

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

Thais Graziela Donegá França

Efeito da desnutrição protéico-calórica experimental na resposta imune e na susceptibilidade à infecção por *Staphylococcus aureus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral e Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza Cunha

BOTUCATU – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

França, Thais Graziela Donegá.

Efeito da desnutrição protéico-calórica experimental na resposta imune e na susceptibilidade a infecção por *Staphylococcus aureus* / Thais Graziela Donegá França. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2009.

Orientadora: Alexandrina Sartori

Co-orientadora: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza Cunha

Assunto CAPES: 21100004

1. Imunologia - Aspectos nutricionais – Estudos experimentais 2. *Staphylococcus aureus* 3. Resposta imune

CDD 616.0479

Palavras-chave: Camundongos BALB/c; Desnutrição; Infecção; Resposta imune; *Staphylococcus aureus*

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

Leonardo da Vinci

Dedico este trabalho,

Ao meu esposo Luis Gustavo, pelo carinho, compreensão, companheirismo e incentivo. Você me fortalece para que eu consiga conquistar meus sonhos e me traz tranqüilidade para enfrentar as dificuldades. Amo você...

Aos meus pais Alceu e Maria Rosilei, exemplos de persistência e dedicação, pelo amor, apoio e pela compreensão em todos os momentos de minha vida. Tenho por vocês imensa gratidão por tudo que me deram com muito amor e carinho, que muitas vezes deixaram seus sonhos de lado, para ajudar a conquistar os meus.

Agradeço especialmente,

À minha orientadora Alexandrina Sartori, que mesmo sem me conhecer me acolheu e confiou em mim. Pelos valiosos ensinamentos, pela paciência e disponibilidade que possibilitou a realização desse trabalho. Enfim, agradeço pela imensurável contribuição para minha formação profissional e por me incentivar a querer sempre mais.

À minha co-orientadora Profa Dra Maria de Lourdes Ribeiro de Souza Cunha, pelos valiosos ensinamentos, pela disponibilidade, pela tranquilidade e sutileza na execução deste trabalho.

Muito obrigada!

Agradeço,

Primeiramente a Deus, pois sem ele nada seria possível.

Às minhas companheiras e grandes amigas de pesquisa, Fernanda, Sofia, Larissa e Magda, pelo auxílio imensurável para realização deste trabalho e pelos momentos agradáveis proporcionados.

Aos meus companheiros de pesquisas, Clara, Nelson e Douglas e aos mais novos integrantes, Raphael, Larissa e David pela contribuição valiosa na realização desse trabalho. Tenho muito orgulho de dizer que somos uma verdadeira equipe.

Às minhas amigas Fabiane e Tatiane, pelos agradáveis momentos de descontração proporcionados.

A todos os meus familiares pelo valioso apoio.

À Prof. Dr. Ramon Kaneno e o Prof. Dr. Anderson Navarro pelas valiosas sugestões durante meu exame de qualificação.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia pela grandiosa contribuição para a minha formação profissional.

Aos pós-graduandos do Departamento de Microbiologia e Imunologia pelo apoio e pelo conhecimento compartilhado.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial ao Lula, pela preciosa ajuda no manuseio dos animais do biotério e ao Luiz, pelas coletas de soro e preparo de soluções.

À Seção de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências de Botucatu, especialmente à Luciene, Maria Helena, Sergio e Herivaldo pela atenção sempre dispensada.

Aos funcionários da biblioteca da UNESP de Botucatu, especialmente à Selma e Luciana, pela correção das referências bibliográficas.

Enfim, a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e para minha formação profissional.

Muito obrigada !!!

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de abreviaturas

1. Introdução	21
1.1. Tipos de desnutrição.....	21
1.2. Alterações imunológicas na desnutrição	22
1.3. Desnutrição e infecção	25
1.4. Modelos experimentais	26
1.5. <i>Staphylococcus aureus</i> : características gerais, infecção e resposta imune.....	27
2. Objetivos	31
2.1. Objetivo Geral	31
2.2. Objetivos Específicos	31
3. Material e Métodos	33
3.1. Delineamento experimental geral	33
3.2. Animais	33
3.3. Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
3.4. Imunização com eritrócitos de carneiro (EC).....	34
3.5. Reação de hemaglutinação	34
3.6. Imunização com antígeno de <i>S. aureus</i>	34
3.6.1. Imunização de antígeno formolizado (AgF)	34
3.6.2. Imunização de antígeno solúvel (AgS)	35
3.7. Dosagem de proteínas, triglicerídeos e colesterol	35
3.8. Obtenção de antígeno solúvel de <i>Staphylococcus aureus</i>	36
3.9. ELISA para detecção de anticorpos anti- <i>S. aureus</i>	36
3.10. Infecção por <i>Staphylococcus aureus</i>	37
3.11. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	37
3.12. Cultura de células	37
3.13. ELISA para detecção de citocinas	38
3.14. Análise histopatológica	38
3.15. Análise estatística	39
4. Protocolos Experimentais e Resultados	41
4.1. Protocolo Experimental I	41

4.1.1. Resultados Protocolo Experimental I	42
4.2. Protocolo Experimental II	53
4.2.1. Resultados Protocolo experimental II	54
4.3. Protocolo Experimental III.a.....	55
4.3.1. Resultados Protocolo Experimental III.a	56
4.4. Protocolo Experimental III.b	59
4.4.1. Resultados Protocolo Experimental III.b	60
4.5. Protocolo Experimental III.c	64
4.5.1. Resultados Protocolo Experimental III.c	65
5. Discussão	69
6. Conclusões	76
7. Referências Bibliográficas	78
8. Anexos	87
8.1. Comitê de Ética	87
8.2. Manuscrito	88

Resumo

A desnutrição diminui a eficácia da resposta imune aumentando a susceptibilidade aos agentes infecciosos. O principal tipo de deficiência nutricional é a desnutrição protéico-calórica (DPC). A restrição alimentar experimental é utilizada como modelo de estudo para a DPC. Neste contexto, os objetivos principais deste trabalho foram caracterizar um modelo murino de DPC e avaliar seu efeito na susceptibilidade e na imunidade protetora ao *Staphylococcus aureus*. Foram testados três percentuais de restrição alimentar (10, 20 e 30%) em camundongos BALB/c e a restrição de 20% determinou as seguintes alterações as quais são condizentes com um estado de subnutrição: queda significativa de peso corporal e número de linfócitos, alteração na produção de citocinas e atrofia no timo e epitélio intestinal. A comparação do grau de susceptibilidade e da capacidade de montar uma resposta imune protetora ao *S. aureus* foi realizada através de duas metodologias: determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) em alguns órgãos e análise histopatológica do tecido pulmonar. Os resultados foram distintos dependendo da metodologia empregada. Quanto à susceptibilidade ao patógeno, a técnica de UFC indicou susceptibilidade similar nos grupos normal e subnutrido, enquanto que a análise histopatológica indicou maior quantidade de bactérias no pulmão dos animais normais. O processo de imunização controlou eficazmente a multiplicação bacteriana no pulmão dos animais normais, mas não dos animais subnutridos. A análise histopatológica também mostrou perfis inflamatórios distintos nestes 2 grupos: camundongos normais apresentaram inflamação pulmonar só após infecção com *S. aureus*, como esperado, e a imunização prévia com antígenos de *S. aureus* preveniu esta inflamação. Por outro lado, camundongos subnutridos já apresentavam inflamação pulmonar antes da infecção e o aspecto deste infiltrado inflamatório não foi alterado pela infecção com *S. aureus* ou pela imunização realizada antes desta infecção.

A análise conjunta destes dados mostra que camundongos BALB/c submetidos a uma restrição alimentar de 20% desenvolvem alterações condizentes com imunodeficiência associada com subnutrição. Além disto, os dados sugerem que a análise histopatológica feita pela coloração de Gram em tecidos indicaria de forma mais fidedigna o grau de multiplicação bacteriana. Neste caso, a análise do tecido pulmonar mostrou menor carga bacteriana nos animais subnutridos.

Palavras-chave: desnutrição, infecção, *Staphylococcus aureus*, camundongos BALB/c, resposta imune.

Abstract

Undernutrition is one of the most relevant causes of secondary immunodeficiency. The main type of nutritional deficiency is called protein energy malnutrition (PEM). Animals submitted to different degrees of food restriction can be used as models of PEM. In this context, this work was done to establish a murine experimental model for PEM and to evaluate the effect of malnutrition on both, susceptibility and ability to mount a protective immunity against *Staphylococcus aureus*. BALB/c mice were therefore submitted to three distinct percentages of dietary restriction (10, 20 and 30%). The 20% restricted diet determined the following alterations that characterize a state of malnutrition: a significant decrease in both, body weight and lymphocyte number, alteration in cytokine production and atrophy in thymus and intestinal epithelium. Two methodologies were used to compare susceptibility and ability to mount a protective immunity: determination of the number of colony forming units (CFU) in some organs and histopathological analysis of the lungs. Results varied according to the methodology. CFU indicated a similar susceptibility whereas the histopathological analysis showed a higher amount of bacteria in the lungs of normal mice. Immunization controlled bacterial growth in the lungs of normal mice but not in the ones from undernourished animals. Histopathological analysis also revealed distinct inflammatory scenarios: inflammation appeared in lungs from normal mice only after infection with *S. aureus* and immunization prevented lung inflammation in the animals. On the other hand, undernourished mice presented lung inflammation even before infection. In addition, the degree of this inflammatory process did not change with infection or previous immunization.

Together, this data demonstrates that BALB/c mice submitted to 20% food restriction developed alterations that are typically described in malnutrition. In addition, the findings related to histopathological data (Gram stain) would be a better parameter than CFU to indicate the bacterial load. In this case, lung analysis showed a smaller bacterial load in undernourished mice.

Key words: undernutrition, infection, *S. aureus*, BALB/c mice, immune response.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACF: adjuvante completo de Freund
- Acs: anticorpos
- AgF: antígeno formolizado
- AgS: antígeno solúvel
- ANOVA: análise de variância
- APC: célula apresentadora de antígeno
- BCA: bicinchoninic acid protein assay Kit
- BHI: brain heart infusion
- CD: marcadores de diferenciação de células humanas
- ConA: concanavalina A
- DO: densidade óptica
- DPC: desnutrição protéico-calórica
- EC: eritócito de carneiro
- EE: enterotoxinas
- ELISA: ensaio imunoenzimático
- EPM: erro padrão da média
- FAO: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
- HIV: vírus da imunodeficiência humana
- IFN- γ : interferon-gama
- Igs: imunoglobulinas
- IL: interleucinas
- ip: via intraperitoneal
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- OPD: ortofenilenodiamina
- PBS: solução salina tamponada com fosfato
- RA: restrição alimentar
- RPMI: meio líquido para cultura de células (Roswell Park Memorial Institute)
- sc: via subcutânea
- Tc: célula T citotóxica
- Th: célula T helper
- Th1: linfócitos T auxiliares subpopulação 1
- Th2: linfócitos T auxiliares subpopulação 2

- TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
- TSST-1: toxina 1 da síndrome do choque tóxico
- UFC: unidade formadora de colônia

1 – INTRODUÇÃO

1.1- Tipos de desnutrição

A desnutrição pode ocorrer como consequência de uma deficiência energética (desnutrição protéico-calórica-DPC) ou de um micronutriente. Seja qual for a causa, ela é considerada um dos fatores mais relevantes de doença e óbito em países em desenvolvimento, afetando particularmente crianças e gestantes (Müller & Krawinkel, 2005). Isto ocorre em grande parte por que a desnutrição resulta em imunodeficiência e consequentemente em uma maior susceptibilidade aos agentes infecciosos (Pelletier et al., 1994).

Estimativas feitas em 2000 - 2002 indicavam a existência de 852 milhões de pessoas desnutridas, entretanto, dados recentes publicados pela Organização das Nações Unidas da Agricultura e Alimentação (FAO) mostram que este número aumentou para 963 milhões entre os anos de 2007 - 2008. Deste número total de pessoas desnutridas, estima-se que 815 milhões vivam em países em desenvolvimento, particularmente no sul da Ásia e África subsaariana (OMS, 2002; Müller & Krawinkel, 2005; FAO, 2008).

A desnutrição por si só pode ser causa de morte (Stephen et al., 2002), entretanto dados epidemiológicos revelam que sua relação com maior mortalidade se deve ao fato da mesma aumentar a susceptibilidade aos agentes infecciosos e também a gravidade destas infecções (Rice et al., 2000; Black, 2003). A desnutrição é a causa direta de 300.000 mortes por ano e é indiretamente responsável por metade de todas as mortes em crianças pequenas (Black et al., 2003). Esta correlação direta entre índices mais elevados de desnutrição com maior mortalidade tem sido claramente demonstrada em várias publicações (Chen et al., 1980; van den Broek et al., 1993).

Entre os principais fatores responsáveis pela desnutrição se destacam pobreza, instabilidade socioeconômica e política, condições sanitárias precárias, costumes alimentares e religiosos, hábitos de amamentação e eficácia dos programas voltados para nutrição (Müller & Krawinkel, 2005; Schaible & Kaufmann, 2007).

A relação casual entre desnutrição e supressão da resposta imune, o que facilita as infecções, é também agravada pelo efeito acentuado de muitas infecções no próprio estado nutricional. Por exemplo, parasitas gastrointestinais podem desencadear diarreia, anemia e consequente privação de nutrientes (Agarwal et al., 2008; Katona & Katona, 2008, Chong, 2008). Está também bem estabelecido que aids, tuberculose e outras infecções crônicas causam caquexia e anemia (Agarwal et al., 2008; Chong, 2008).

A DPC em crianças é definida pela relação entre peso, idade e altura. São consideradas subnutridas as crianças que apresentam valores menores do que 2 desvios-padrão nas seguintes relações: peso/idade (baixo peso-*underweigh*), altura/idade (crescimento retardado-*stunting*) e peso/altura (*wasting*). De todas as crianças com idade até 5 anos que moram em países em desenvolvimento, 31% sofrem de baixo peso, 38% apresentam retardo no crescimento e 9% apresentam “*wasting*” (perda rápida de peso) (Müller & Krawinkel, 2005). A desnutrição grave é observada principalmente em crianças e se manifesta como “*marasmus*” (*severe wasting*), *Kwashiorkor* marasmático (*severe wasting* com edema) e *Kwashiorkor* (desnutrição com edema) (Willians et al., 2003). O marasmo é diagnosticado quando ocorre perda da gordura subcutânea e da camada muscular, indicando portanto, que toda a energia e nutrientes endógenos já foram consumidos. Clinicamente o mesmo é caracterizado por face triangular, amenorréia primária ou secundária, abdome distendido e prolapso rectal ou anal (Bhan et al., 2003). O *Kwashiorkor* normalmente se manifesta com edemas, alterações na cor do cabelo e da pele, anemia, hepatomegalia, letargia, imunodeficiência grave e morte prematura (Phillips et al., 1993; Oumeish & Oumeish, 2003).

A DPC grave é caracterizada tipicamente pela ocorrência de degeneração gordurosa em vários órgãos incluindo fígado e coração, causando insuficiência cardíaca subclínica ou até mesmo insuficiência grave que necessita atendimento urgente. Também pode ocorrer perda de gordura subcutânea o que reduz de forma acentuada a capacidade do organismo de regular a temperatura e os estoques de água podendo determinar desidratação, hipotermia e hipoglicemia (Sakurada et al., 2000; Alam et al., 2003; de Mello et al., 2003). A DPC está também associada com atrofia do intestino delgado o que desencadeia diminuição na capacidade tanto de digestão quanto de absorção (Lenaerts et al., 2006; Vidueiros et al., 2008).

1.2- Alterações imunológicas na desnutrição

As imunodeficiências decorrentes de defeitos genéticos ou ocorridos durante o desenvolvimento ontogenético são denominadas primárias. As secundárias ou adquiridas se referem àquelas em que a perda da função imunológica resulta de uma variedade de fatores extrínsecos. A causa mais conhecida de imunodeficiência secundária é a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), porém, a causa mais prevalente de imunodeficiência no mundo é a desnutrição grave a qual chega a afetar até 50% da população em países pobres. As alterações imunológicas resultantes da desnutrição afetam

tanto a imunidade inata quanto a específica. Por exemplo, a disponibilidade de componentes do sistema complemento e a função fagocítica estão comprometidas na subnutrição e isto afeta diretamente a eliminação dos patógenos. Isto ocorre porque o sistema complemento pode destruir diretamente bactérias e vírus e também porque os receptores para fragmentos de componentes deste sistema, os quais se encontram na superfície das células fagocíticas, auxiliam na captura de patógenos. Tanto o nível de C3, que é o principal componente opsônico, quanto a capacidade dos fagócitos de internalizar e destruir patógenos, encontram-se reduzidos em estados de desnutrição (Sakamoto et al., 1998; Chandra, 2002).

A desnutrição protéica grave está claramente associada com atrofia nos órgãos linfóides primários (medula óssea e timo) em recém-nascidos e crianças pequenas. As consequências são devastadoras porque estes órgãos são justamente os geradores do repertório de linfócitos B e T. A desnutrição afeta a hematopoiese, determinando anemia, leucopenia, redução acentuada na medula óssea e também redução na síntese de IL-6 e TNF- α por células da medula óssea (Fock et al., 2007). A atrofia do timo está associada com redução nítida no número de células presentes neste órgão e também afeta o desenvolvimento dos órgãos linfóides periféricos (Savino, 2002). A consequência imediata desta atrofia é a leucopenia, relação CD4/CD8 diminuída e aumento no número de células T imaturas no sangue periférico. A alteração ocorrida no timo tem sido estudada com maior detalhamento em modelos experimentais. Por exemplo, tem sido demonstrado que atrofia é, em parte, causada pela depleção por apoptose que afeta principalmente células TCD4⁺ e TCD8⁺ imaturas (Ahima et al., 1996). Alterações morfológicas nas células epiteliais tímicas também têm sido descritas e associadas com produção menor de hormônios tímicos. A desnutrição também afeta de forma acentuada a resposta imune associada com as barreiras epiteliais determinando, principalmente, achatamento e hipotrofia das vilosidades intestinais, redução no número de linfócitos presentes nas placas de Peyer e redução na secreção de IgA (Beisel, 1996).

A apresentação de antígenos aos linfócitos T é uma etapa fundamental durante a indução e regulação tanto da resposta imune humoral quanto celular (Mellman & Steinman, 2001). Os três tipos celulares principais envolvidos neste processo de apresentação antigênica são os linfócitos B, os macrófagos e as células dendríticas sendo que as últimas são estudadas de forma mais sistemática durante a desnutrição. Vários estudos mostram que, de forma geral, a atividade biológica das diferentes APCs está claramente comprometida durante as deficiências nutricionais (Redmond et al., 1991; Petro

et al., 1994; Honda et al., 1995; Stapleton et al., 2001). Existe na literatura um consenso geral de que diferentes aspectos, tais como número de células dendríticas, produção de citocinas e capacidade de desencadear proliferação de linfócitos T de memória estejam significativamente afetadas durante a subnutrição (Abe et al., 2003). Recentemente foi demonstrado que a transferência adotiva de células dendríticas restaurou a resposta imune celular em camundongos desnutridos (Hillyer et al., 2008).

