, 2004.

SONSTEIN, S. A.; BURNHAM, J. C. Effect of low concentrations of quinolone antibiotics on bacterial virulence mechanisms. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 16, p. 277-289, 1993.

SPANGLER, S. K.; LIN, G.; JACOBS, M. R.; APPELBAUM, P. C. Postantibiotic effect and postantibiotic sub-MIC effect of levofloxacin compared to those of ofloxacin, ciprofloxacin, erythromycin, azithromycin, and clarithromycin against 20 pneumococci. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 1253-1255, 1998.

SPANGLER, S. K.; BAJAKSOUZIAN, S.; JACOBS, M. R.; APPELBAUM, P. C. Postantibiotic effects of grepafloxacin compared to those of five other agents against 12 Gram-positive and -negative bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 186-189, 2000.

STEVENS, D. L.; MA, Y.; SALMI, D. B.; McINDOO, E.; WALLACE, R. J.; BRYANT, A. E. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin gene in methicillin-sensitive and methicillin-resistan *Staphylococcus aureus*. **J. Infect. Dis.**, v. 195, p. 202-211, 2007.

STITES, D. P. Clinical laboratory methods for detection of cellular immunity. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLOW, T. G. **Basic & Clin. Immunol.** 8. ed. Norwalk, Conn.: Appleton & Lange, 1994. p. 195-215.

TEGMARK, K.; KARISSON, A.; AVIRDSON, S. Identification and characterization of SarH1, a new global regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. **Mol. Microbiol.**, v. 37, p. 398-409, 2000.

TESSIER, P.R.; NIGHTINGALE, C. H.; NICOLAU, D.P. Postantibiotic effect of trovafloxacin against *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid and broth culture media. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 36, p. 241-247, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894p.

VAN BELKUM, A., KOOLS-SIJMONS, M.; VERBRUGH, H. Attachment of *Staphylococcus aureus* to eukaryotic cells and experimental pitfalls in staphylococcal adherence assays: a critical appraisal. **J. Microbiol. Methods**, v. 48, p. 19-42, 2002.

WADSTROM, T.; MOOLBY, R. Studies on extracellular proteins from *Staphylococcus aureus*. VII. Studies on -haemolysin. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 242, p. 308-320, 1971.

WINRAM, S. B.; JONAS, M.; CHI, E.; RUBENS, C. E. Characterization of group B streptococcal invasion of human chorion and amnion epithelial cells in vitro. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 4932-4941, 1998.

WORLITZSCH, D.; KAYGIN, H.; STEINHUBER, A.; DALHOFF, A.; BOTZENHART, K.; DÖRING, G. Effects of amoxicillin, gentamicin, and moxifloxacin on the hemolytic activity

of *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 196-202, 2001.

WU, Q.; WANG, Q. I.; TAYLOR, K. G.; DOYLE, R. J. Subinhibitory concentrations of antibiotics affect cell surface properties of *Streptococcus sobrinus*. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 1399-1401, 1995.

## **8. APÊNDICE**

### **8.1. *Staphylococcus aureus***

Os microrganismos liofilizados foram reidratados, seguindo as instruções fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), aliquotados e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para a realização dos experimentos, *S. aureus* foi cultivado em caldo Müller-Hinton, por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  e, posteriormente, em placa contendo ágar sangue de carneiro a 5%, a qual foi incubada por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .



Ministério da Saúde  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
 Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21045-900 -  
 Rio de Janeiro - RJ - Brasil  
 Tel: (0xx21) 573-1072 / 573-5624 / 573-2615 - Fax: (0xx21) 290-0915



## Laboratório de Materiais de Referência

Informe de bactéria de referência 31-jan-01

---

**MICROORGANISMO:** *Staphylococcus aureus*

**INCQS:** 00015

**ORIGEM:** ATCC 25923

**LOTE:** 0300015-a

**DATA DA LIOFILIZAÇÃO:** 22/03/00

**HISTÓRIA:** Cepa FDA Seattle 1945 ← F. Schoenknecht.

**ISOLAMENTO:** Isolamento clínico

**MEIO DE CULTURA INDICADO:** Trypticase Soy Agar (BBL 11043)

**TEMPERATURA (em Graus Celsius):** 37

**TEMPO DE INCUBAÇÃO(em horas):** 24

**RESPIRAÇÃO:** Aerobiose

**APLICAÇÃO:** Cepa de referência para testes de susceptibilidade em disco.

**SOROLOGIA:**

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS:**

**PRODUÇÃO DE TOXINAS:**

**OBSERVAÇÕES:**

**REFERÊNCIAS:** Code of Federal Regulations, Title 21, Part 460, 1987.



Bacteria

ATCC® Number: 25923™

Organism: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach deposited as *Staphylococcus aureus* Rosenbach

Designations: Seattle 1945

Isolation: clinical isolate

Depositor: FDA

History: ATCC <<--FDA<<--F.  
SchoenknechtBiosafety Level: 2

Shipped: freeze-dried

Growth ATCC medium 18: Trypticase soy

Conditions: agar

Temperature: 37.0°C

Duration: aerobic

Permits/Forms: In addition to the [MTA](#) mentioned above, other [ATCC and/or regulatory permits](#) may be required for the transfer of this ATCC material. Anyone purchasing ATCC material is ultimately responsible for obtaining the permits. Please [click here](#) for information regarding the specific requirements for shipment to your location.

[Related Products](#)

Cross  
References: Nucleotide (GenBank) : [AX110511](#) Sequence 1244 from Patent WO0123604.  
Nucleotide (GenBank) : [AX110995](#) Sequence 1728 from Patent WO0123604.  
Nucleotide (GenBank) : [Z16422](#) S.aureus dfrB gene for dihydrofolate reductase.  
Nucleotide (GenBank) : [U39769](#) Staphylococcus aureus 16S-23S ribosomal RNA spacer region.  
Nucleotide (GenBank) : [U02910](#) Staphylococcus aureus ATCC 25923 16S rRNA gene, partial sequence.  
Nucleotide (GenBank) : [AF053568](#) Staphylococcus aureus ATCC 25923 heat shock protein 60 gene, partial cds.  
Nucleotide (GenBank) : [AB047239](#) Staphylococcus aureus DNA, complete structure of cassette chromosome(SCC)-like element, strain:ATCC 25923.  
Nucleotide (GenBank) : [AX110511](#) Sequence 1244 from Patent WO0123604.  
Nucleotide (GenBank) : [AX110995](#) Sequence 1728 from Patent WO0123604.  
Nucleotide (GenBank) : [Z16422](#) S.aureus dfrB gene for dihydrofolate reductase.  
Nucleotide (GenBank) : [U39769](#) Staphylococcus aureus 16S-23S ribosomal RNA spacer region.  
Nucleotide (GenBank) : [U02910](#) Staphylococcus aureus ATCC 25923 16S rRNA gene, partial sequence.  
Nucleotide (GenBank) : [AF053568](#) Staphylococcus aureus ATCC 25923 heat shock protein 60 gene, partial cds.  
Nucleotide (GenBank) : [AB047239](#) Staphylococcus aureus DNA, complete structure of cassette chromosome(SCC)-like element, strain:ATCC [25923](#).

Comments: Comment: Incorrectly cited in previous editions of this catalog as identical to NCTC 6571.

Applications: CAMP test [[92819](#)] [[92820](#)]  
assay of wood smoke concentrate [[45999](#)] [[92138](#)]  
control strain [[21528](#)] [[21531](#)]  
control strain for identification [[92222](#)]  
detection of [[92257](#)] [[92294](#)] [[92381](#)] [[92394](#)] [[92395](#)]



	<p>evaluation of Mueller-Hinton agar [<a href="#">21524</a>] [<a href="#">21585</a>]  examination of dairy products [<a href="#">92552</a>]  media testing [<a href="#">21529</a>] [<a href="#">92325</a>] [<a href="#">92345</a>] [<a href="#">92390</a>] [<a href="#">92429</a>] [<a href="#">92430</a>] [<a href="#">92845</a>]  quality control strain [<a href="#">92096</a>] [<a href="#">92124</a>] [<a href="#">92138</a>] [<a href="#">92408</a>]  reference material [<a href="#">92316</a>] [<a href="#">92317</a>] [<a href="#">92318</a>] [<a href="#">92330</a>] [<a href="#">92331</a>]  susceptibility disc testing [<a href="#">21523</a>] [<a href="#">92224</a>] [<a href="#">92354</a>] [<a href="#">92355</a>]  susceptibility disc testing ampicillin [<a href="#">58588</a>]  susceptibility disc testing caryomycin  susceptibility disc testing cephalixin [<a href="#">45872</a>]  susceptibility disc testing cephaloglycin [<a href="#">45872</a>]  susceptibility disc testing cephaloridine cephalomycin [<a href="#">45872</a>]  susceptibility disc testing cephalothin [<a href="#">45872</a>]  susceptibility disc testing chloramphenicol [<a href="#">58588</a>]  susceptibility disc testing erythromycin [<a href="#">58588</a>]  susceptibility disc testing gentamicins gentamicin [<a href="#">58588</a>]  susceptibility disc testing kanamycin [<a href="#">58588</a>]  susceptibility disc testing novobiocin [<a href="#">58588</a>]  susceptibility disc testing tetracycline [<a href="#">58588</a>]  susceptibility testing [<a href="#">21525</a>] [<a href="#">21533</a>] [<a href="#">45871</a>] [<a href="#">90283</a>] [<a href="#">92219</a>] [<a href="#">92422</a>] [<a href="#">92423</a>]  [<a href="#">92424</a>]  CAMP test for <i>Listeria monocytogenes</i> [<a href="#">21557</a>]  quality control strain for Abbott, API, and Autobac products</p>
--	---