Existe também uma concordância geral na literatura de que déficit protéico, energético ou ambos, determinam imunossupressão mais acentuada na resposta imune celular do que na humoral. Por exemplo, os níveis de imunoglobulinas (Igs) tipo Th2 (IgG1 e IgE) encontram-se elevados em camundongos submetidos à desnutrição aguda enquanto que os níveis das Igs do tipo Th1 (IgG2a e IgG3) não foram afetados (Neyestani & Woodward, 2005). Resultados similares foram descritos em modelo experimental de deficiência de vitamina A no qual foi constatado, após exposição inicial ao antígeno, aumento significativo de células T (Th2 ou T reguladoras) produtoras de IL-10 associado a uma queda no desenvolvimento de células Th1 de memória (Stephensen et al., 2004). Recentemente, Sakai et al. (2006), corroboraram com este tipo de resultado, demonstrando que a deficiência protéica diminuiu a proliferação de células T específicas mas não a ativação de células B específicas em camundongos inoculados com vacina gênica.

O processo de ativação dos linfócitos T parece ser um dos principais mecanismos que impedem a ativação completa da imunidade durante a desnutrição. Está bem estabelecido que os canais de potássio são vitais para a ativação de células T. Neste sentido, Fernández et al. (2005), relataram alterações significativas neste processo em linfócitos de ratos desnutridos. Também tem sido constatado que ratos desnutridos apresentam subpopulações reduzidas de linfócitos TCD3⁺ e TCD4⁺ juntamente com redução na expressão de moléculas associadas com o processo de ativação e proliferação como é o caso de CD25 e CD71 (Cortés-Barberema et al., 2008). Esta ativação comprometida de células T tem sido claramente associada com baixa produção de citocinas, as quais são os principais mediadores moleculares da imunidade. Isto ficou claramente evidenciado em crianças desnutridas nas quais ocorreu redução acentuada na produção de citocinas do tipo Th1 (IL-2 e IFN- γ) (Rodríguez et al., 2005).

1.3- Desnutrição e Infecção

A relação entre desnutrição e infecção foi inicialmente descrita por Scrimshaw et al. (1990). A partir deste trabalho foram realizadas várias investigações que comprovaram de forma definitiva maior índice de mortalidade ocasionada por infecções em crianças desnutridas. As doenças infecciosas de maior incidência em crianças subnutridas são tuberculose, sarampo, doenças infecciosas causadas por parasitas intestinais, malária e noma (Enwonwu et al., 2006). O estudo realizado por Man et al. (1998), o qual incluiu um número bastante elevado de crianças hospitalizadas, ilustra de forma evidente a incidência maior de mortalidade por doenças infecciosas em crianças com baixo peso.

Um terço da população mundial está infectada com o *Micobacterium tuberculosis* e esta é considerada a causa mais importante de morte causada por agentes infecciosos (Young & Duncan, 1995; Flynn & Chan, 2001). Esta infecção é particularmente influenciada pela desnutrição e é a causa principal de morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento nos quais a DPC é também prevalente (Udani, 1994). Dados em modelos experimentais corroboram com este achado em populações humanas (Cegielski & McMurray, 2004). Um trabalho bastante recente indicou que baixos níveis séricos de vitamina D estavam associados com maiores riscos de desenvolvimento de tuberculose ativa (Nnoaham & Clarke, 2008). Um aspecto interessante no caso desta infecção é que a evolução da mesma é caracterizada por um processo inflamatório crônico que acentua a desnutrição causando um quadro típico de caquexia. Isto tem sido atribuído a anticorpos IgG1 os quais aumentariam a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 (Hussain et al., 2001). Recentemente surgiu a hipótese de que a desnutrição possa contribuir, juntamente com um esquema terapêutico mal implementado e co-infecção pelo HIV, para o aparecimento de cepas de *Micobacterium tuberculosis* multi-drogas resistentes, de forma similar ao fenômeno descrito para vírus (Beck, 2007).

O sarampo é outra infecção afetada pela desnutrição e em especial pela deficiência de vitamina A (Perry & Halsey, 2004). Evidências experimentais indicam que a suplementação com vitamina A está associada com redução de 23 a 30% em ambos, gravidade da doença e risco de mortalidade. Por esta razão, a OMS recomenda administração de uma dose oral de vitamina A em crianças com sarampo que residam em áreas com deficiência desta vitamina (Huiming et al., 2005).

Desnutrição e parasitismo intestinal também apresentam distribuição geográfica similar, sendo que, os mesmos indivíduos apresentam as duas doenças simultaneamente (Pelletier et al., 1994). Neste caso a relação casual é claramente bi-direcional, ou seja, a

desnutrição aumenta a suscetibilidade à infecção e a infecção determina aumento no grau de desnutrição (Scrimshaw & SanGiovanni, 1997). Nematódeos intestinais determinam desnutrição porque causam anorexia e uma variedade de alterações no trato gastrointestinal tais como vômitos, diarreia e má absorção. Em conjunto, estas alterações afetam deletariamente a capacidade do hospedeiro de obter quantidades adequadas de nutrientes a partir da dieta (Koski & Scott, 2001).

Existe também um consenso geral de que a DPC esteja associada com maior morbidade e mortalidade nos casos de malária humana (Shankar, 2000). Por exemplo, tem sido demonstrado por ensaios clínicos que a suplementação com vitamina A ou zinco reduzem, de forma significativa, a reincidência de malária (Shankar, 2000; Caulfield et al., 2004). Por outro lado, o efeito de certos micronutrientes como é o caso do ferro, é ainda contraditório (Caulfield et al., 2004; Prentice et al., 2008).

Noma é uma infecção oportunista caracterizada por uma inflamação gengival que evolui rapidamente para uma gangrenose orofacial mutilante que é associada com pobreza extrema. Resulta de interações complexas entre desnutrição, infecção e imunidade comprometida e é, frequentemente, precedida por malária, sarampo e gengivite ulcerativa necrosante (Enwonwu et al., 2006).

1.4- Modelos experimentais

Os estudos sobre os tipos e graus das diferentes deficiências nutricionais foram realizados, de início, com populações humanas, especialmente aquelas residentes em países em desenvolvimento. Estes estudos foram muito relevantes, pois permitiram demarcar as regiões mais gravemente afetadas e, desta forma, direcionar programas assistenciais definidos por organizações humanitárias e também pelos governantes locais (Millward & Jackson, 2004; Cunningham-Rundles et al., 2005; Grossniklaus et al., 2008).

Entretanto, animais de laboratório vem sendo empregados de forma crescente para avaliar os efeitos dos graus variáveis de desnutrição na susceptibilidade às infecções e também nos diferentes parâmetros da resposta imunológica (Wintergest et al., 2007; Katona & Katona, 2008). A grande vantagem do uso destes modelos é permitir avaliação altamente controlada de cada parâmetro nutricional o que não é possível no caso das populações humanas. Camundongos e ratos adultos (isogênicos ou *outbred*), alimentados com quantidades reduzidas de proteínas, vitaminas ou micronutrientes, constituem os modelos mais utilizados. O percentual de restrição alimentar varia de 10 a 70% segundo diferentes autores. Camundongos jovens recém desmamados também são empregados

como modelo de desnutrição pré-pubescente (Hillyer et al., 2008). Gatos e cachorros são eventualmente utilizados em estudos de desnutrição. Mais recentemente tem aumentado o uso de camundongos transgênicos e *knockouts* para elucidar os mecanismos envolvidos na maior suscetibilidade que a desnutrição determina aos agentes infecciosos (Freeman & Rush, 2007).

1.5- *Staphylococcus aureus*: características gerais, infecção e resposta imune

Membros do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, medindo de 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, os quais se apresentam isolados ou em arranjos irregulares lembrando cachos de uva. São imóveis, não formadores de esporos, catalase positivos e a maioria das espécies é anaeróbia facultativa (Kloos & Bannerman, 1995; Tortora et al., 2006).

O gênero *Staphylococcus* é composto de 40 espécies sendo que, a maioria delas é coagulase-negativa. As únicas espécies que produzem coagulase são *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* (Trülsch et al., 2002; Bannerman, 2003). Embora encontrados com relativa frequência como membros da microbiota normal do corpo humano, os *Staphylococcus* são responsáveis por diversas infecções comunitárias ou nosocomiais (Trabulsi et al., 2004; Foster, 2005; Speziale et al., 2008).

O *S. aureus* é considerado a espécie mais importante, sendo agente de uma grande variedade de infecções. As infecções nosocomiais têm sido a principal causa de morbidade e mortalidade. Tais infecções são, frequentemente, agudas e piogênicas e, se não tratadas, podem causar bacteremia envolvendo vários órgãos. As infecções mais comuns incluem furúnculos, celulite, impetigo e sítios de ferida cirúrgica. Alguns dos quadros mais graves incluem bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite aguda, miocardite, meningite, artrite séptica, abscesso em músculos, infecções no trato genitourinário, sistema nervoso central e vários órgãos intra-abdominais (Bergdoll, 1991; Foster, 2005; Rubinstein, 2008).

Os principais fatores de virulência do *S. aureus* são: coagulase, proteína A, proteína ligante de colágeno e fibronectina, fator *clumping*, ácido teicóico, ácido lipoteicóico, membrana plasmática, parede celular, peptidoglicano, cápsula e toxinas. Entre as toxinas se destacam algumas capazes de induzir lise, denominadas hemolisinas citotóxicas ou leucocidinas, as quais são capazes de produzir lesão diretamente na membrana externa das células alvo. Neste caso o alvo das leucocidinas são os leucócitos que são capazes de destruir as bactérias, mas que também contribuem para a formação de abscessos nos

diferentes órgãos (Trabulsi et al., 2004; Foster, 2005). As toxinas superantigênicas também são relevantes, não possuem ação lítica direta mas causam lesões através da elevada indução de citocinas por células T e macrófagos ativados (Balaban & Rasooly, 2000; Dinges et al., 2000). As toxinas superantigênicas são classificadas em toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e enterotoxinas estafilocócicas (EE) (EEA, EEB, EEC, EED, EEE, EEG e EEH). Estes superantígenos desencadeiam uma série de efeitos tóxicos, como a síndrome do choque tóxico e as intoxicações (Dinges et al., 2000; Cook et al., 2007).

A infecção e propagação por contato tem maior importância nos hospitais, onde grande parte da equipe e dos pacientes (30 a 50%) abrigam cepas resistentes nas fossas nasais e na pele. Essas infecções podem ser causadas por bactérias do próprio indivíduo (infecções endógenas) ou por amostras adquiridas de outras pessoas (infecções exógenas). A transmissão ocorre por contato direto e indireto e podem ser bem graves em recém-nascidos, pacientes cirúrgicos e em portadores de algumas doenças debilitantes como câncer e diabetes (Trabulsi et al., 2004).

A patogenicidade desta espécie deve-se tanto à absorção dessas toxinas pré-formadas, quanto à poderosa capacidade invasiva desta bactéria que leva às bacteremias e abscessos disseminados em todos os órgãos. A partir de qualquer foco esses microrganismos podem propagar-se através dos linfáticos e da corrente sanguínea para outras partes do corpo (Opilla, 2008).

Após transpor as barreiras físicas do organismo, tais como pele e mucosas, o *S. aureus* vai enfrentar inicialmente a imunidade inata e depois a imunidade específica. A infecção com *S. aureus* estimula uma resposta inflamatória acentuada envolvendo a migração de neutrófilos e macrófagos para o sítio da infecção. Estas células tentam internalizar e destruir estas bactérias com o auxílio de anticorpos específicos e componentes do sistema complemento presentes no soro (Foster, 2005). A resposta imune específica ocorre quando a bactéria e seus produtos são internalizados pelos macrófagos e outras APCs e transportados para os linfonodos regionais ou baço, onde células B são estimuladas a se diferenciar em plasmócitos e secretar anticorpos. Estes anticorpos podem neutralizar as toxinas liberadas e também facilitar o processo de fagocitose destas bactérias por opsonização (Foster, 2005). Anticorpos contra *S. aureus* estão presentes em praticamente todos os indivíduos humanos e existem relatos mostrando também que os títulos de anticorpos específicos aumentam após infecção (Dryla et al., 2005). Entretanto estes anticorpos e a memória imunológica parecem ser insuficientes para prevenir infecções subsequentes por esta bactéria.

Apesar de ser combatido por uma série de mecanismos imunológicos, tanto não específicos quanto específicos, o *S. aureus* dispõe de uma série de estratégias de escape que lhe permite evasão das defesas do hospedeiro. Os principais mecanismos de evasão descritos incluem: inibição de quimiotaxia de neutrófilos (Murdoch et al., 2000); liberação de toxinas que matam os leucócitos (Montoya & Gouaux, 2003); resistência à fagocitose (Palmqvist et al., 2002); inativação do sistema complemento (Rooijakkers et al., 2005) e liberação de moléculas imunomoduladoras as quais podem determinar imunossupressão (Foster, 2005).

Alguns fatores relacionados com as condições do hospedeiro predispõem às infecções por estes microorganismos, como é o caso por exemplo, de idade, presença de doenças crônicas, uso de catéteres intravenosos e tempo prolongado de hospitalização (Hag et al., 1992; Opilla, 2008). É interessante ressaltar que em casos de administração de nutrição parenteral, feita para debelar a desnutrição, os componentes nutricionais da solução nutritiva constituem justamente um fator adicional propiciando o crescimento bacteriano no catéter (Opilla, 2008). A desnutrição tem sido descrita como um dos fatores de risco importantes de mortalidade por infecção com *S. aureus* resistentes a meticilina (Wu et al., 2000). O efeito da desnutrição na susceptibilidade à infecção pelo *S. aureus* não tem sido investigado de forma sistemática. Um trabalho antigo, publicado por Wiederman et al (1996), demonstrou que a deficiência de vitamina A afetou profundamente a resposta imune inata, a capacidade dos fagócitos em matar o patógeno internalizado e também a atividade do sistema complemento. Neste contexto, este trabalho se propõe a definir um modelo de subnutrição e posteriormente investigar com maiores detalhes o efeito desta subnutrição na susceptibilidade à infecção com *S. aureus*.

2- Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Caracterizar um modelo experimental de desnutrição protéico-calórica e avaliar seu efeito na susceptibilidade à infecção com *S. aureus*.

2.2- Objetivos específicos:

- 1- Montar um modelo de desnutrição protéico-calórica, submetendo camundongos BALB/c a diferentes percentuais de restrição alimentar (10, 20 e 30%).
- 2- Caracterizar o efeito da desnutrição na resposta imune através de produção de citocinas, análise histopatológica de órgãos linfóides e de resposta imune após imunização com eritrócitos de carneiro.
- 3- Comparar o efeito da imunização prévia com antígenos de *S. aureus* na susceptibilidade à infecção por esta bactéria em camundongos normais e subnutridos.

3- Material e Métodos

3.1- Delineamento experimental geral

Inicialmente foi determinado o consumo médio de ração por dia. A partir deste valor, os grupos experimentais foram submetidos a diferentes percentuais de restrição alimentar (10, 20 e 30%). O efeito desta restrição foi avaliado pela sobrevida, parâmetros bioquímicos, alterações histopatológicas em órgãos linfóides e produção de citocinas. Em função das alterações imunológicas observadas foi escolhido um percentual de restrição alimentar para avaliar seu efeito sobre a resposta imune após procedimentos de imunização e infecção com *S. aureus*. As imunizações foram realizadas com eritrócitos de carneiro que permitiram determinar a produção de IgM e IgG ou antígenos de *S. aureus*. Foram testadas duas preparações distintas de *S. aureus*: cocos inativados por adição de 3% de formol (AgF) ou sobrenadante de cultura de *S. aureus* contendo antígenos solúveis da bactéria (AgS). Os antígenos bacterianos foram associados com Adjuvante Completo de Freund (ACF). Após imunização com *S. aureus* foi determinada a indução de imunidade protetora após infecção com a bactéria por via intraperitoneal.

3.2- Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c (fêmeas) com 4-5 semanas de idade, provenientes do CEMIB – UNICAMP / Campinas, com peso corporal entre 19 e 21g. Os animais foram alojados em caixas plásticas com água e alimentos *ad libitum*. Os experimentos foram realizados segundo os regulamentos do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências - UNESP / Botucatu.

3.3- Cepa de *Staphylococcus aureus*

Foi usada uma cepa (S-6055/94) obtida de isolado clínico de secreção de paciente do Hospital das Clínicas de Botucatu. Esta linhagem de *S. aureus* foi inicialmente semeada na superfície de placas de Petri contendo Ágar sangue (Merck) e após incubação a 37°C em estufa por 24 horas foi corada pelo método de Gram objetivando determinar a pureza e analisar sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, a linhagem foi submetida às provas de catalase e coagulase.

3.4- Imunização com eritrócitos de carneiro

Eritrócitos de carneiro (EC) foram mantidos em solução de Alsever até o momento do uso. Após três lavagens sucessivas em solução fisiológica, foi feita uma suspensão (diluição 1:8) a partir da papa de hemácias. Para a indução preferencial de IgM foi feita uma única imunização e o sangue coletado 4 dias após. Para a indução de IgG foram realizadas 2 imunizações com intervalos de 7 dias entre as doses e o sangue obtido 7 dias após a 2ª imunização.

3.5- Reação de hemaglutinação

A reação de hemaglutinação foi feita em placa de microtitulação. Amostras de soro foram inicialmente diluídas em salina tamponada com fosfato (PBS) para determinação do nível total de anticorpos ou em PBS contendo 2 - mercaptoetanol (2-ME) para avaliação da presença de IgM. As placas de microtitulação contendo as amostras diluídas (diluição seriada em base 2) foram incubadas por uma hora em temperatura ambiente e a seguir foi adicionada a suspensão de EC a 2%. Após incubação por 1 hora em temperatura ambiente, os títulos de anticorpos foram determinados por inspeção visual. O princípio deste teste é que anticorpos específicos para antígenos de superfície de eritrócitos se liguem aos mesmos e causem aglutinação. O pré-tratamento dos soros com 2-ME destrói a estrutura e a reatividade da IgM, deixando intacta a estrutura e a reatividade da IgG, ou seja, amostras sem adição de 2-ME destinam-se à pesquisa de imunoglobulinas totais (IgM + IgG) enquanto que amostras com adição de 2-ME destinam-se à detecção só de IgG.

3.6- Imunização com antígeno de *S.aureus*

Esta imunização foi feita com dois tipos de antígenos: antígeno particulado constituído por cocos formolizados (AgF) e antígeno solúvel (AgS) obtido pelo método do saco de diálise.

3.6.1- Imunização com antígeno formolizado (AgF)

Para obtenção de AgF a bactéria foi semeada na superfície de placas de Petri contendo Ágar sangue (Merck). Após 24 horas de incubação a 37°C, colônias de *S. aureus* isoladas foram coletadas e semeadas em caldo BHI (Merck) e incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente esta cultura foi centrifugada a 10.000 rpm a 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o “*pellet*” de bactérias foi dissociado por agitação em

vórtex. As bactérias foram lavadas 3 vezes por adição de PBS, o “pellet” obtido foi dissociado e adicionado de formaldeído a 3%. A concentração bacteriana foi acertada para 10^8 /mL usando a escala 0,5 de McFarland. A suspensão foi agitada por 30 minutos em agitador automático na velocidade média. Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado e as bactérias foram ressuspensas em água destilada. Este material foi estocado a 4°C até o momento da imunização. Os animais foram imunizados no dorso, por via subcutânea com 0,2 mL de emulsão obtida pela associação entre AgF e ACF na proporção 1:1.