Related Products: also available as SafeTsource™: ATCC [25923NA](#)

References:	<p>21523: CLSI Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - 9th Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI M2-A9.</p> <p>21524: CLSI Protocols for Evaluating Dehydrated Mueller-Hinton Agar; Approved Standard. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI M6-A.</p> <p>21525: CLSI Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard - 7th Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI M7-A7.</p> <p>21528: CLSI Methodology for the Serum Bactericidal test: Approved Guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI M21-A.</p> <p>21529: CLSI Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard - 3rd Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI M22-A3.</p> <p>21531: CLSI Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI M26-A.</p> <p>21533: CLSI Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard - 2nd Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI M31-A2.</p> <p>21557: U.S. Food &amp; Drug Administration <i>Listeria monocytogenes</i>, CAMP test <i>In</i>: U.S. Food &amp; Drug Administration Bacteriological analytical manual 8th ed. Gaithersburg, MDAOAC International p. 10.09, 1995</p> <p>21585: US General Services Administration Mueller Hinton Medium, dehydrated. Washington, DC: US General Services Administration; Commercial Item Description A-A-50904A, 1986</p> <p>45871: . . WHO Expert Committee on Biological Standardization, 28th Report, WHO Tech. Rep. Ser. 610: 122-123, 1977.</p> <p>45872: . . Literature issued December 20, 1970 on Cephalothin Discs by Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN. : .</p> <p>45999: et al., Fretheim K. Influence of generation temperature on the chemical composition, antioxidative, and antimicrobial effects of wood smoke. J. Food Sci. 45: 999-1002 and 1007, 1980.</p> <p>58588: Boyle VJ, et al. Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high-concentration antimicrobial disks. Antimicrob. Agents Chemother. 3: 418-424, 1973. PubMed: <a href="#">4790600</a></p> <p>90283: CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards</p>
-------------	--

Institute; CLSI M100-S17, 2007

92096: Applied Biosystems MicroSeq Pharmaceutical Panel #1. :Applied Biosystems; MicroSeq

92124: API RAPIDEC Staph. : bioMerieux; API

92138: BD Phoenix Gram Positive PMIC and PMIC/ID. :BD Becton Dickinson; Phoenix

92219: CLSI Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI M31-S1.

92222: CLSI Abbreviated Identification of Bacteria and Yeast; Approved Guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI M35-A.

92224: CLSI Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI M42-A.

92257: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods, the CAMP Test. Washington, DC: US Food & Drug Administration; Bacteriological Analytical Manual Online Chapt. 10.F, 2003

92294: Identification of *L. monocytogenes* colonies from isolation agars. Washington, DC: American Public Health Association; APHA APHA2001-36.52, 2001

92316: Food microbiology. Method 2.15: Examination for specific organisms-- *Listeria monocytogenes* in dairy products. Sydney, NSW, Australia: Standards Australia; Standards Australia AS/NZS 1766.2.15:1998.

92317: Food microbiology. Method 2.16.1: Examination for specific organisms-- Food and animal feeding stuffs--Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*- Detection method. Sydney, NSW, Australia: Standards Australia; Standards Australia AS/NZS 1766.2.16.1:1998.

92318: Food microbiology. Method 5: Preparation of culture media, diluents and reagents. Sydney, NSW, Australia: Standards Australia; Standards Australia AS 1766.5-1994.

92325: Water microbiology. Method2: Culture media, diluents and reagents. Sydney, NSW, Australia: Standards Australia; Standards Australia AS 4276.2-1995.

92330: Water microbiology. Method 8: Faecal streptococci--Estimation of the most probable number(MPN). Sydney, NSW, Australia: Standards Australia; Standards Australia AS 4276.8-1995.

92331: Water microbiology. Method 9: Faecal streptococci -- Membrane filtration method. Sydney, NSW, Australia: Standards Australia; Standards Australia AS 4276.9-1995.

92345: Food microbiology. Method 12.3: Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)--Detection and MPN technique for low numbers. Sydney, NSW, Australia: Standards Australia; Standards Australia AS 5013.12.3:2004.

92354: Methods for Antimicrobial Dilution and Dick susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria: Proposed Guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI M45-A.

92355: Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI M49-A.

92381: Microbiology of food and animal feeding stuffs-- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)--Part3: Detection and MPN technique for low numbers. Geneva (Switzerland): International Organization for Standardization/ANSI; ISO ISO 6888-3:2003.

92390: Microbiology of food and animal feeding stuffs--Guidelines on preparation and production of culture media-- Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media.. Geneva (Switzerland): International Organization for Standardization/ANSI; ISO ISO 11133-2:2003.