3.6.2- Imunização com antígeno solúvel (AgS)

Para a obtenção de antígeno solúvel (AgS) foi utilizado o método do saco de diálise de Donnelly et al. (1967). Com este objetivo, sacos de diálise (Difco) de 30 a 40 cm foram previamente lavados em água destilada, amarrados em uma das extremidades e a seguir preenchidos com 50 mL de caldo BHI em concentração dupla e amarrados na outra extremidade. Os sacos assim preparados foram colocados em erlenmeyers de 250 mL para adotarem a forma de U no fundo do frasco. Os frascos foram autoclavados durante 15 minutos a 121°C e posteriormente, volumes de 18 mL de tampão fosfato 0,02 M, pH 7,4 em 0,9% de NaCl (PBS) foram inoculados com uma alçada das amostras de *S. aureus* previamente cultivadas em 5,0 mL de caldo BHI a 37°C por 24 horas com agitação de 130 rpm. Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas a 8.000 g por 4°C, durante 15 minutos. O sobrenadante obtido foi fervido a 100°C por 20 minutos e resfriado rapidamente para inativação de proteínas. Este material foi utilizado como fonte de exoantígenos. Após dosagem de proteínas, este material foi associado ao ACF e utilizado para imunização. Os animais foram imunizados no dorso, por via subcutânea com 0,2 mL de emulsão obtida pela associação entre AgS e ACF na proporção 1:1.

3.7- Dosagens de proteínas, colesterol e triglicerídeos

Estas dosagens foram feitas no soro, segundo os procedimentos indicados pelos fabricantes dos kits: proteínas totais (Analisa®); colesterol total (Laborlab®); e triglicerídeos totais (Laborlab®).

3.8- Obtenção de antígeno solúvel de *Staphylococcus aureus* para dosagem de anticorpos

O preparo do antígeno foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Sasaki et al (2006), modificada. As bactérias foram semeadas na superfície de placas de Petri contendo Ágar sangue (Merck) e incubadas a 37°C por 24 horas para o crescimento. Após este período foram coletadas várias colônias da placa, semeadas em caldo BHI (Merck) e novamente incubadas a 37°C por 24 horas. Este caldo foi então centrifugado a 10.000 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o “*pellet*” foi pesado e ressuspendido a 20% de água destilada (peso/volume). Posteriormente esta suspensão foi sonicada por 20 minutos em gelo (20 ciclos de 30 segundos cada ciclo) com descanso de 1 minuto a 4°C. Após esta etapa, a suspensão foi centrifugada novamente a 14.500 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em membrana millipore de 0,2 µm. A concentração de proteínas foi determinada pelo método Ácido Bicinconínico com a utilização de um kit comercial (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit - BCA - Sigma). O antígeno solúvel obtido foi estocado a -80 °C.

3.9- ELISA para detecção de anticorpos anti-*S. aureus* (IgG1 e IgG2a)

No Protocolo Experimental III.a, como será mostrado posteriormente, os animais foram imunizados com dois tipos de imunógenos (AgF e AgS) associados ao ACF. Um grupo controle foi inoculado só com ACF. Os soros foram posteriormente utilizados para a detecção de anticorpos específicos anti-*S. aureus*. Placas de 96 poços foram recobertas com 100 µL/poço do antígeno solúvel na concentração de 50 µg/mL, diluído em tampão de ligação (Na₂CO₃ 17 mM, NaHCO₃ 9,6 mM, pH 9,6) e incubadas a 4°C, durante uma noite. Em seguida, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS/Tween 20 0,05% e bloqueadas com 300 µL por poço de PBS / Tween 20 0,05% e soro fetal bovino 10%. As placas foram incubadas por 1 hora, a 37°C e lavadas novamente. As amostras de soro foram diluídas 1:10 em tampão de bloqueio e incubadas a 37°C, por 1 hora. As placas foram novamente lavadas e a seguir incubadas por 1 hora, a 37°C com 100 µL por poço de anticorpo biotinilado anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo (Oxford Biotechnology) diluídos em tampão de bloqueio na concentração de 500 ng/mL. Após incubação seguida de lavagem das placas, as mesmas foram incubadas com 100 µL por poço de complexo estreptavidina-peroxidase (StrepAB - Dako Corporation) diluído em tampão de bloqueio, sob o abrigo da luz, por 30 minutos, em temperatura ambiente. A reação colorimétrica foi revelada com

100 µL por poço de solução de ortofenilenodiamina (OPD-Sigma) e a reação interrompida com a adição de 50 µL por poço de H₂SO₄ 2N. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA a 492 nm.

3.10- Infecção com *Staphylococcus aureus*

Após cultivo em caldo BHI (Merck) a 37°C as bactérias foram ressuspensas em salina estéril e a concentração foi acertada para 1x10⁹ Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) através da leitura da absorbância. A leitura da absorbância correspondente a 1x10⁹ UFC/mL foi determinada pela contagem de células viáveis pelo método de diluição. Para isto, 100 µL de diluições seriadas de cultura *overnight* de *S. aureus* foram semeadas em Agar Baird-Parker (Difco) para determinar o número de UFC.

3.11- Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Os órgãos escolhidos para realizar a contagem do número de colônias recuperadas em animais infectados com *S. aureus* foram baço, fígado e pulmão. Para a realização desta contagem, os órgãos foram macerados em salina estéril e 100 µL do macerado foi semeado na superfície de placas de Petri descartáveis contendo Agar Baird Parker e incubado por 24 horas a 37°C. Posteriormente as colônias foram contadas utilizando o contador “CP 600Plus” (Phoenix) e os resultados foram expressos em UFC/g de tecido. Para o cálculo de UFC, o número de colônias que cresceu foi multiplicado pelo fator de diluição e inóculo (volume utilizado para plaquear). A presença de bactérias no sangue foi determinada pela metodologia mas não foi quantitativa.

3.12- Cultura de células

No protocolo I, os animais foram avaliados 10, 20 e 40 dias após serem submetidos a 3 diferentes percentuais de restrição alimentar (10, 20 e 30%) baseado no consumo diário de ração do grupo controle. É importante ressaltar, entretanto, que nem todas as avaliações foram realizadas nestes 3 períodos. Os baços destes animais foram coletados para preparo de culturas celulares. Os órgãos foram divulsionados e as células centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI contendo gentamicina, soro bovino fetal e L-glutamina. O número de células foi ajustado para 5 x 10⁶ células/mL. Em seguida estas células foram distribuídas em placas de cultura (Nunc) e estimuladas com Concanavalina A (ConA) na concentração 5 µg/mL e Lipopolissacarídeo (LPS) na concentração a 10

µg/mL. Após incubação por 48 horas, a 37°C, em estufa de CO₂ (5%), os sobrenadantes das culturas foram coletados e estocados a -20°C para posterior dosagem de citocinas.

3.13- ELISA para detecção de citocinas

No Protocolo Experimental I, os sobrenadantes obtidos das culturas dos animais submetidos a diferentes percentuais de restrição alimentar, foram avaliados quanto à produção de IL-4, IL-5 e IFN-γ. Placas de 96 poços (Nunc) foram recobertas com solução contendo anticorpo purificado de captura anti-IL-4 (11B11), anti-IL-5 (TRKF5) e anti-IFN-γ (AN 18) de camundongo (BD PharMingen), diluídos 1:1000 em tampão fosfato de sódio (pH 9.0). As placas foram incubadas a 4°C durante 12 horas. Após sucessivas lavagens com solução PBS - Tween 20 (0,05%) foi adicionada a solução de bloqueio, constituída de PBS contendo 10% de soro bovino fetal, com incubação por 1 hora, em temperatura ambiente. As placas novamente lavadas foram incubadas por 12 horas a 4°C, com as amostras diluídas em tampão PBS contendo 10% soro bovino fetal e 0,05% de Tween 20 e com os respectivos padrões de citocinas para estabelecer a curva-padrão. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-IL-4 (BVD6-24G2), anti-IL-5 (TRFK4) e anti-IFN-γ (C15.16) de camundongo biotinizados, diluídos 1:1000 em tampão PBS contendo 10% de soro bovino fetal e 0,05% de Tween 20, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Posteriormente, seguiu-se a incubação com a solução AB (estreptoavidina + peroxidase) durante 30 minutos, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e reveladas com substrato H₂O₂ e o cromógeno OPD[®] (ortofenilenodiamina - Sigma). A reação foi interrompida por adição ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2N) e a leitura da absorbância realizada em 492 nm em leitor de ELISA.

3.14- Análise histopatológica

Timo e intestino delgado (Protocolo Experimental I) foram coletados de grupos de animais com restrição alimentar e também de grupos sem restrição alimentar. Estes órgãos foram fixados em tampão fosfato contendo 10% de formalina durante, no mínimo, 24 horas e, em seguida, armazenados em etanol 70% até serem submetidos ao processo de desidratação em séries de etanol e xilol. Os tecidos foram incluídos em blocos de Paraplast Plus (McCormick) e, em seguida, foram realizados os cortes histológicos com 5 µm de espessura em micrótomo (Leica, RM2245). As lâminas foram coradas com Hematoxilina-

Eosina (H&E) e analisadas em microscópio óptico (Leica, Germany) e as imagens adquiridas por meio de câmera digital acoplada ao microscópio.

No Protocolo Experimental III.c foram coletadas amostras de pulmão obtidas 24 horas após infecção com *S. aureus* em animais previamente imunizados com AgF. Os fragmentos de pulmão foram removidos e fixados em solução de formol tamponado 10% e embebidos em Paraplast. Cortes de 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina/eosina (H&E) para avaliação do processo inflamatório. Adicionalmente foi realizada coloração de Gram, segundo procedimento padrão, para avaliação da presença de bactérias no pulmão. As análises foram realizadas em microscópio Nikon. A comparação do processo inflamatório nos diferentes grupos foi feita através de inspeção visual. O critério utilizado para a escolha da região a ser documentada fotograficamente foi a de ser a mais inflamada em toda a lâmina a qual continha quatro cortes.

3.15- Análise estatística

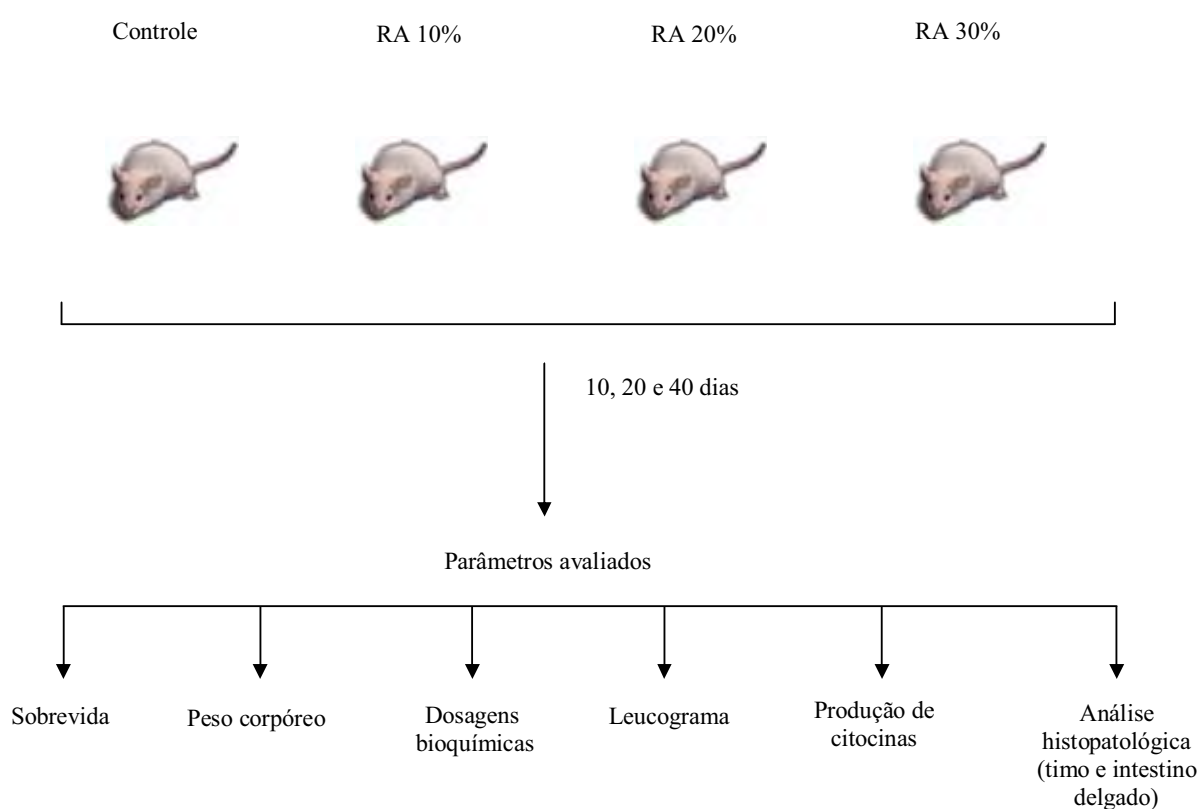
Para as variáveis paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e as comparações entre os grupos foram feitas pela análise de variância (ANOVA) seguida pela análise comparativa de Tukey. Para as variáveis não paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em mediana e intervalo interquartilico e as comparações entre os grupos foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis (ANOVA) seguida pela análise comparativa de Dunn's. O nível de significância adotado foi de 5%.

Os dados foram analisados pelo pacote estatístico SigmaStat for Windows version 2.0 1995, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA.

4 - Protocolos Experimentais e Resultados

Para atingir os objetivos definidos anteriormente, utilizamos os protocolos experimentais I, II e III (III.a, III.b e III.c), esquematizados a seguir. Com a intenção de facilitar o entendimento dos resultados, os mesmos serão sempre precedidos dos protocolos correspondentes.

4.1- Protocolo Experimental I: Caracterização do modelo experimental de subnutrição.



4.1.1- Resultados do Protocolo Experimental I

A- Sobrevida

Como mostrado na tabela 1, o grupo de animais submetidos a 30% de restrição alimentar (RA), ou seja, alimentados com 70% da quantidade de ração consumida pelo grupo controle, apresentou baixa sobrevida, somente 1 animal estava vivo no 15º dia de restrição alimentar. Todos os animais submetidos a 10% e a grande maioria dos animais submetidos a 20% de restrição alimentar sobreviveram pelo menos até o 40º dia que foi o último período analisado.

Tabela 1- Sobrevida de camundongos BALB/c submetidos a diferentes percentuais de restrição alimentar. Cada grupo foi constituído de 7 animais.

	1º Dia	10º Dia	15º Dia	20º Dia	40º Dia
Controle	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
R.A 10%	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
R.A 20%	7/7	7/7	7/7	7/7	6/7
R.A 30%	7/7	5/7	1/7	0/7	0/7

B- Peso corpóreo

O peso corpóreo foi avaliado diariamente. Como mostrado na figura 1, dos 3 diferentes percentuais de restrição alimentar propostos para avaliação de alterações físicas e imunológicas, o grupo que recebeu restrição alimentar de 30% não sobreviveu até o momento final do experimento, por isto, o peso corporal destes animais não é mostrado na figura. Os grupos que receberam restrição alimentar de 10 e 20% apresentaram perda significativa de peso a partir do 3º dia de restrição alimentar. Baço e timo não foram sistematicamente avaliados quanto ao peso. Entretanto, dados disponíveis em nosso laboratório indicam que em períodos prolongados de desnutrição também ocorre perda significativa no peso dos mesmos (dados não mostrados).

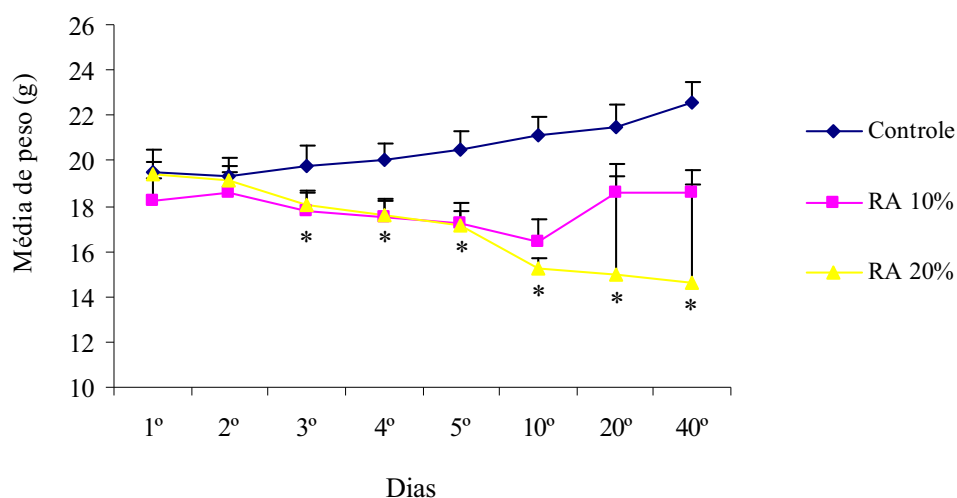
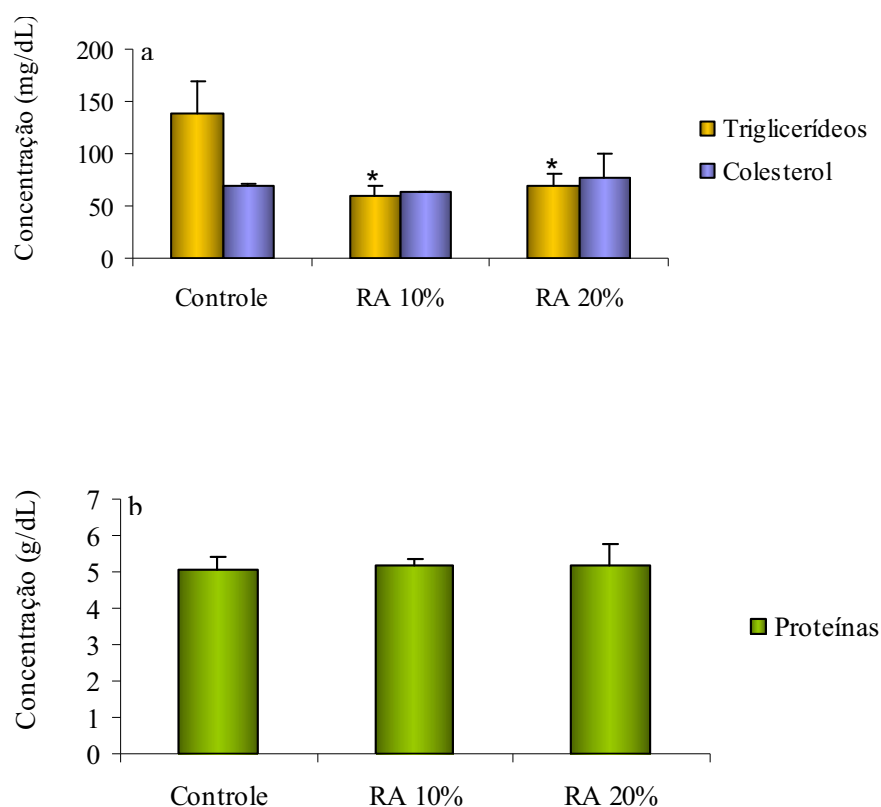