92394: Microbiology of food and animal feeding stuffs--Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*--Part 1: Detection method. Geneva (Switzerland): International Organization for Standardization/ANSI; ISO ISO 11290-1:1996.

92395: Microbiology of food and animal feeding stuffs--Horizontal method for the

detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*-- Part 2: Enumeration method. Geneva (Switzerland): International Organization for Standardization/ANSI; ISO ISO 11290-2:1998.

92408: Applied Biosystems MicroSeq Food Panel #1. : Applied Biosystems; MicroSeq

92422: Medical microbiology; methods for the determination of susceptibility of pathogens (except mycobacteria) to antimicrobial agents: agar diffusion test.. Berlin, Germany: Deutsches Institut für Normung; DIN DIN 58940-3: 1989, 1989

92423: Medical microbiology -- Methods for the determination of susceptibility of pathogens (except mycobacteria) to antimicrobial agents-- Part 7: Determination of the minimum bactericidal concentration (MBC) with the aid of microdilution. Berlin, Germany: Deutsches Institut für Normung; DIN DIN 58940-7: 1994, 1994

92424: Medical microbiology: methods for the determination of susceptibility of pathogens (except mycobacteria) to antimicrobial agents; determination of MICs by agar dilution method. Berlin, Germany: Deutsches Institut für Normung; DIN DIN 58940-6: 1989, 1989

92429: Medical microbiology-- Culture media -- Part 3: Dip slides for microbiological urine analysis. Berlin, Germany: Deutsches Institut für Normung; DIN DIN 58942-3: 2003, 2003

92430: Medical microbiology-- Culture media -- Part 4: Transport systems for specimens containing bacteria. Berlin, Germany: Deutsches Institut für Normung; DIN DIN 58942-4: 2003, 2003

92552: Method 5.040: *Listeria monocytogenes* cultural method. Washington, DC: American Public Health Association; Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th edition 2004.

92819: Microbiology of food and animal feeding stuffs --- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* --- Part 1: Detection method, Annex B [BS 5763-18:1997]. London, UK: British Standards Institution; British Standard BS EN ISO 11290-1:1997.

92820: Microbiology of food and animal feeding stuffs --- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* --- Part 2: Enumeration method, Annex B. London, UK: British Standards Institution; British Standard BS EN ISO 11290-2:1998.

92845: Microbiology of food and animal feeding stuffs --- Guidelines on preparation and production of culture media --- Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media - Annex B: Recommended test microorganisms for commonly used culture media. London, UK: British Standards Institution; British Standard DD CEN ISO/TS 11133:2003.

## 8.2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 19/2007 – Animais em Pesquisa

Interessado: ELISABETH EYKO AOKI

Orientador: Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi

Projeto: Efeito da concentração sub-inibitória de amoxicilina e ciprofloxacina sobre alguns fatores relacionados à virulência de *Staphylococcus aureus*

### Parecer nº 02/2008 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considera o protocolo para uso de animais na pesquisa: Efeito da concentração sub-inibitória de amoxicilina e ciprofloxacina sobre alguns fatores relacionados à virulência de *Staphylococcus aureus*, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em junho de 2008.

Araraquara, 15 de fevereiro de 2008.

Profa. Dra. MARIA VIRGINIA C. SCARPA  
Coordenadora do CEP

### **8.3. Células McCoy B**

Células McCoy B, em meio Eagle adicionado de 10% de soro fetal bovino, foram adquiridas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. A manutenção da linhagem celular foi realizada semanalmente. As células foram tripsinizadas (2 mL de solução de tripsina 0,2% + Versene 0,02%), e 2 mL transferidos para uma nova garrafa contendo 8 mL de Eagle adicionado de soro fetal bovino (7,5%).



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
SEÇÃO DE CULTURAS CELULARES  
Av. Dr. Arnaldo, 355 – São Paulo-SP  
Telefone: 0xx(11)3068-29 10

### Linhagem Celular McCoy

**origem:** camundongo

**procedência:** Inglaterra

**passagem:** 269

**data de cultivo:** 26/01/04

**meio de cultura:** Meio mínimo essencial de Eagle em solução salina balanceada de Earle com 10% S.F.B + 0,1mM de aminoácidos não essenciais e 1,0mM de piruvato de sódio.

**características de crescimento:** -taxa de subcultivo recomendada:  
1:5 em intervalos de 72 horas  
-temperatura de crescimento: 37°C

**característica morfológica *in vitro*:** tipo fibroblástica

**controle microbiológico:** Esta linhagem é livre de contaminantes

#### **Informação ao cliente**

Ao receber a garrafa de células, observe-a ao microscópio para verificar sua viabilidade. Qualquer reclamação deverá ser feita imediatamente, sem a manipulação da mesma. Não aceitaremos reclamações posteriores, pois todas as garrafas destinadas à venda são controladas por 72 horas antes de serem entregues.