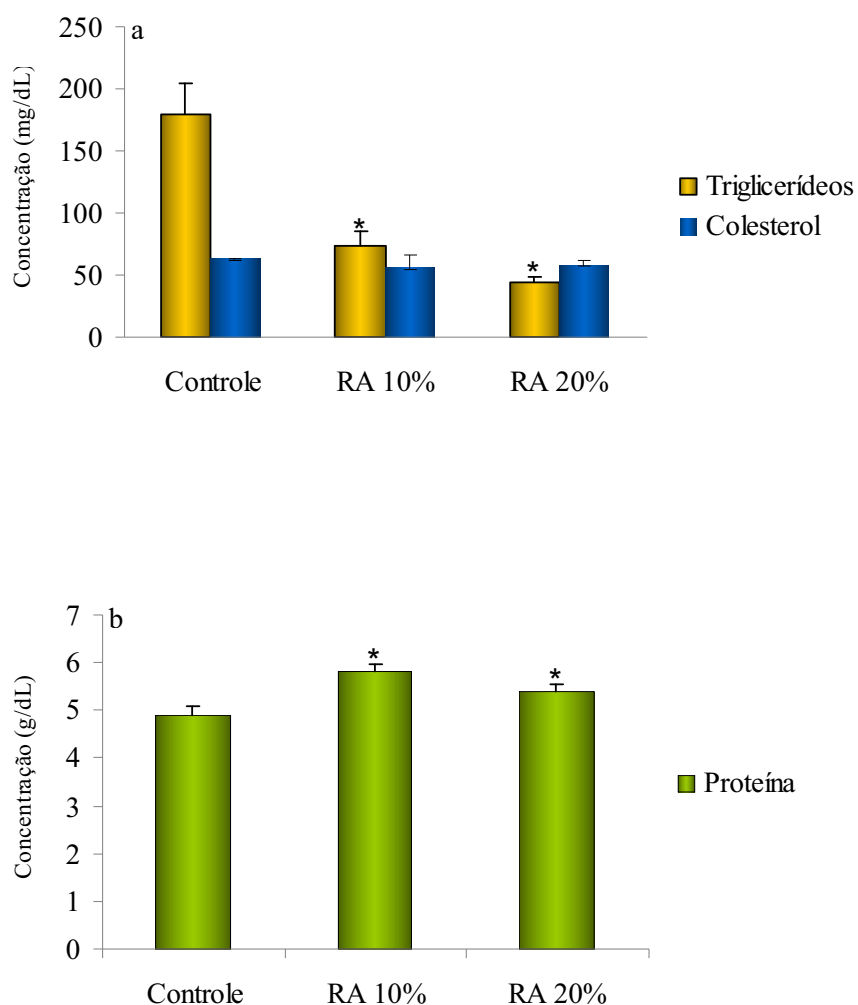
Figura1: Peso corpóreo de camundongos BALB/c submetidos a 10 e 20% de restrição alimentar. Os resultados mostrados se referem à média $\pm$ EPM de 7 animais por grupo; * $p < 0,05$ em comparação com animais sem restrição alimentar.

C- Dosagens bioquímicas

Dosagens bioquímicas, incluindo proteínas, colesterol e triglicerídeos foram feitas após 20 e 40 dias de restrição alimentar. Como pode se observar nas figuras 2a e b (20 dias de restrição alimentar) não ocorreram diferenças nos níveis totais de colesterol e proteínas nos grupos de 10 e 20% de RA, entretanto, observamos queda significativa nos níveis totais de triglicerídeos nos dois grupos em comparação com o grupo controle neste mesmo período. Nas figuras 3a e b são mostrados os resultados referentes ao período de 40 dias de restrição alimentar. Não ocorreu alteração no nível de colesterol mas baixou significativamente o nível de triglicerídeos (figura 3a). Observamos também aumento significativo no nível sérico de proteínas (figura 3b).



Figuras 2: Concentrações séricas de triglicerídeos e colesterol (a) e proteínas (b) em camundongos BALB/c submetidos a 10 e 20% de restrição alimentar por um período de 20 dias. Os resultados mostrados se referem à média $\pm$ EPM de 3 animais por grupo * $p < 0,05$ em comparação com grupo controle.



Figuras 3: Concentrações séricas de triglicerídeos e colesterol (a) e proteínas (b) em camundongos BALB/c submetidos a 10 e 20% de restrição alimentar por um período de 40 dias. Os resultados mostrados se referem à média $\pm$ EPM de 3 animais por grupo * $p < 0,05$ em comparação com grupo controle.

D- Leucograma

Pela avaliação do leucograma aos 20 dias de restrição alimentar podemos observar que a restrição alimentar de 20%, mas não a de 10%, determinou queda significativa nos níveis de leucócitos e que isto coincidiu com uma queda também significativa nos níveis de linfócitos (figura 4a). Esta diminuição observada aos 20 dias de restrição alimentar se manteve aos 40 dias de restrição (figura 4b). Neste caso esta variação não foi estatisticamente significativa, o que foi atribuído ao baixo número de animais utilizado.

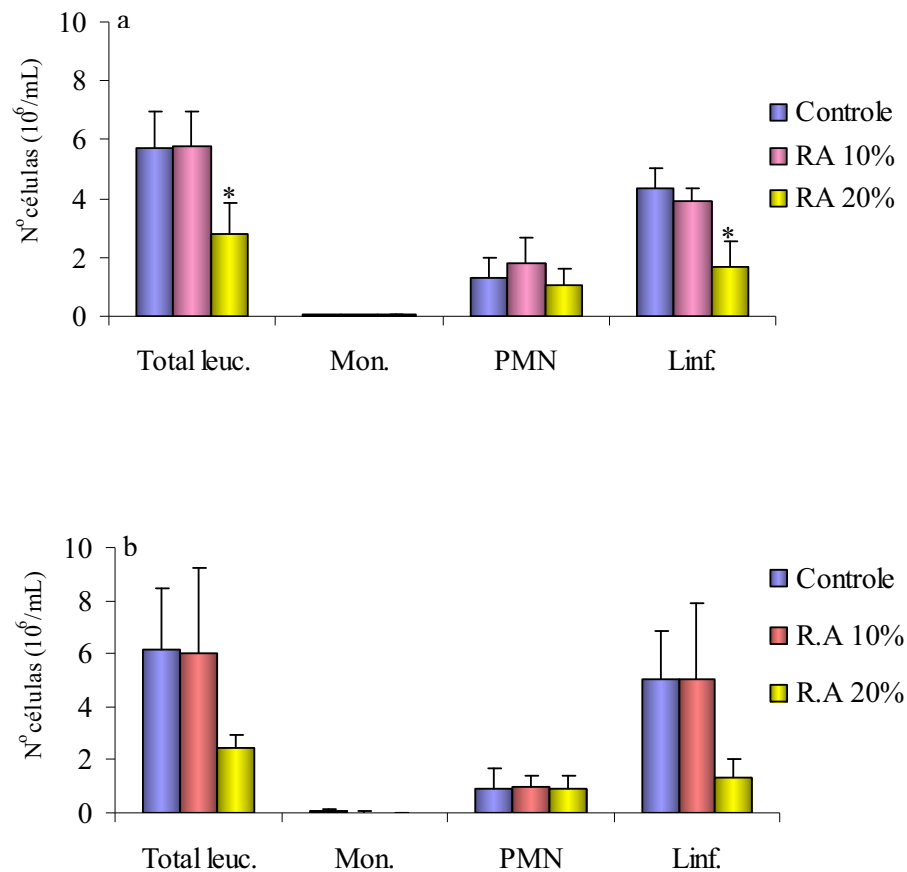


Figura 4: Leucograma de camundongos BALB/c submetidos a 10 e 20% de restrição alimentar por um período de 20 dias (a) e 40 dias (b). Os resultados mostrados se referem à média $\pm$ EPM de 3 animais por grupo * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

E- Produção de citocinas

Aos 20 dias de restrição alimentar de 20% mas não de 10%, ocorreu queda significativa na produção das três citocinas avaliadas nos sobrenadantes de culturas estimuladas com ConA. Como esperado não ocorreu produção de IL-4 e IL-5 nas culturas estimuladas com LPS. A produção de IFN- γ induzida por LPS também estava reduzida, mas não significativamente, nos animais submetidos a 20% de restrição alimentar. Os resultados de IL-4, IL-5 e IFN- γ são mostrados nas figuras 5a, b e c, respectivamente.

A produção das mesmas citocinas aos 40 dias de restrição alimentar é mostrada nas figuras 6a, b e c, respectivamente. Neste caso a produção das mesmas foi similar entre os grupos desnutridos e o grupo controle quando o estímulo foi ConA. A única diferença significativa foi encontrada nos níveis de IFN- γ produzidos por células esplênicas estimuladas com LPS.

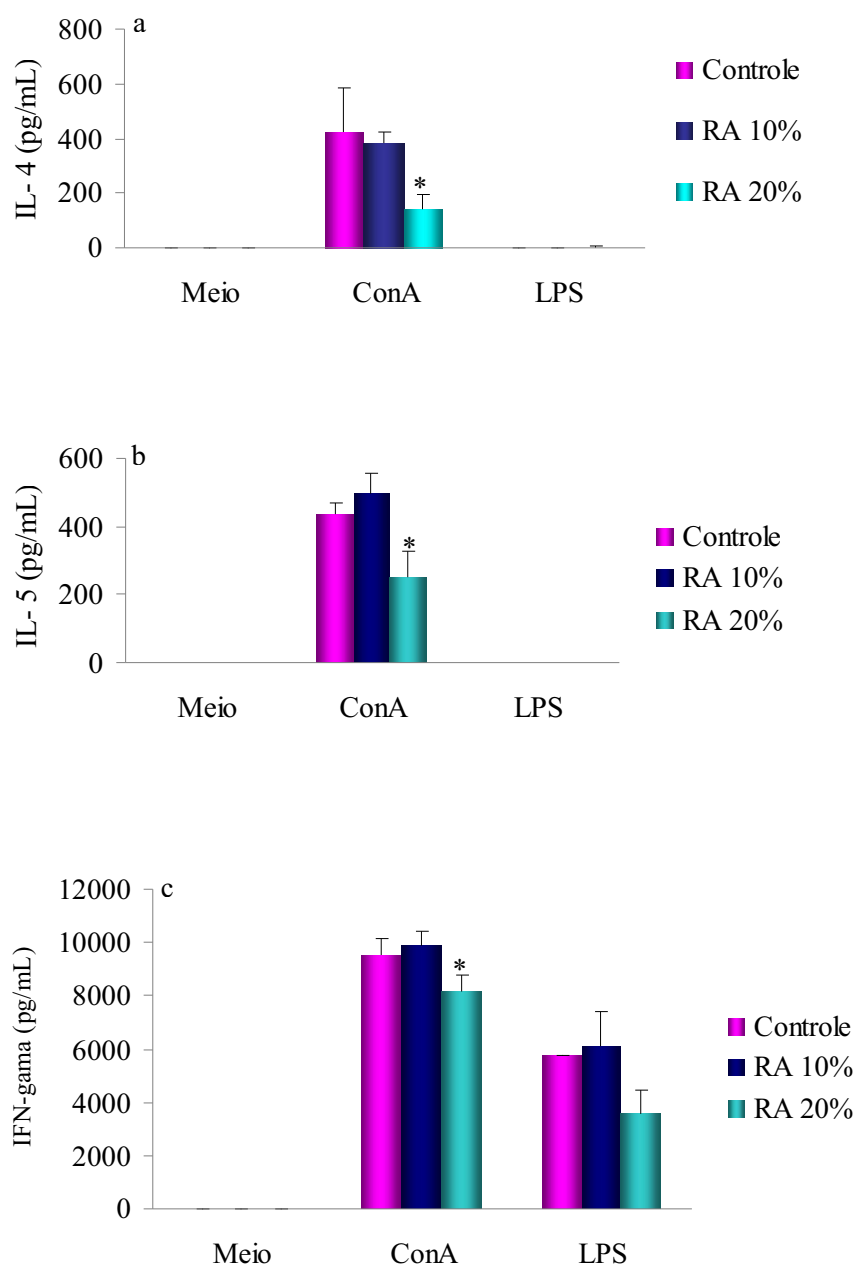


Figura 5: Produção de IL-4 (a), IL-5 (b) e IFN- γ (c) por células esplênicas de camundongos BALB/c submetidos à restrição alimentar durante 20 dias. Os resultados mostrados se referem à média $\pm$ EPM de 4 animais por grupo * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

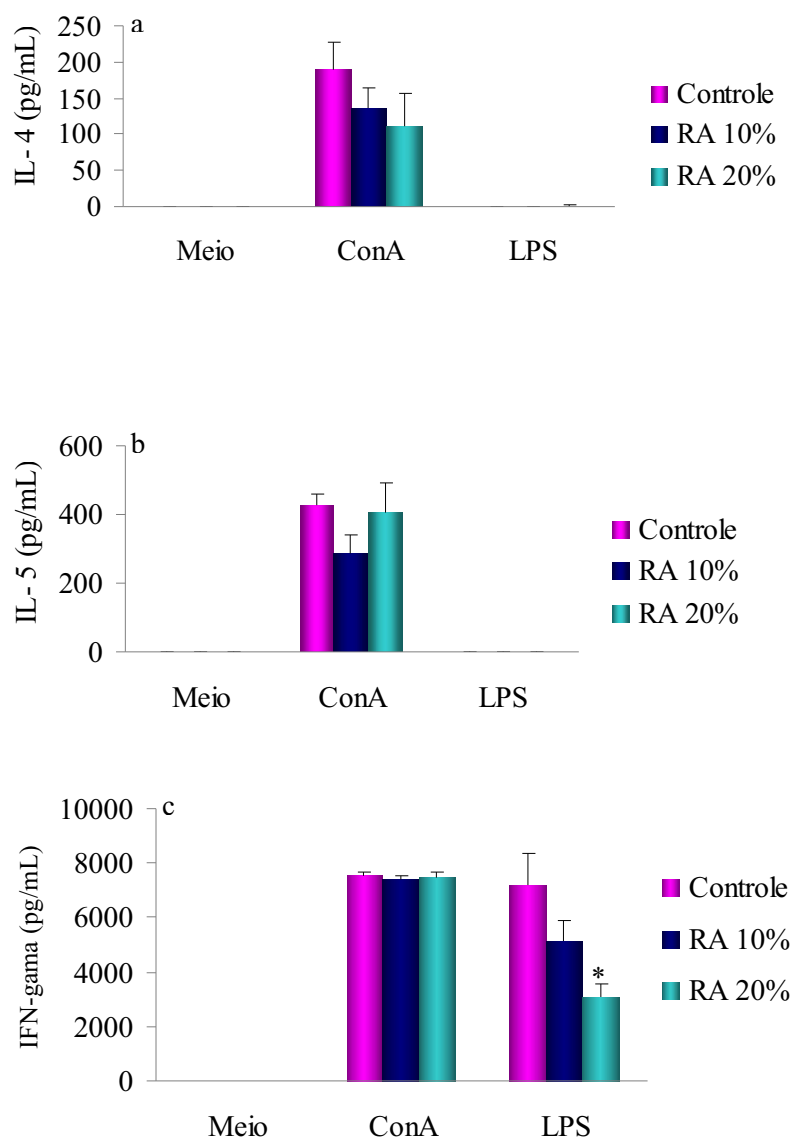


Figura 6: Produção de IL-4 (a), IL-5 (b) e IFN- γ (c) por células esplênicas de camundongos BALB/c submetidos à restrição alimentar durante 40 dias. Os resultados mostrados se referem à média $\pm$ EPM de 4 animais por grupo * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

F- Análise histopatológica

Timo

A estrutura do timo proveniente de animais normais é mostrada nas figuras 7a (5x) e 7b (20x). Nestas 2 figuras podem ser vistos os lóbulos separados por septos. As regiões cortical (região periférica mais escura) e medular (região mais interna e mais clara) podem ser também facilmente reconhecidas. Também se observa a continuidade das regiões medulares entre os diferentes lóbulos. A restrição alimentar determinou atrofia evidente neste órgão tanto aos 10 dias (7c e 7d) quanto aos 40 dias (7e e 7f). A atrofia foi, entretanto, muito mais acentuada aos 40 dias. Como mostrado na figura 7e, de forma mais evidente, a delimitação entre regiões cortical e medular ficou muito tênue. Esta atrofia foi também constatada pela comparação do peso do timo. Os animais submetidos a 20% de restrição alimentar durante 10 dias não apresentaram perda de peso tímico, no entanto, os animais submetidos a esta restrição por 40 dias, perderam cerca de 52% do peso do timo em comparação aos animais com dieta normal (resultados não mostrados).

Intestino delgado

Na figura 8 podem ser vistos cortes transversais de intestino delgado de camundongos normais (8a e b) ou submetidos à restrição alimentar por 10 dias (8c e d) ou 40 dias (8e e 8f). A aparência histológica observada nos animais subnutridos por 10 dias é muito similar àquela presente em animais com dieta normal, ou seja, são constatadas vilosidades intestinais com borda em escova, glândulas intestinais (secretam muco e são encontradas abaixo das vilosidades), submucosa, camada muscular e serosa. A estrutura deste epitélio encontra-se, entretanto, claramente alterada em animais submetidos à restrição alimentar por 40 dias: as vilosidades intestinais estão mais curtas, apresentam formato irregular e aparentemente perderam parte da borda em escova. Além disso, a camada muscular que sustenta o epitélio parece mais estreita que a presente nos animais que receberam dieta normal.

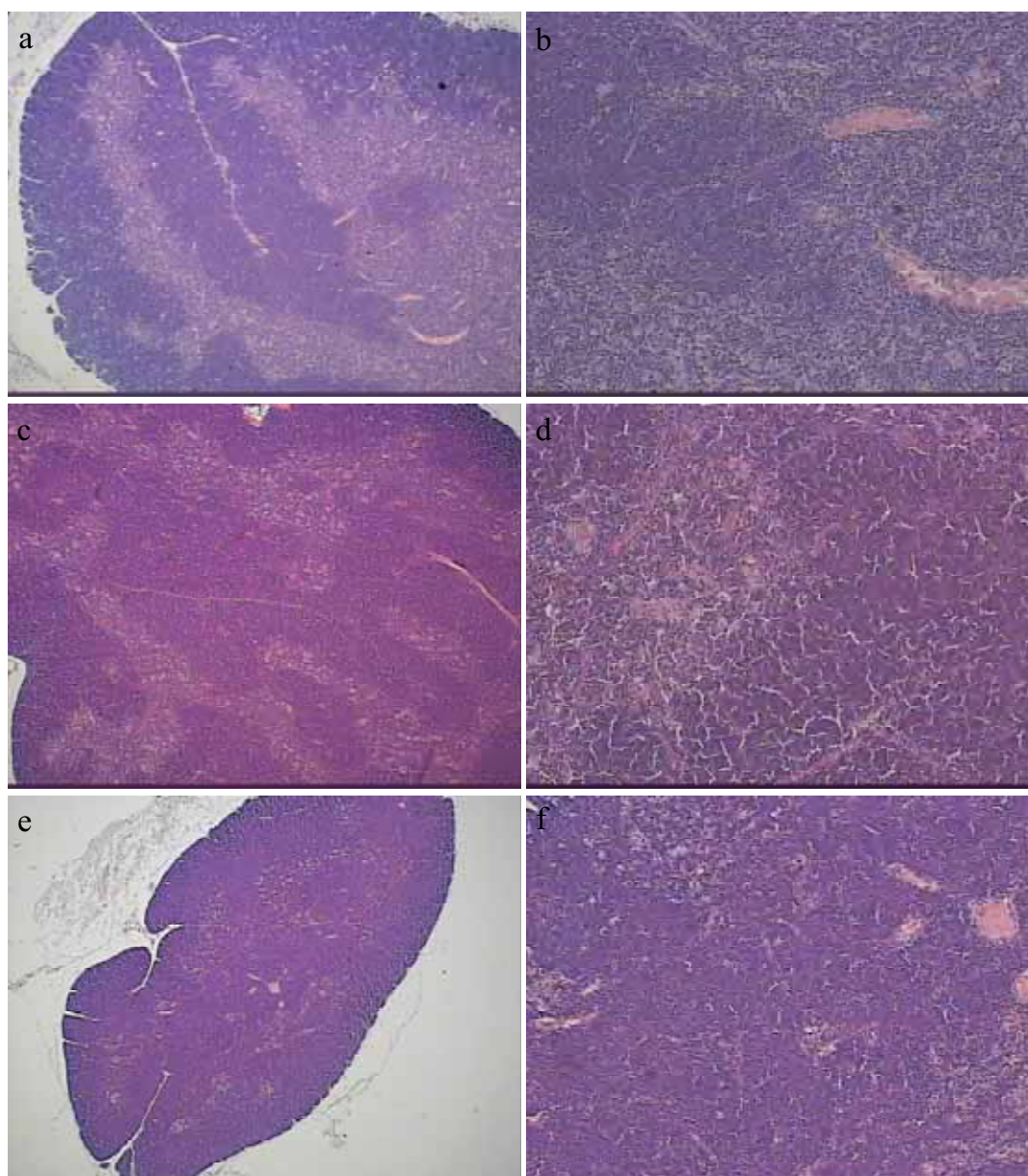


Figura 7: Análise histopatológica de timo de camundongos BALB/c submetidos a 20% de restrição alimentar. Timo de animais sem restrição alimentar, figuras a (5x) e b (20x); timo de animais submetidos à restrição alimentar durante 10 dias, figuras c (5x); d (20x) e durante 40 dias, figuras e (5x) e f (20x).

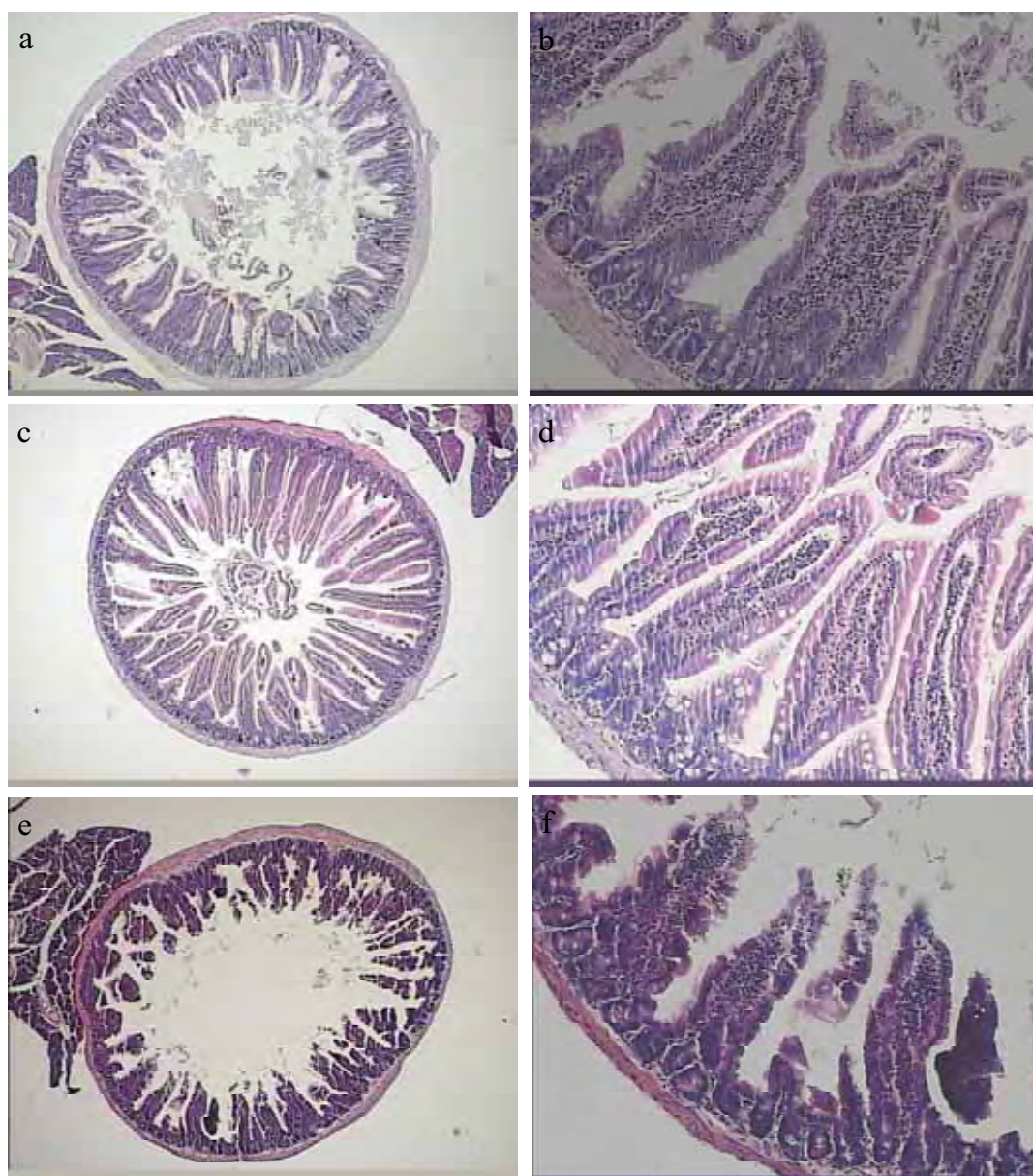
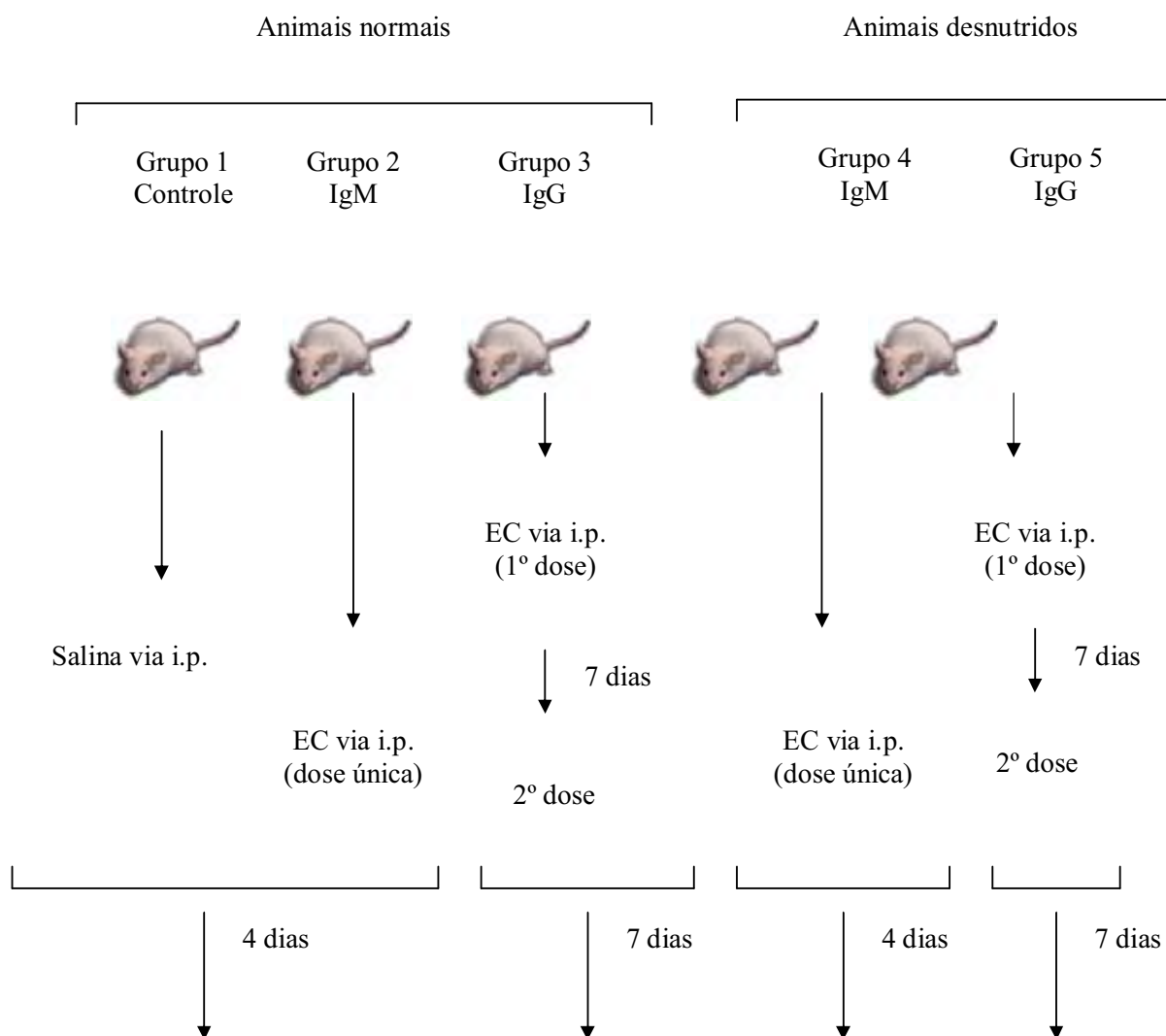


Figura 8: Análise histopatológica de mucosa associada ao intestino delgado em camundongos BALB/c submetidos a 20% de restrição alimentar. Intestino de animais sem restrição alimentar, figuras a (5x) e b (20x); intestino delgado de animais submetidos à restrição alimentar durante 10 dias, figuras c (5x) e d (20x) e durante 40 dias, figuras e (5x) e f (20x).

4.2- Protocolo Experimental II: Avaliação do efeito da subnutrição na resposta imune anti-eritrócitos de carneiro (EC)



Coleta de sangue para dosagem de anticorpos específicos totais (IgM + IgG) e IgG específicos

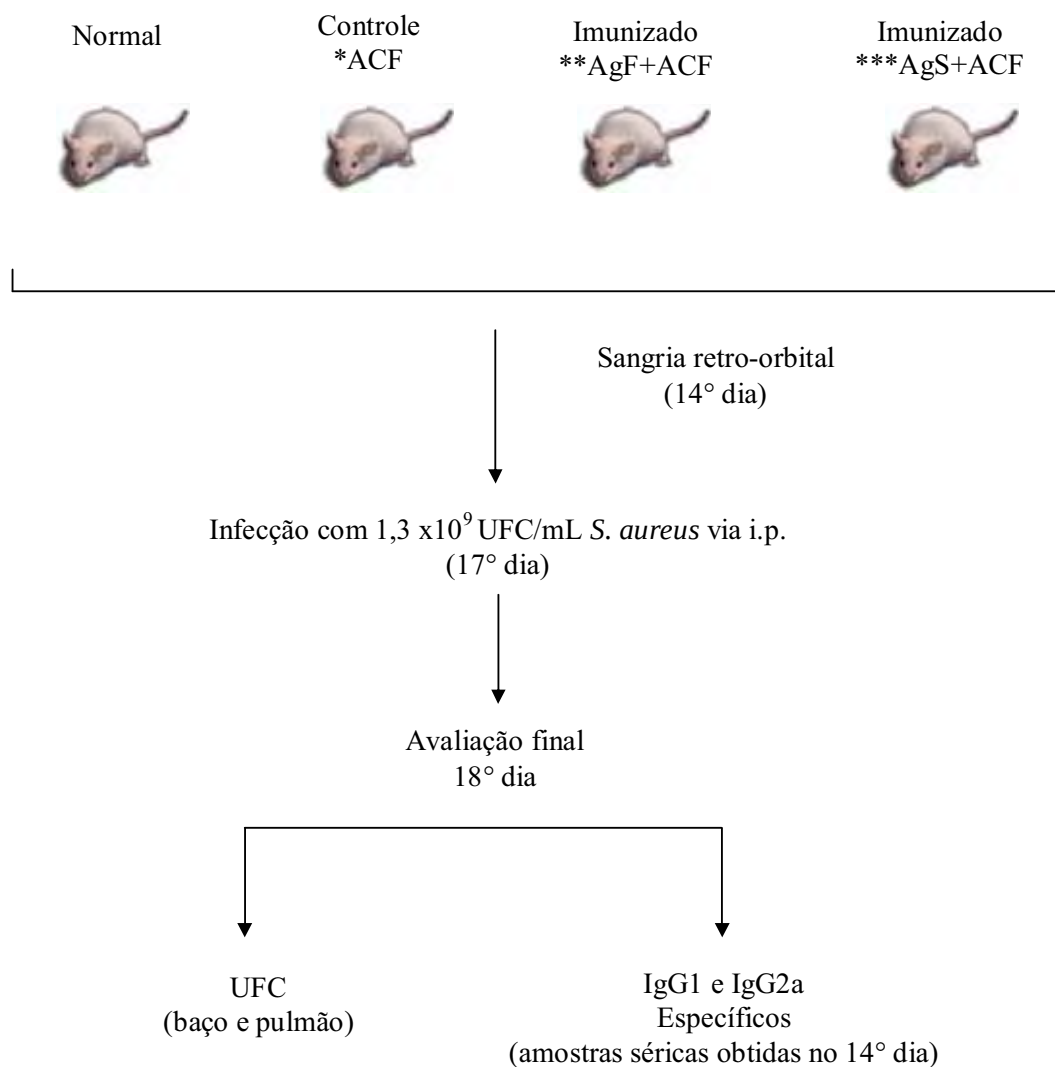
4.2.1- Resultados do Protocolo Experimental II

Os resultados referentes à produção de anticorpos anti-EC em camundongos normais e subnutridos são mostrados na tabela 2. Como pode se observar, os títulos de IgG e IgM anti-EC são semelhantes nos animais normais e subnutridos, não tendo se observado diferenças estatísticas entre os mesmos.

Tabela 2- Título de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro em camundongos BALB/c normais e subnutridos. Os resultados representam a mediana de 4 animais normais e 6 animais subnutridos com intervalo interquartil (25 - 75%).

	Total	IgM		Total	IgG
Controle	256	256		Controle	1024
Controle	128	128		Controle	512
Controle	128	128		Controle	1024
Controle	128	128		Controle	256
Mediana (25 - 75%)	128 (128 - 256)	128 (128 - 256)		Mediana (25 - 75%)	512 (256 - 1024)
R.A 20%	128	128		R.A 20%	256
R.A 20%	128	128		R.A 20%	256
R.A 20%	256	256		R.A 20%	256
R.A 20%	128	128		R.A 20%	512
R.A 20%	256	256		R.A 20%	256
R.A 20%	128	128		R.A 20%	256
Mediana (25 - 75%)	128 (128 - 256)	128 (128 - 256)		Mediana (25 - 75%)	256 (256 - 512)

4.3- Protocolo Experimental III.a: Avaliação da eficácia protetora de antígenos de *S. aureus* em camundongos sem restrição alimentar.



*ACF (Adjuvante Completo de Freund)

** AgF (Antígeno formolizado)

*** AgS (Antígeno solúvel)

4.3.1- Resultados do Protocolo Experimental III.a

A- Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *S. aureus*

A imunização com os 2 tipos de antígenos de *S. aureus* (particulado formolizado e solúvel) não afetou o número de UFC recuperadas a partir do baço destes animais (figura 9a). Entretanto, as duas preparações antigênicas foram capazes de diminuir o número de UFC nos pulmões destes mesmos animais (figura 9b). A inoculação só de ACF não determinou queda no número de UFC em nenhum destes dois órgãos.

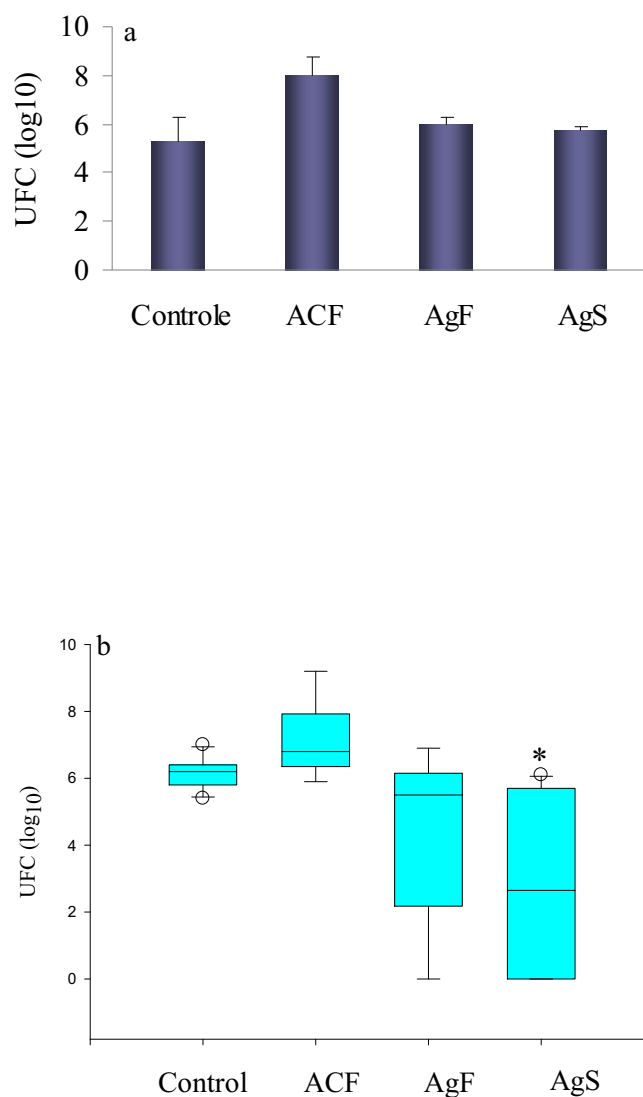


Figura 9: Carga bacteriana (UFC/g de tecido) em baço (a) e pulmão (b) de camundongos BALB/c imunizados com antígenos de *S. aureus* antes da infecção. No baço o resultado é mostrado como média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo. No pulmão o resultado é mostrado como mediana (25 - 75%) de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

B- Nível de anticorpos

Como pode se observar na figura 10, os dois antígenos utilizados induziram IgG1 específica para *S. aureus* mas não IgG2a. Apesar de significativos os níveis de anticorpos IgG1 específicos foram bastante baixos.