## Product Description

Before submitting an order you will be asked to read and accept the terms and conditions of ATCC's [Material Transfer Agreement](#) or, in certain cases, an MTA specified by the depositing institution.

Customers in Europe, Australia, Canada, China, Hong Kong, India, Japan, Korea, Macau, Mexico, New Zealand, Singapore, and Taiwan, R.O.C. must contact a [local distributor](#) for pricing information and to place an order for ATCC cultures and products.

## Cell Biology

ATCC® Number:	CRL-1696	Depositors:	CDC
Designations:	McCoy [McCoy B]	Shipped:	frozen
<a href="#">Biosafety Level:</a>	1	Growth Properties:	adherent
Medium & Serum:	<a href="#">See Propagation</a>	Morphology:	fibroblast
Organism:	Mus musculus (mouse)		

Source: Tissue: unknown  
Cell Type: fibroblast

Permits/Forms: In addition to the [MTA](#) mentioned above, other [ATCC and/or regulatory permits](#) may be required for the transfer of this ATCC material. Anyone purchasing ATCC material is ultimately responsible for obtaining the permits. Please [click here](#) for information regarding the specific requirements for shipment to your location.

Comments:	Little descriptive information about the origin of the McCoy cells appears in the literature. They were first mentioned by Pomerat, et al. [26143]. The cells were reported to have originated from the synovial fluid in the knee joint of a patient suffering from degenerative arthritis. In ca. 1965, Defendi, et al., showed that McCoy cells (designated McCoy A) were indeed human cells. However, another subline (designated McCoy B) was, in fact, of mouse origin and possessed marker chromosomes characteristic of strain L mouse fibroblasts. McCoy cells presumed to be human, but which actually are mouse cells, have been disseminated from laboratory to laboratory throughout the world. Initial interest in McCoy cells followed the demonstration by Gordon and Quan [PubMed ID: 14268619] and Gordon, et al., [PubMed ID: 4110420], that ionizing radiation (cobalt-60) greatly increased the susceptibility of McCoy cells to infection by chlamydia strains. A culture of the so-called McCoy cell line was received from the Centers for Disease Control, Cell Culture Department, Atlanta, GA in March, 1984. Documentation as to origin or passage history was not available. The cells have been used to propagate laboratory strains of the 15 recognized serotypes of Chlamydia trachomatis. The cell line has been satisfactory for
-----------	---

	<p>chlamydia growth for at least 43 passages at ATCC . The cells are susceptible to chlamydia strains, and can be used to propagate chlamydia.</p> <p>Tested and found negative for ectromelia virus (mousepox).</p>
Propagation:	<p>ATCC complete growth medium: The base medium for this cell line is ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential Medium, Catalog No. 30-2003. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 10%. Atmosphere: air, 95%; carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), 5% Temperature: 37.0°C</p>
Subculturing:	<p>Protocol:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Remove and discard culture medium.</li> <li>2. Briefly rinse the cell layer with 0.25% (w/v) Trypsin - 0.53 mM EDTA solution to remove all traces of serum which contains trypsin inhibitor.</li> <li>3. Add 2.0 to 3.0 ml of Trypsin-EDTA solution to flask and observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually within 5 to 15 minutes). Note: To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Cells that are difficult to detach may be placed at 37C to facilitate dispersal.</li> <li>4. Add 6.0 to 8.0 ml of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting.</li> <li>5. Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels.</li> <li>6. Incubate cultures at 37C.</li> </ol> <p>Subcultivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:2 to 1:4 is recommended Medium Renewal: 2 to 3 times per week</p>
Related Products:	<p>recommended serum: ATCC <a href="#">30-2020</a> Cell culture tested DMSO: ATCC <a href="#">4-X</a> Recommended medium (without the additional supplements or serum described under ATCC Medium): ATCC <a href="#">30-2003</a></p>
References:	<p>26143: Pomerat CM, et al. Irradiation of cells in tissue culture. I. Giant cell induction in strain cultures versus elements from primary explants. Z. Zellforsch. 47: 158-174, 1957. 26144: Gordon FB, Quan AL. Isolation of the trachoma agent in cell culture. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118: 354-359, 1965. PubMed: <a href="#">14268619</a> 26145: Gordon FB, et al. Effect of ionizing irradiation on susceptibility of McCoy cell cultures to Chlamydia trachomatis. Appl. Microbiol. 23: 123-129, 1972. PubMed: <a href="#">4110420</a> 33114: Yasin B, et al. Susceptibility of Chlamydia trachomatis to protegrins and defensins. Infect. Immun. 64: 709-713, 1996. PubMed: <a href="#">8641770</a></p>



#### 8.4 Procedência de meios de cultura e reagentes

**Acumedia Manufactures, Inc.:** Brain-Heart Infusion Broth (BHI) (7116)

**Cultilab:** Hemácias de carneiro, Soro fetal bovino

**Difco:** Mueller-Hinton Broth (211443)

**Instituto Adolfo Lutz:** Meio Eagle, Solução de tripsina-EDTA-versene.

**Mallinckrodt:** Dimethyl sulfoxide (DMSO), (Lote: B24H34)

**Merck:** ácido ortofosfórico, bicarbonato de sódio (NaCl), cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ), cloreto de magnésio hexahidratado ( $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ) cloreto de sódio (NaCl), fosfato dibásico de potássio trihidratado ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ ), fosfato dibásico de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), fosfato dibásico de sódio dihidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ), fosfato monobásico de sódio monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ), ácido clorídrico (HCl).

**Pharmacia Biotech:** Histopaque densidade 1077 (cod. 17-1440-02)

**Reagen:** fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

**Sigma-Aldrich:** Glycogen from oyster (No. G8751), *Nitroblue tetrazolium* (No. 6876), Neutral Red (3-amino-7-dimethylamino-2methylphenazine hydrochloride) (No. N4638), Luminol sodium salt (No. A4685), Zymosan A from *Saccharomyces cerevisiae* (No. Z4250).

## 8.5. Preparo de soluções e reagentes

### 8.5.1 – Solução salina tamponada (PBS) 25 vezes concentrada

#### Solução A

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O.....	27,400 g
água deionizada.....q.s.p.....	386 mL

#### Solução B

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O.....	7,875 g
água deionizada.....q.s.p.....	114 mL

Preparar, inicialmente, as soluções A e B. Após completa dissolução dos sais, misturar as 2 soluções e adicionar pouco menos de 500 mL de água deionizada. Ajustar o pH para 7,2 utilizando solução de NaOH 4N, completar o volume para 1000 mL e autoclavar (121°C, 15 min). Para o preparo da solução tamponada de uso (PBS 0,01 M), utilizar 40 mL de tampão estoque, 8,5 g de NaCl e completar o volume para 1000 mL utilizando água deionizada. Ajustar o pH, se necessário, e autoclavar (121°C, 15 min). Armazenar sob refrigeração (4-8°C).

### 8.5.2. – Tampão PBS Dulbecco (PBSD)

NaCl.....	8,00 g
KCl.....	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,20 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O.....	0,10 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O.....	0,10 g
Água deionizada.....q.s.p.....	1000 mL

Inicialmente, dissolver os quatro primeiros sais em, aproximadamente, 700 mL de água deionizada. Em outro recipiente dissolver o cloreto de cálcio e cloreto de magnésio em, aproximadamente, 200 mL de água. Adicionar, vagarosamente, essa solução ao conteúdo da primeira solução. Acertar o pH para 7,4, ajustar o volume para 1000 mL e esterilizar por filtração utilizando membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . Manter o tampão sob refrigeração (4 a 8°C). Para preparação do PBS-D sem cálcio não acrescentar  $\text{CaCl}_2$  à preparação.

#### **8.5.3. - Glicogênio de ostra a 5 mg/mL**

Suspender 0,05 g de glicogênio de ostra 10 mL de solução salina 0,85% estéril no momento da inoculação.

#### **8.5.4. – Suspensão de *zymosan* (35 mg/mL)**

Suspender 0,035 g de *zymosan* em 5 mL de água deionizada estéril e aquecer à ebulição em banho-maria até formação de uma pasta. Centrifugar por 1 minuto a 800 x g, desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 1 mL de tampão PBS-D. Aliquotar e manter à -20°C. Preparar suspensão de uso no momento da realização do ensaio quimiluminescente.

#### **8.5.5. – Solução $10^{-2}$ M de luminol-Na**

Dissolver 0,002 g de luminol sódico em 1 mL de tampão PBS-D. Aliquotar e armazenar, ao abrigo da luz, a -20°C. Preparar solução de uso no momento da realização do ensaio quimiluminescente.

## 8.6.

**Tabela 9** – Médias de absorvância da cultura teste e controle utilizadas na construção da Figura 5 para a determinação do efeito pós-antimicrobiano da concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$  CIM) de amoxicilina e de ciprofloxacino no crescimento de *S. aureus*