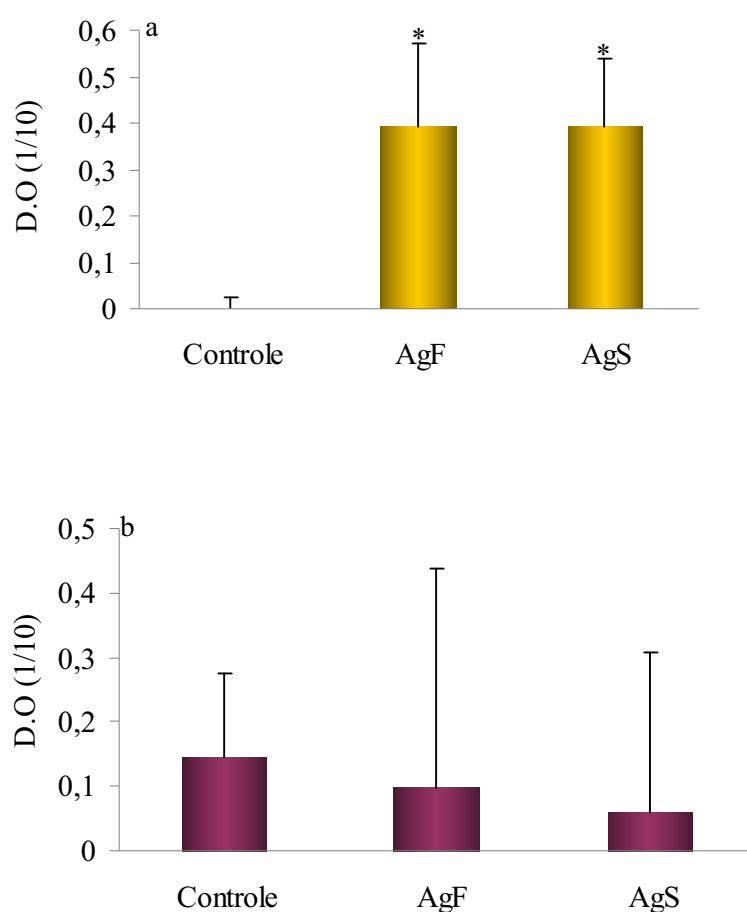
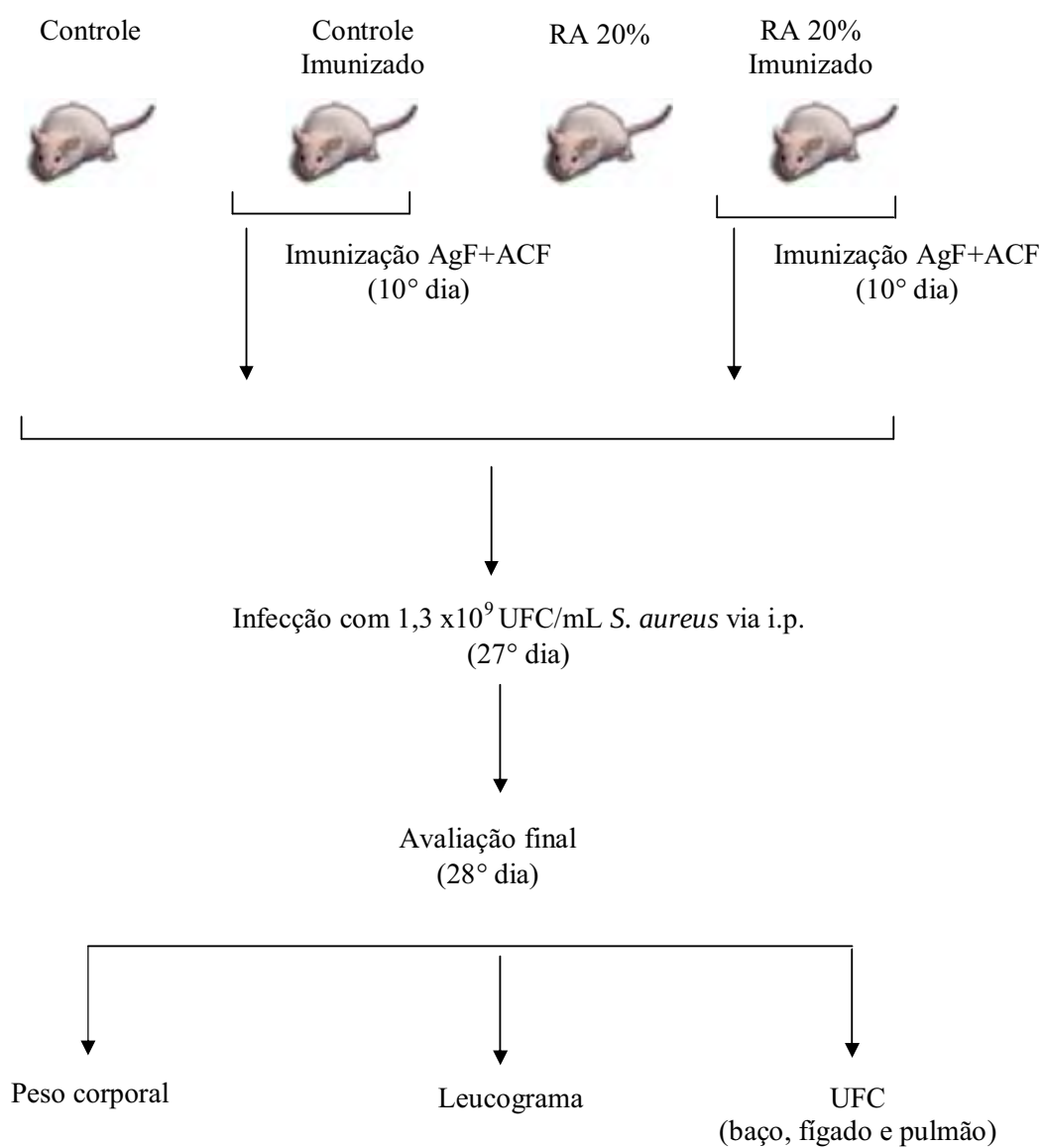


Figura 10: Efeito da desnutrição no nível de anticorpos IgG1 (a) e IgG2a (b) específicos para *S. aureus* em camundongos BALB/c imunizados e posteriormente desafiado com *S. aureus*. Os resultados mostrados se referem à média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$

4.4- Protocolo Experimental III.b: Avaliação do efeito da restrição alimentar na imunidade protetora e na susceptibilidade à infecção com *S. aureus* em camundongos BALB/c



4.4.1- Resultados do Protocolo Experimental III.b

Como esperado e já demonstrado anteriormente, os animais submetidos ao processo de restrição alimentar apresentaram queda significativa no peso e no número de linfócitos, como documentado nas figuras 11a e 11b, respectivamente. A avaliação do número de UFC, realizada no baço, fígado e pulmão mostrou, de forma geral, que a quantidade de bactérias foi similar entre os animais subnutridos e os animais do grupo controle que receberam dieta normal (figuras 12a, 12b e 13a, respectivamente).

Como pode se observar, a imunização dos animais normais determinou redução na carga bacteriana no fígado (figura 12b) e no pulmão (12a), mas não no baço. A imunização dos animais subnutridos não resultou em queda na carga bacteriana em nenhum dos três órgãos avaliados (figuras 12a e b e 13a).

Amostras de sangue total também foram plaqueadas para comprovar a presença de bactérias na corrente sanguínea. Todos os animais dos quatros grupos estudados apresentaram bacteremia (figura 13b). Apesar dos resultados serem expressos em UFC não foi feito plaqueamento de volumes definidos de sangue.

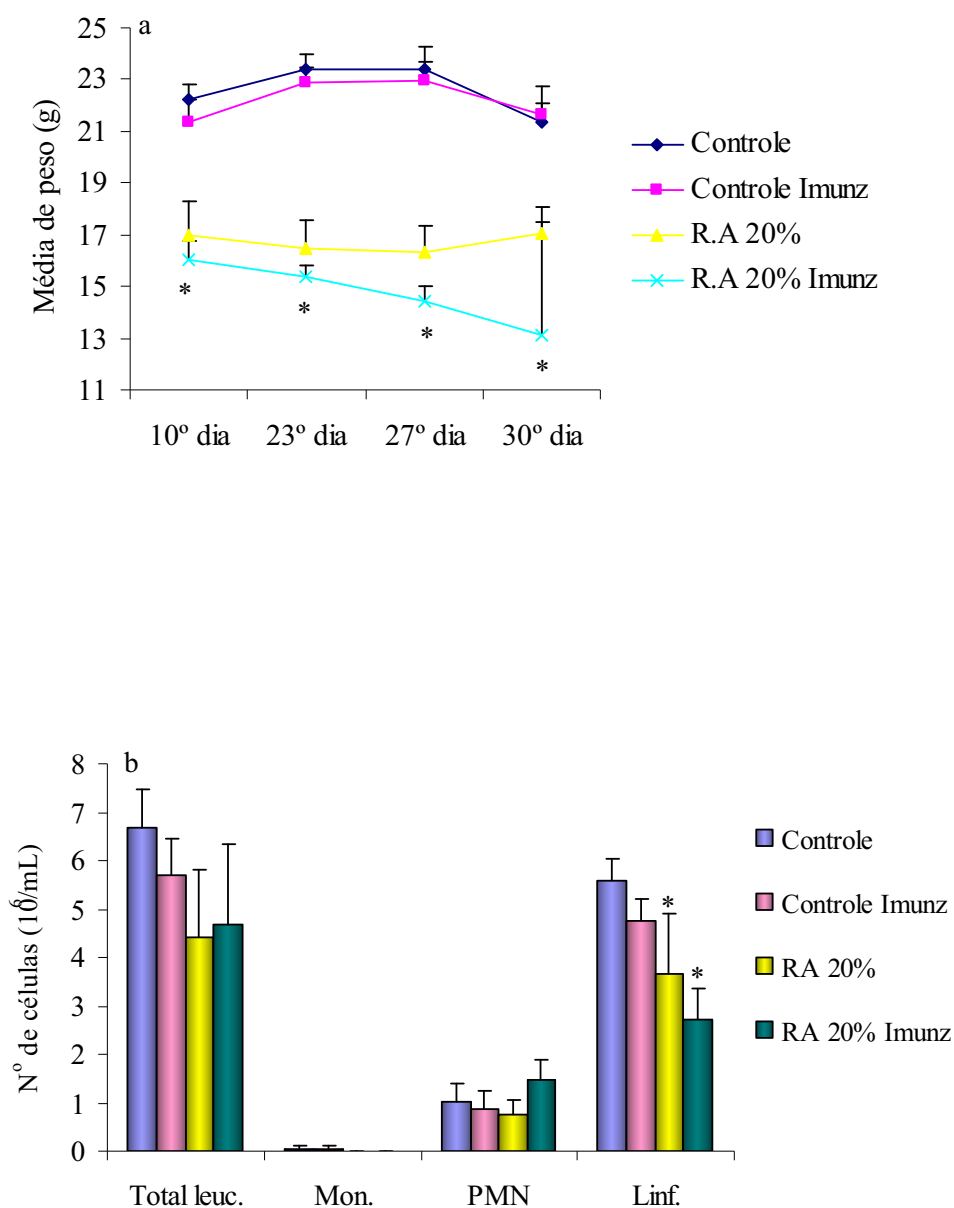


Figura 11: Efeito da desnutrição no peso corporal (a) e leucograma (b) de camundongos BALB/c imunizados e posteriormente infectados com *S. aureus*. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

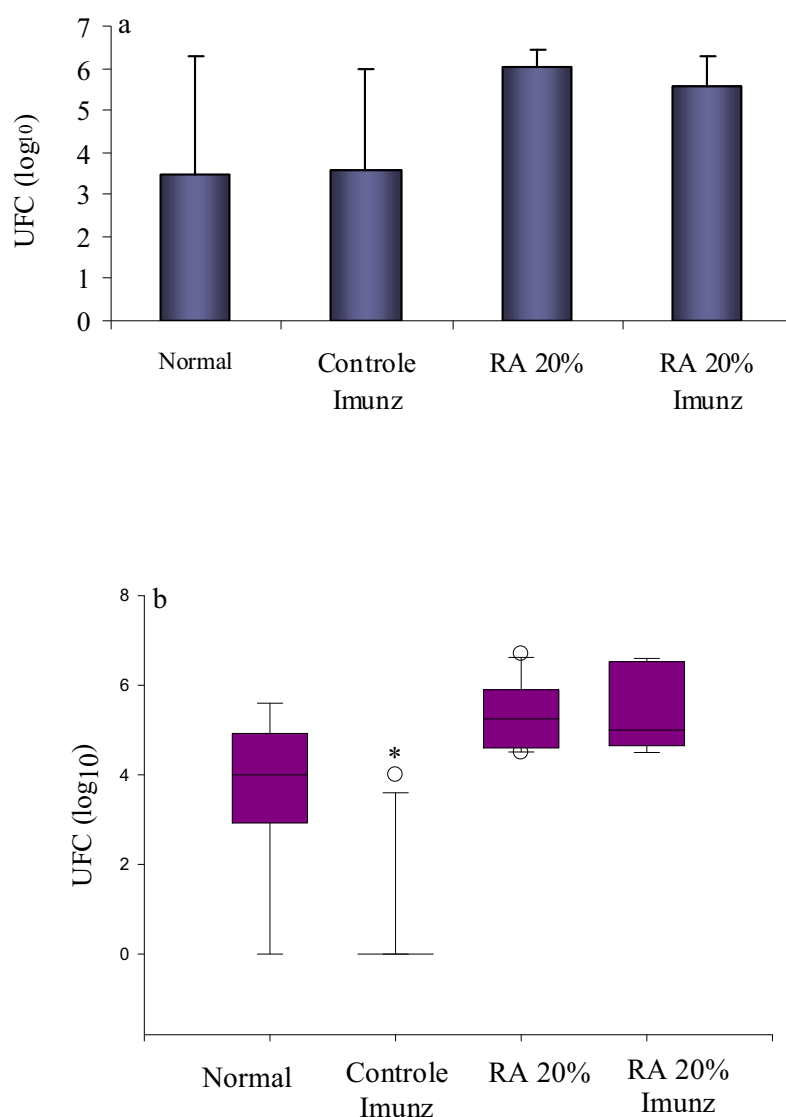


Figura 12: Efeito da desnutrição na imunidade protetora e na susceptibilidade às infecções pelo *S. aureus*. UFC/g de baço (a) e fígado (b) em camundongos BALB/c subnutridos, imunizados com *S. aureus* formolizado e posteriormente infectados. Os resultados referentes ao baço são mostrados como média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo; os resultados referentes ao fígado são mostrados como mediana (25 - 75%) de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo normal.

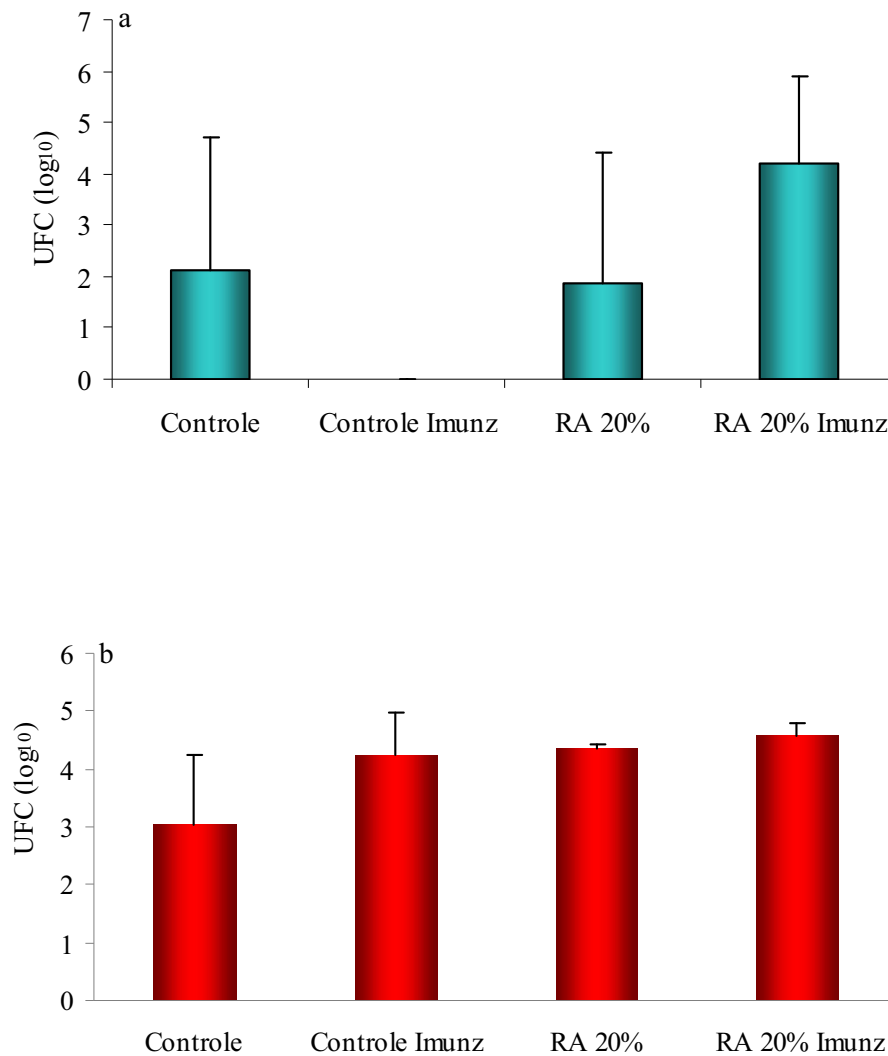
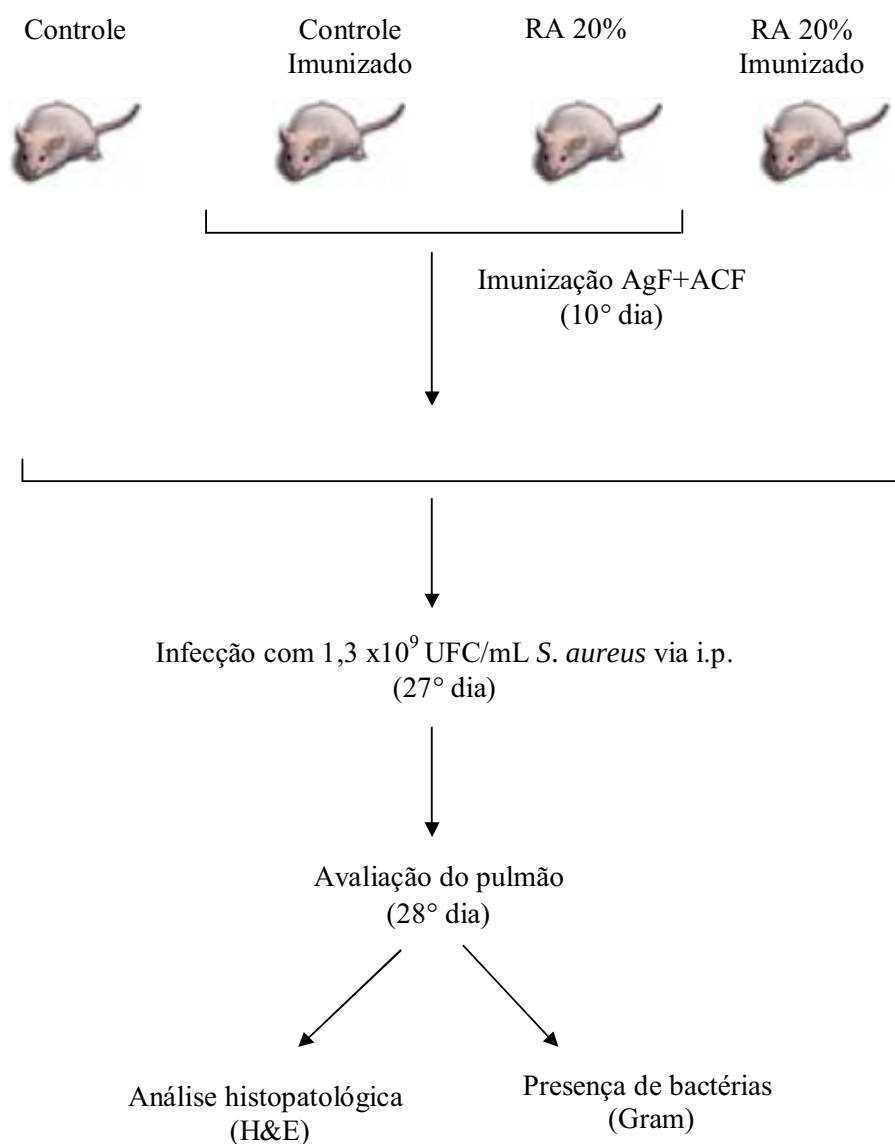


Figura 13: Efeito da desnutrição na imunidade protetora e na susceptibilidade à infecção com *S. aureus*. UFC/g de pulmão (a) e presença de bacteremia UFC/50 - 100µL de sangue (b) em camundongos BALB/c subnutridos, imunizados com *S. aureus* formolizado e posteriormente infectados. Os resultados são mostrados como média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo.

4.5- Protocolo Experimental III.c: Avaliação do processo inflamatório e da presença de bactérias em pulmão de animais submetidos a restrição alimentar.



4.5.1- Resultados do Protocolo Experimental III.c

A estrutura pulmonar foi avaliada através de dois tipos de coloração: H&E e Gram. A análise histopatológica com H&E mostrou que a estrutura pulmonar nos animais do grupo controle encontrava-se normal, ou seja, podiam ser observados os espaços alveolares e ausência de inflamação (figura 14a). Parte deste parênquima pulmonar encontrava-se comprometido por um processo inflamatório nos animais do grupo controle (animais sem restrição alimentar) que foram infectados com *S. aureus* (figura 14c). Grande parte deste processo inflamatório diminuiu nos animais do grupo controle que foram imunizados antes da infecção (figura 14e). O cenário histopatológico no grupo de animais desnutridos foi distinto, ou seja, já existia um processo inflamatório instalado no parênquima pulmonar antes mesmo da infecção (figura 14b) e o mesmo permaneceu bastante similar nos animais infectados (figura 14d), independentemente do processo prévio de imunização (figura 14f).

A análise dos cortes corados pelo Gram mostrou, como esperado, ausência de cocos típicos em animais não infectados, independentemente dos mesmos serem normais (figura 15a) ou submetidos a restrição alimentar (figura 15b). Grande quantidade de cocos foi observada nos animais do grupo controle (sem restrição alimentar) infectados com *S. aureus* (figura 15c). Por outro lado, ocorreu redução muito acentuada no número de bactérias neste órgão em camundongos normais que tinham sido imunizados antes da infecção com *S. aureus* (figura 15e). A quantidade de bactérias no pulmão de camundongos subnutridos era bem menor do que a visualizada em animais do grupo controle (figura 15d). Além disto, o processo de imunização dos animais subnutridos não foi acompanhado de redução na quantidade de bactérias presentes no pulmão (figura 15f).

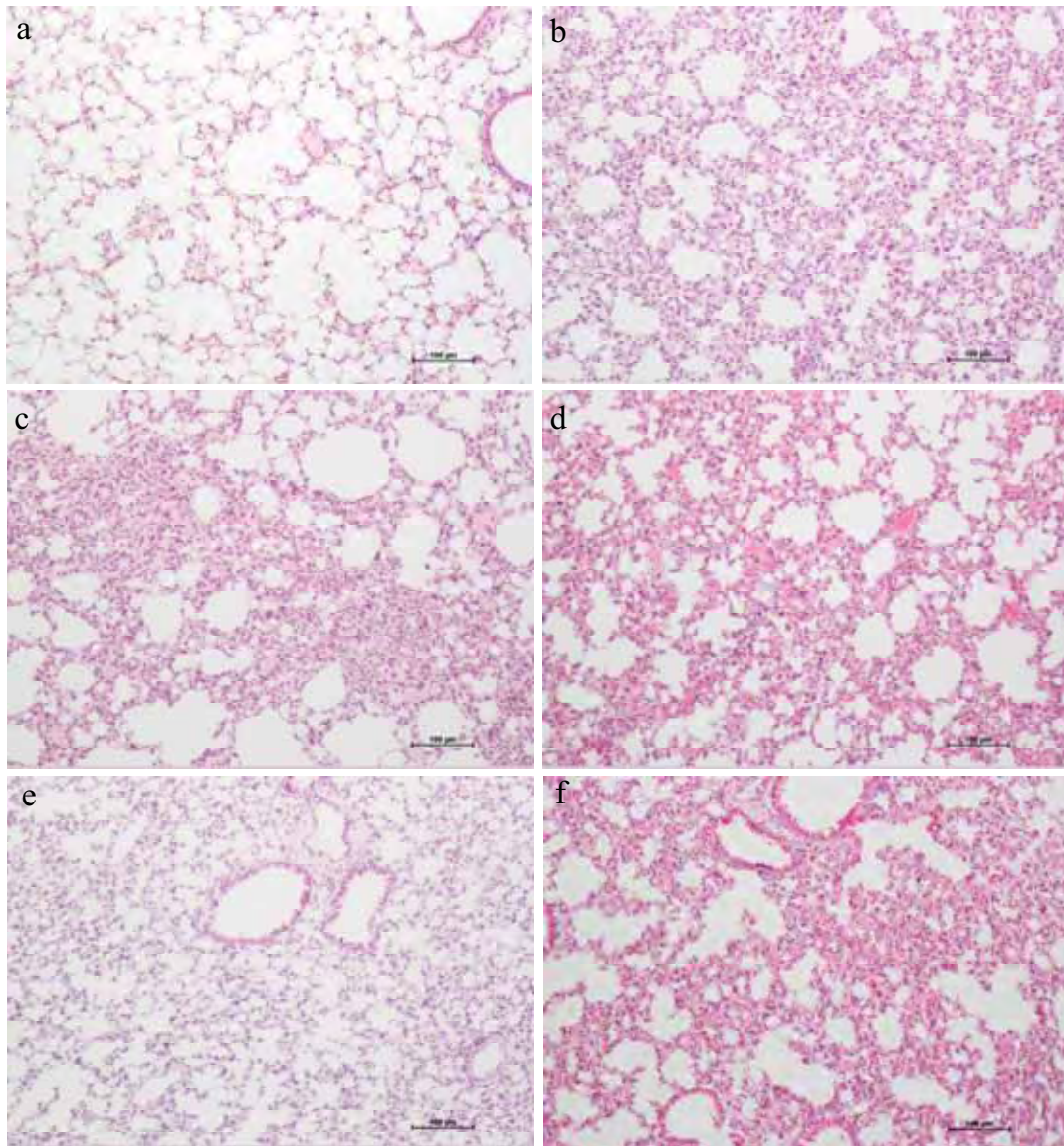


Figura 14: Efeito da desnutrição na estrutura pulmonar de camundongos BALB/c submetidos à imunização e infecção com *S. aureus*. a- normal; b- subnutrido; c- normal infectado; d- subnutrido infectado; e- normal imunizado e infectado; f- subnutrido imunizado e infectado.

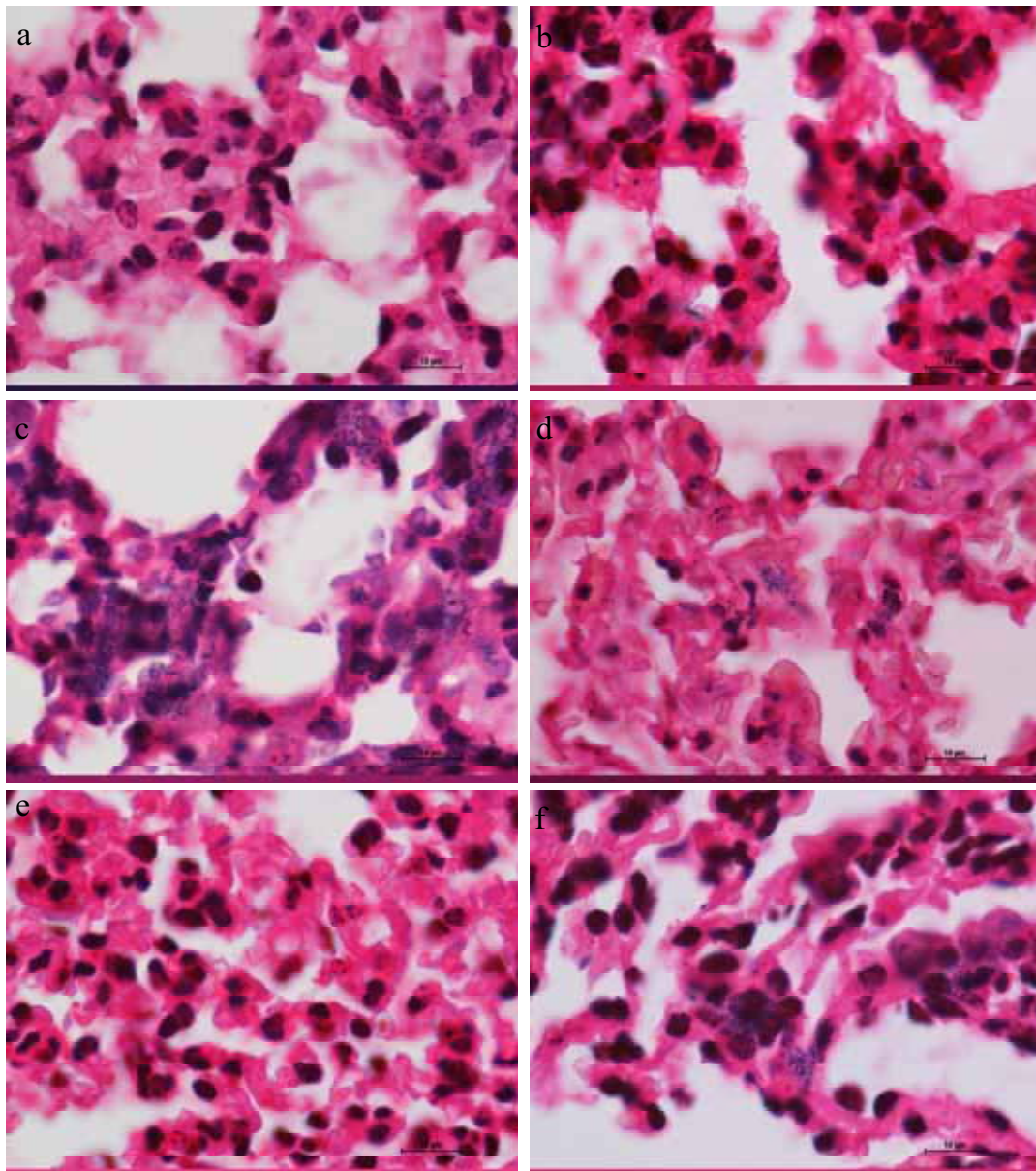


Figura 15: Efeito da desnutrição na presença de bactérias no pulmão de camundongos BALB/c submetidos à imunização e infecção com *S. aureus*. a- normal; b- subnutrido; c- normal infectado; d- subnutrido infectado; e- normal imunizado e infectado; f- subnutrido imunizado e infectado.

5 – Discussão

Está bem estabelecido, tanto em modelos experimentais quanto em seres humanos que a desnutrição diminui a eficácia da resposta imune e consequentemente aumenta a susceptibilidade aos agentes infecciosos (Calder & Jackson, 2000). Para combater estes agentes, o sistema imunológico utiliza mecanismos associados com a resposta imune inata e específica. Estes dois tipos de resposta envolvem uma rede complexa de interações celulares e moleculares que requerem replicação de DNA, expressão de mRNA e síntese protéica e todos estes eventos biológicos necessitam grande quantidade de energia. Consequentemente é esperado que o “status” nutricional do hospedeiro afete de forma crítica a evolução da maioria dos processos infecciosos. Em alguns casos como tuberculose, malária, parasitoses intestinais e sarampo este efeito deletério tem sido cientificamente investigado (Pelletier et al., 1994; Singal et al., 2005). Entretanto, em alguns tipos de infecção esta abordagem é escassa. Este é o caso das infecções por *S. aureus*. Dentro deste contexto, os objetivos principais desta investigação foram caracterizar um modelo experimental de subnutrição e avaliar se a mesma afetava a susceptibilidade à infecção por *S. aureus*.

Este trabalho foi iniciado pelo estabelecimento de um modelo experimental de desnutrição. Para isto, camundongos BALB/c fêmeas foram submetidos a diferentes percentuais de restrição alimentar (10, 20 e 30%). Estes percentuais foram estabelecidos em função da quantidade total de alimento (em peso) consumido por um grupo de animais controle. Esta restrição foi mantida durante 40 dias e vários parâmetros foram avaliados no decorrer desta restrição. O grupo experimental submetido a 30% de restrição alimentar apresentou baixa sobrevivência, não tendo sido, por isto, incluído nas avaliações. O peso corporal foi avaliado diariamente e indicou que a restrição alimentar tanto de 10 quanto de 20% determinou perda significativa de peso já no terceiro dia de restrição. A perda de peso foi contínua nos animais submetidos à restrição alimentar enquanto que no grupo controle os animais apresentaram aumento de peso. Esta perda de peso é um dado importante, pois os critérios de subnutrição são baseados preferencialmente na relação entre peso/idade e peso/altura (Müller & Krawinkel, 2005).

As dosagens bioquímicas indicaram decréscimo significativo no nível de triglicerídeos tanto aos 20 quanto aos 40 dias de restrição alimentar de 10 e 20%. O nível sérico de proteínas totais não foi alterado aos 20 dias, mas encontrava-se significativamente aumentado aos 40 dias. Estes achados são difíceis de explicar, pois são

discordantes dos resultados esperados e descritos na literatura (Houssaïni et al., 1999; Landgraf et al., 2007). Os níveis de colesterol não foram alterados no decurso da restrição. Este achado também é discordante de alguns relatos, como por exemplo, Houssaïni et al. (1999), demonstraram redução significativa nos níveis de colesterol total e LDL. Atribuímos esta possível disparidade com os dados da literatura, pelo menos parcialmente, aos kits utilizados os quais se destinavam à dosagem sérica dos níveis totais e não das diferentes frações protéicas ou tipos de colesterol.

O leucograma permitiu um achado considerado fundamental neste trabalho pois mostrou que a restrição de 20% mas não a de 10% determinou queda significativa nos níveis de leucócitos totais e que isto coincidiu com uma queda também significativa nos níveis de linfócitos. Esta diminuição foi constatada aos 20 dias e se manteve aos 40 dias. Teria sido muito esclarecedor se o leucograma tivesse sido também realizado aos 10 dias de restrição alimentar, pois este é um dos períodos de imunização. Esta queda acentuada nos linfócitos periféricos sugere que os linfócitos T sejam os mais afetados, pois sabe-se que esta população celular circula mais entre os órgãos linfóides e o sangue enquanto que os linfócitos B ficam mais restritos aos folículos linfóides dos órgãos linfóides secundários (Abbas & Lichtman, 2003). Neste sentido seria interessante complementar este trabalho com a determinação de subpopulações celulares, por FACS, por exemplo, no sangue periférico e nos órgãos linfóides secundários dos animais subnutridos.

É fortemente documentado na literatura que grande parte das funções efectoras e reguladoras das células T é mediada por citocinas. O perfil da produção de citocinas foi distinto aos 20 e 40 dias de restrição. Aos 20 dias observou-se queda significativa nos três mediadores avaliados (IL-4, IL-5 e IFN- γ) nas culturas estimuladas com ConA oriundas de animais submetidos a 20% mas não a 10% de restrição alimentar. Estes dados são interessantes e coincidentes com a queda acentuada no número de linfócitos citados anteriormente. Gostaríamos de ressaltar que esta queda é significativa, mas que continua ocorrendo produção parcial das três citocinas. Por outro lado, os resultados referentes aos 40 dias de restrição são mais difíceis de explicar e seu entendimento precisaria de uma avaliação mais minuciosa. Neste caso, a produção das três citocinas pelos animais desnutridos foi similar a dos animais normais quando utilizou-se o estímulo ConA. Uma possível explicação para este achado, pelo menos no que concerne à restauração dos níveis de IL-4 e IL-5, seria uma inversão na relação Th1/Th2, ou seja, um aumento no percentual de células Th2. Esta possibilidade tem suporte na literatura. Foi demonstrado, por exemplo, em modelo experimental de desnutrição aguda, considerando os níveis de Igs do tipo Th1

(IgG2a e IgG3) e do tipo Th2 (IgG1, IgG2b e IgE), que ocorre uma predominância de Igs do tipo Th2 (Neyestani et al., 2004). Dados similares foram recentemente descritos em crianças desnutridas. González-Martínez et al., 2008, mostraram através da expressão de mRNA, que ocorre aumento de TNF- α , IL-4 e IL-10 e diminuição de IL-6, IL-2 e IFN- γ nestas crianças comparativamente aos valores presentes em crianças saudáveis.

A análise histopatológica do timo só foi realizada nos animais submetidos a 20% de restrição alimentar e os resultados condizem com os demais resultados observados por nós neste modelo e também são totalmente coerentes com os dados da literatura. A restrição alimentar determinou atrofia evidente neste órgão tanto aos 10 quanto aos 40 dias e isto pode ser comprovado também pela perda significativa de peso neste órgão. Os animais submetidos a 20% de restrição alimentar durante 40 dias perderam cerca de 52% do peso do timo em comparação aos animais do grupo controle (dados não mostrados). Estes resultados estão de acordo com Savino (2002), que considera o timo o órgão mais afetado pela desnutrição. Este autor descreveu as principais alterações tímicas causadas pela desnutrição, dentre as quais destaca a depleção de timócitos por apoptose, comprometendo assim, a maturação de células TCD4+ e TCD8+. Outras alterações importantes descritas são as que envolvem o microambiente tímico, ou seja, com a desnutrição ocorre também alteração morfológica das células do epitélio tímico com consequente diminuição da secreção hormonal. Em relação a estes achados gostaríamos de ressaltar alguns aspectos. O primeiro deles se refere à presença de alterações no timo já aos 10 dias de restrição alimentar, ou seja, no momento da imunização com antígenos de *S. aureus*. Por outro lado é possível que estas alterações não tenham afetado a resposta imune neste período, pois sabe-se que animais adultos já tem um *pool* de linfócitos na periferia, incluindo células T de memória, para a maioria dos antígenos presentes no meio ambiente. As alterações no timo precederam as alterações detectadas no intestino delgado que constitui uma parte significativa do sistema linfóide secundário. A aparência histológica observada nos animais subnutridos por 10 dias foi muito similar aquela encontrada em animais com dieta normal, ou seja, foram observadas vilosidades intestinais com borda em escova, glândulas intestinais, submucosa, camada muscular e serosa. A avaliação feita aos 40 dias de restrição alimentar revelou vilosidades intestinais mais curtas, com formato irregular e perda das bordas em escova. Tem sido descrito que estas alterações intestinais afetam não só a função de absorção dos alimentos como também as funções relacionadas com a resposta imune nas mucosas como, por exemplo, a eliminação não específica de patógenos e a neutralização mediada por IgA (Hulsewé et al., 1999).