Tempo (min)	Controle <sup>1</sup> (Absorvância em 620nm)	Teste amoxicilina <sup>1</sup> (Absorvância em 620nm)	valor-P <sup>2</sup>	Teste ciprofloxacino <sup>1</sup> (Absorvância em 620nm)	valor-P <sup>2</sup>
0	0,173 ± 0,0029	0,170 ± 0,0031	> 0,05	0,170 ± 0,0028	> 0,05
30	0,190 ± 0,0025	0,171 ± 0,0031	< 0,05*	0,177 ± 0,0023	< 0,05*
60	0,232 ± 0,0034	0,175 ± 0,0024	< 0,05*	0,203 ± 0,0028	< 0,05*
90	0,295 ± 0,0052	0,182 ± 0,0027	< 0,05*	0,254 ± 0,0038	< 0,05*
120	0,361 ± 0,0089	0,200 ± 0,0037	< 0,05*	0,311 ± 0,0024	< 0,05*
150	0,434 ± 0,0093	0,226 ± 0,0035	< 0,05*	0,380 ± 0,0043	< 0,05*
180	0,516 ± 0,0127	0,261 ± 0,0015	< 0,05*	0,455 ± 0,0077	< 0,05*
210	0,611 ± 0,0176	0,303 ± 0,0028	< 0,05*	0,543 ± 0,0096	< 0,05*
240	0,690 ± 0,0178	0,348 ± 0,0036	< 0,05*	0,622 ± 0,010	< 0,05*
270	0,735 ± 0,0209	0,384 ± 0,0041	< 0,05*	0,678 ± 0,0117	< 0,05*
300	0,777 ± 0,0197	0,435 ± 0,0057	< 0,05*	0,716 ± 0,0159	< 0,05*
330	0,815 ± 0,0231	0,489 ± 0,0068	< 0,05*	0,761 ± 0,0198	< 0,05*
360	0,856 ± 0,0252	0,554 ± 0,0108	< 0,05*	0,806 ± 0,0267	< 0,05*
390	0,882 ± 0,0254	0,602 ± 0,0057	< 0,05*	0,830 ± 0,0138	< 0,05*
420	0,918 ± 0,0222	0,652 ± 0,0117	< 0,05*	0,863 ± 0,0305	< 0,05*
450	0,947 ± 0,0222	0,695 ± 0,0249	< 0,05*	0,869 ± 0,0251	< 0,05*
480	0,987 ± 0,0231	0,710 ± 0,0321	< 0,05*	0,888 ± 0,0232	< 0,05*
510	1,060 ± 0,0237	0,758 ± 0,0090	< 0,05*	0,968 ± 0,0012	< 0,05*
540	1,091 ± 0,0178	0,790 ± 0,0084	< 0,05*	1,005 ± 0,0248	< 0,05*
570	1,095 ± 0,0222	0,832 ± 0,0193	< 0,05*	1,027 ± 0,0187	< 0,05*
600	1,098 ± 0,0264	0,861 ± 0,0310	< 0,05*	1,062 ± 0,0249	< 0,05*
630	1,099 ± 0,0187	0,861 ± 0,0035	< 0,05*	1,083 ± 0,0356	> 0,05
660	1,113 ± 0,0216	0,895 ± 0,0295	< 0,05*	1,066 ± 0,0210	< 0,05*
690	1,107 ± 0,2538	0,927 ± 0,0036	< 0,05*	1,058 ± 0,0231	< 0,05*
720	1,102 ± 0,0276	0,934 ± 0,0031	< 0,05*	1,063 ± 0,0161	< 0,05*

<sup>1</sup> Valor apresentado como média ± desvio padrão

<sup>2</sup> Em relação ao controle e cultura bacteriana na presença de amoxicilina e ciprofloxacino (\*diferença estatisticamente significativa)

## 8.7.

**Tabela 10** – Efeito do sobrenadante de cultura de *S. aureus* crescidos na presença da concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$  CIM) de amoxicilina na viabilidade de células McCoy, através da técnica de vermelho neutro

Sobrenadante (diluição)	Viabilidade (%) Controle <sup>1</sup>	Viabilidade (%) Teste <sup>1</sup>	valor- <i>P</i> <sup>2</sup>
0	100	100	-
1:64	98,76 ± 6,66	88,79 ± 5,38	> 0,05
1:32	93,46 ± 11,74	82,63 ± 8,34	> 0,05
1:16	89,45 ± 12,19	74,30 ± 9,80	> 0,05
1:8	89,25 ± 7,95	74,55 ± 8,30	> 0,05
1:4	80,39 ± 14,79	73,65 ± 6,27	> 0,05
1:2	71,07 ± 6,29	53,15 ± 6,02	< 0,05*

<sup>1</sup> Valor apresentado como média ± desvio padrão

<sup>2</sup> Obtido através da comparação da IME do controle e do teste

\* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

**Tabela 11-** Efeito do sobrenadante de cultura de *S. aureus* crescidos na presença da concentração subinibitória ( $\frac{1}{2}$  CIM) de ciprofloxacino na viabilidade de células McCoy, através da técnica de vermelho neutro

Sobrenadante (diluição)	Viabilidade (%) Controle <sup>1</sup>	Viabilidade (%) Teste <sup>1</sup>	valor- <i>P</i> <sup>2</sup>
0	100	100	-
1:64	93,96 ± 8,67	83,66 ± 2,98	> 0,05
1:32	85,35 ± 5,12	82,11 ± 5,97	> 0,05
1:16	80,14 ± 4,91	83,27 ± 2,03	> 0,05
1:8	77,37 ± 3,69	77,42 ± 2,17	> 0,05
1:4	65,15 ± 4,55	62,29 ± 3,28	> 0,05
1:2	41,26 ± 4,80	27,81 ± 2,30	< 0,05*

<sup>1</sup> Valor apresentado como média ± desvio padrão

<sup>2</sup> Obtido através da comparação da IME do controle e do teste

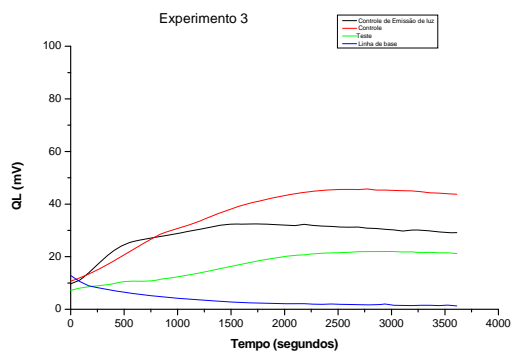
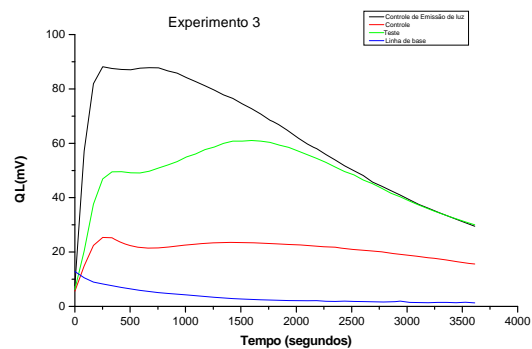
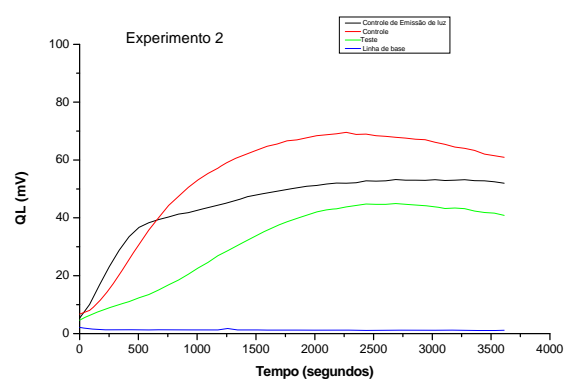
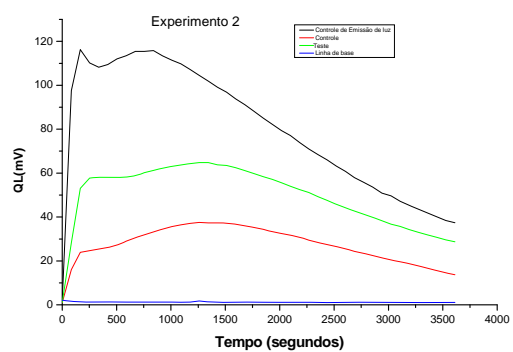
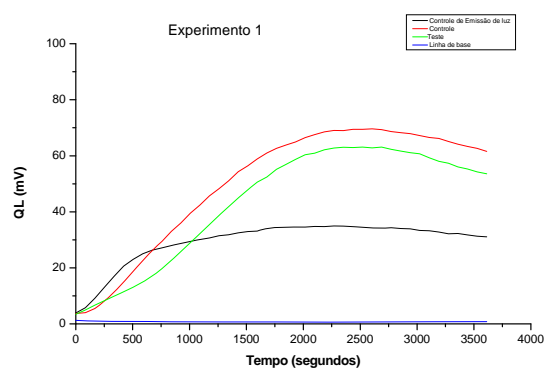
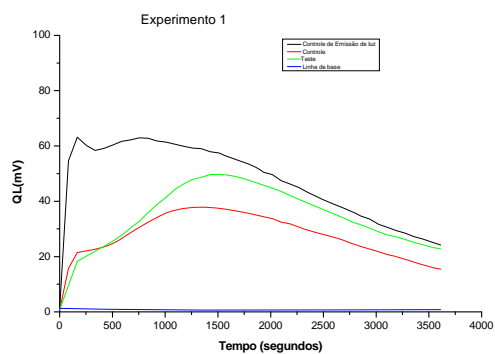
\* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

## 8.8. Cinética dos ensaios quimiluminescentes

### 8.8.1. Amoxicilina

#### Fagocitose de *S. aureus* opsonizados

#### Fagocitose de *S. aureus* não opsonizados



### 8.8.2. Ciprofloxacino

#### Fagocitose de *S. aureus* opsonizados

#### Fagocitose de *S. aureus* não opsonizados