Esta primeira etapa do trabalho nos permitiu escolher o percentual de restrição alimentar de 20% para dar continuidade a esta investigação uma vez que o mesmo determinou alterações condizentes com as classicamente associadas com a subnutrição. Apesar do foco deste trabalho estar centrado no *S. aureus*, iniciamos esta segunda etapa avaliando o efeito da desnutrição na resposta imune após imunização com eritrócitos de carneiro (EC). Este modelo é clássico dentro da imunologia e permite, através de uma metodologia bem conhecida e simples que é a hemaglutinação, determinar os níveis de IgM e IgG específicos para eritrócitos. Os resultados mostraram que a desnutrição não afetou a produção de anticorpos específicos para este antígeno. Estes resultados diferem do trabalho publicado por Filteau et al. (1987), no qual os autores constataram redução na síntese de IgM e IgG anti-EC. É possível que esta diferença se deva à idade dos animais utilizados, ou seja, estes autores utilizaram camundongos recém-desmamados enquanto nós utilizamos camundongos adultos. Por outro lado, estes resultados são similares aos descritos por Moore et al. (2003). Estes autores demonstraram que o processo de produção de anticorpos contra várias vacinas se manteve intacto em crianças com diferentes graus de desnutrição devida a um ou mais nutrientes. Existe atualmente um consenso geral na literatura de que a produção de anticorpos e seu efeito protetor possam variar na subnutrição, dependendo pelo menos em parte, do antígeno em questão.

O *S. aureus* é considerado uma causa importante tanto de infecções nosocomiais quanto de infecções adquiridas por contatos com a comunidade de forma geral. Além de ser relevante nas infecções humanas, esta bactéria também é causa de infecções em animais, especialmente de mastite em gado leiteiro. Vacinas para prevenir estas infecções vem sendo estudadas por muitos anos, mas por uma série de razões não tem se obtido sucesso nesta área (Middleton, 2008; Middleton et al., 2009). Neste contexto, testamos duas preparações antigênicas derivadas de *S. aureus*: uma contendo bactérias inteiras formolizadas (AgF) e outra contendo antígenos solúveis (AgS), quanto à capacidade de induzir anticorpos e de determinar um efeito protetor em camundongos normais. As duas preparações induziram níveis significativos de IgG1, mas não de IgG2a específicos. A avaliação da carga bacteriana no baço não indicou efeito protetor neste órgão. Entretanto, carga bacteriana menor foi observada no pulmão dos animais previamente imunizados com os dois tipos de antígenos. No caso de AgS esta queda foi inclusive estatisticamente significativa. Testamos então o efeito da desnutrição na imunidade protetora e na susceptibilidade à infecção com *S. aureus*. Como esperado, confirmamos que o processo de restrição alimentar foi eficaz pois determinou queda significativa tanto no peso quanto

no número de linfócitos. A avaliação do número de UFC, realizada no baço, fígado e pulmão sugeriu que camundongos normais e subnutridos eram similarmente suscetíveis à infecção pelo *S. aureus*. Considerando ainda o número de UFC, constatamos que o efeito da imunização foi diferente em animais normais e subnutridos; ocorreu proteção parcial nos animais normais, mas não nos subnutridos. Além disto, este efeito protetor da imunização prévia dependeu do órgão avaliado, tendo ocorrido no fígado e no pulmão, mas não no baço. Não fizemos uma avaliação quantitativa do número de bactérias no sangue, entretanto, constatamos carga bacteriana elevada em amostras de sangue de todos os animais dos quatro grupos experimentais. Como os animais não foram perfundidos antes da obtenção das amostras teciduais para posterior plaqueamento, pensamos na possibilidade da bacteremia estar interferindo no número de UFC. Para esclarecer este aspecto, repetimos o processo de imunização seguido de infecção nos animais normais e subnutridos, e escolhemos o pulmão para fazer uma análise histopatológica mais detalhada. Para isto cortes deste órgão foram corados com H&E e Gram. Como previsto, a estrutura pulmonar no grupo controle encontrava-se normal, ou seja, foram observados ausência total de inflamação e espaços alveolares bem definidos. No grupo de animais normais (não subnutridos) mas infectados com *S. aureus* se observou, também como esperado, um processo inflamatório evidente que diminuiu de forma acentuada quando estes animais foram previamente imunizados com AgF. Estes dados obtidos no protocolo III.c coincidiram com a ausência de bactérias observada no pulmão deste grupo experimental no protocolo III.b. Além disto, e talvez ainda mais interessante, foram as informações obtidas pela coloração de Gram que confirmaram a presença de grande quantidade de bactérias no pulmão dos animais normais infectados e sua quase erradicação no caso de imunização com AgF antes da infecção.

Esta análise histopatológica pulmonar revelou vários aspectos interessantes, sendo que alguns deles foram surpreendentes e não coincidiram com os resultados do número de UFC. A coloração de H&E mostrou que, diferentemente dos animais normais, os animais subnutridos apresentavam um processo inflamatório pulmonar difuso sem terem sido previamente infectados. Não investigamos a causa do mesmo, mas é possível que agentes presentes no meio ambiente, os quais não determinam infecção em animais normais, estivessem causando doença nos animais subnutridos. Outro aspecto que nos chamou atenção foi a não alteração desta inflamação em animais infectados, ou seja, a presença da bactéria no pulmão, o que foi constatado pela coloração de Gram, não incentivou maior afluxo de células inflamatórias para o pulmão. Além disto, processo inflamatório não

parece ter mudado suas características mesmo após imunização prévia. A comparação visual de cortes de animais normais e subnutridos, infectados com *S. aureus* e corados com Gram, mostrou um resultado bastante distinto do observado a partir do número de UFC feito com homogenato pulmonar, ou seja, um número muito maior de bactérias nos pulmões dos animais normais.

Apesar das diferentes abordagens adotadas, os resultados obtidos até o momento não permitem comparar, de forma definitiva, a susceptibilidade à infecção pelo *S. aureus* entre camundongos normais e subnutridos. Entretanto, estes resultados nos permitem tecer algumas observações que consideramos relevantes e que poderão ser futuramente investigadas. Apesar do número de UFC indicar susceptibilidade semelhante entre animais normais e subnutridos, a pequena quantidade de bactérias no pulmão dos animais subnutridos sugere que neste órgão existe uma certa “resistência” que impede a multiplicação bacteriana. Esta “resistência” poderia ser oriunda do processo inflamatório pulmonar que já está instalado antes da infecção com *S. aureus* ou, alternativamente, poderia resultar de uma falta de substrato alimentar neste tecido para o crescimento bacteriano. Apesar da concordância geral de que a subnutrição aumenta a susceptibilidade aos agentes infecciosos, alguns relatos mostram menor susceptibilidade justamente pela falta de algum componente nutricional (Mitangala et al., 2008).

Analizados de forma conjunta, os dados mostrados neste trabalho indicam que a restrição alimentar de 20% desencadeou várias alterações, incluindo queda no peso corporal e no número de linfócitos, atrofia tímica e alteração no epitélio do intestino delgado, as quais são condizentes com uma imunodeficiência secundária associada com a desnutrição. A metodologia que determina o número de UFC a partir de homogenatos teciduais não mostrou diferença na susceptibilidade à infecção pelo *S. aureus*. Entretanto, a análise histopatológica indicou que o número de bactérias nos pulmões é menor nos animais subnutridos. Além disto, este tipo de avaliação também mostrou que o processo de imunização foi eficaz no controle da infecção pulmonar nos animais normais mas não nos animais subnutridos.

6- Conclusões

1. Camundongos BALB/c submetidos à restrição alimentar de 20% desenvolveram subnutrição caracterizada por perda significativa de peso corporal e número de linfócitos, alteração na produção de citocinas e atrofia no timo e epitélio intestinal.
2. O número de UFC indicou susceptibilidade similar nos grupos normal e subnutrido enquanto que a avaliação histopatológica pela coloração de Gram mostrou maior quantidade de bactérias no pulmão.
3. O processo de imunização controlou eficazmente a multiplicação bacteriana no pulmão dos animais normais mas não dos animais subnutridos.
4. Camundongos normais apresentaram inflamação pulmonar só após infecção com *S. aureus* e a imunização prévia específica preveniu esta inflamação.
5. Camundongos subnutridos já apresentavam inflamação pulmonar antes da infecção e esta inflamação não foi alterada pela infecção ou pela imunização específica.

7- Referências Bibliográficas*

1. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
2. Abe M, Akbar F, Matsuura B, Horiike N, Onji M. Defective antigen-presenting capacity of murine dendritic cells during starvation. *Nutrition*. 2003; 19: 265-9.
3. Agarwal D, Chakravarty J, Sundar S, Gupta V, Bhatia BD. Correlation between clinical features and degree of immunosuppression in HIV infected children. *Indian Pediatr*. 2008; 45: 140-3.
4. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 1996; 382: 250-2.
5. Alam NH, Hamadani JD, Dewan N, Fuchs GJ. Efficacy and safety of a modified oral rehydration solution (ReSoMaL) in the treatment of severely malnourished children with watery diarrhea. *J Pediatr*. 2003; 143: 614-9.
6. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol*. 2000; 61: 1-10.
7. Bannerman TL. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover JC, editors. *Manual of clinical microbiology*. Washington: American Society Microbiology; 2003. p. 384-404.
8. Beck MA. Selenium and vitamin E status: impact on viral pathogenicity. *J Nutr*. 2007; 137: 1338-40.
9. Beisel WR. Nutrition in pediatric HIV infection: setting the research agenda. Nutrition and immune function: overview. *J Nutr*. 1996; 126: 2611S-5.
10. Bergdoll MS. Symposium on microbiology update: old friends and new enemies. Staphylococcus aureus. *J Assoc Off Anal Chem*. 1991; 74: 706-10.
11. Bhan MK, Bhandari N, Bahl R. Management of the severely malnourished child: perspective from developing countries. *Br Med J*. 2003; 326: 146-51.
12. Black R. Micronutrient deficiency: an underlying cause of morbidity and mortality. *Bull World Health Organ*. 2003; 81: 79.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references. [homepage on the Internet]. Bethesda: U. S. National Library of Medicine; 2003 [last update 2003 July 09; cited 2005 Jun 01]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html. National Library of Medicine. List of journal indexed in Index Medicus. Washington; 2003. 240p.

13. Black RE, Morris SS, Bryce J. Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet*. 2003; 361: 2226-34.
14. Calder PC, Jackson AA. Undernutrition, infection and immune function. *Nutr Res Rev*. 2000; 13: 3-29.
15. Caulfield LE, Richard SA, Black RE. Undernutrition as an underlying cause of malaria morbidity and mortality in children less than five years old. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 71: 55-63.
16. Cegielski JP, McMurray DN. The relationship between malnutrition and tuberculosis: evidence from studies in humans and experimental animals. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004; 8: 286-98.
17. Chandra RK. Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr*. 2002; 56-3: S73-6.
18. Chatraw JH, Wherry EJ, Ahmed R, Kapasi ZF. Diminished primary CD8 T cell response to viral infection during protein energy malnutrition in mice is due to changes in microenvironment and low numbers of viral-specific CD8 T cell precursors. *J Nutr*. 2008; 138: 806-12.
19. Chen LC, Chowdhury A, Huffman SL. Anthropometric assessment of energy-protein malnutrition and subsequent risk of mortality among preschool aged children. *Am J Clin Nutr*. 1980; 33: 1836-45.
20. Chong VH. Hepatobiliary tuberculosis: a review of presentations and outcomes. *South Med J*. 2008; 101: 356-61.
21. Cook E, Wang X, Robiou N, Fries BC. Measurement of *Staphylococcus enterotoxin B* in serum and culture supernatant with a capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Vaccine Immunol*. 2007; 14: 1094-101.
22. Cortés-Barberena E, González-Márquez H, Gómez-Olivares JL, Ortiz-Muñoz R. Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry. *Clin Exp Immunol*. 2008; 152: 585-92.
23. Cunningham-Rundles S, McNeeley DF, Moon A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115: 1119-28.
24. de Mello MA, Luciano E, Carneiro EM, Latorraca MQ, Machado de Oliveira CA, Boschero AC. Glucose homeostasis in pregnant rats submitted to dietary protein restriction. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 2003; 113-114: 229-46.

25. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 16-34.
26. Donnelly CB, Leslie JE, Black LA, Lewis KH. Serological identification of enterotoxigenic *Staphylococcus* from cheese. *Appl Microbiol.* 1967; 15: 1382-7.
27. Dryla A, Prustomersky S, Gelbmann D, Hanner M, Bettinger E, Kocsis B, et al. Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy individuals and in acutely infected patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12: 387-98.
28. Enwonwu CO, Falkler Jr WA, Phillips RS. Noma (cancrum oris). *Lancet.* 2006; 368: 147-56.
29. Fernández RG, Leehan JA, Pastrana RF, Muñoz RO. Effect of malnutrition on K+ current in T lymphocytes. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12: 808-13.
30. Filteau SM, Perry KJ, Woodward B. Triiodothyronine improves the primary antibody response to sheep red blood cells in severely undernourished weanling mice. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1987; 185: 427-33.
31. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 93-129.
32. Fock RA, Vinolo MA, de Moura Sá Rocha V, de Sá Rocha LC, Borelli P. Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-alpha in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. *Cytokine.* 2007; 40: 105-14.
33. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Quase um bilhão de pessoas passam fome no mundo. *Diz FAO.* [cited 2008 Dez 09]. Available from: <http://www.estadao.com.br/economia>
34. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3: 948-58.
35. González-Martínez H, Rodríguez L, Nájera O, Cruz D, Miliar A, Domínguez A, et al. Expression of cytokine mRNA in lymphocytes of malnourished children. *Clin Immunol.* 2008; 28: 593-9.
36. Grossniklaus DA, O'Brien MC, Clark PC, Dunbar SB. Nutrient intake in heart failure patients. *J Cardiovasc Nurs.* 2008; 23: 357-63.
37. Haag-Weber M, Dumann H, Hörl WH. Effect of malnutrition and uremia on impaired cellular host defence. *Miner Electrolyte Metab.* 1992; 18: 174-85.
38. Hesham MS, Edariah AB, Norhayati M. Intestinal parasitic infections and micronutrient deficiency: a review. *Med J Malaysia.* 2004; 59: 284-93.

39. Hillyer L, Whitley C, Olver A, Webster M, Steevels T, Woodward B. Adoptively transferred dendritic cells restore primary cell-mediated inflammatory competence to acutely malnourished weanling mice. *Am J Pathol.* 2008; 172: 378-85.
40. Honda M, Kamiyama Y, Kawamura K, Kawahara K, Shishido S, Nakai H, et al. Growth, development and nutritional status in Japanese children under 2 years on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Pediatr Nephrol.* 1995; 9: 543-8.
41. Houssanini FZ, Foulon T, Iraqi MR, Payen N, Gros Lambert P. Lipids, proteins, and fatty acids during infantile marasmus in the Fés areas of Morocco. *Biomed Pharmacother.* 1999; 53: 278-83.
42. Huiming Y, Chaomin W, Meng M. Vitamin A for treating measles in children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005; 19: CD001479.
43. Hulsewé KW, van Acker BA, von Meyenfeldt MF, Soeters PB. Nutritional depletion and dietary manipulation: effects on the immune response. *World J Surg.* 1999; 23: 536-44.
44. Hussain R, Shiratsuchi H, Phillips M, Ellner J, Wallis RS. Opsonizing antibodies (IgG1) up-regulate monocyte proinflammatory cytokines tumour necrosis factor- α (TNF- α) and IL-6 but not anti-inflammatory cytokine IL-10 in mycobacterial antigen-stimulated monocytes-implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol.* 2001; 123: 210-8.
45. Katona P, Katona-Apte J. The interaction between nutrition and infection. *Clin Infect Dis.* 2008; 46: 1582-8.
46. Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus and micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of clinical microbiology*. Washington: American Society Microbiology; 1995. p.282-98.
47. Koski KG, Scott ME. Gastrointestinal nematodes, nutrition and immunity: breaking the negative spiral. *Annu Rev Nutr.* 2001; 21: 297-321.
48. Landgraf MA, Toste Rde C, Borelli P, Zorn TM, Nigro D, Carvalho MH, et al. Mechanisms involved in the reduced leukocyte migration in intrauterine undernourishment. *Nutrition.* 2007; 23: 145-56.
49. Lenaerts K, Sokolović M, Bouwman FG, Lamers WH, Mariman EC, Renes J. Starvation induces phase-specific changes in the proteome of mouse small intestine. *J Proteome Res.* 2006; 5: 2113-22.

50. Man WD, Weber M, Palmer A, Schneider G, Wadda R, Jaffar S, et al. Nutritional status of children admitted to hospital with different diseases and its relationship to outcome in The Gambia, West Africa. *Trop Med Int Health*. 1998; 3: 678-86.
51. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001; 106: 255-8.
52. Middleton JR, Luby CD, Adams DS. Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: a review and new data. *Vet Microbiol*. 2009; (134): 192-8.
53. Middleton JR. Staphylococcus aureus antigens and challenges in vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 2008; 7: 805-15.
54. Millward DJ, Jackson AA. Protein/energy ratios of current diets in developed and developing countries compared with a safe protein/energy ratio: implications for recommended protein and amino acid intakes. *Public Health Nutr*. 2004; 7: 387-405.
55. Mitangala Ndeba P, Hennart P, D'Alessandro U, Donnen P, Porignon D, Bisimwa Balaluka G, et al. Proteoenergetic malnutrition and malaria-related morbidity in children under 59 months in the Kivu region of the Democratic Republic of the Congo. *Med Trop (Mars)*. 2008; 68: 51-7.
56. Montoya M, Gouaux E. Beta-barrel membrane protein folding and structure viewed through the lens of alpha-hemolysin. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1609: 19-27.
57. Moore SE, Goldblatt D, Bates CJ, Prentice AM. Impact of nutritional status on antibody responses to different vaccines in undernourished Gambian children. *Acta Paediatr*. 2003; 92: 170-6.
58. Müller O, Krawinkel M. Malnutrition and health in developing countries. *CMAJ*. 2005; 173: 279-86.
59. Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 2000; 95: 3032-43.
60. Neyestani TR, Woodward B. Blood concentrations of Th2-type immunoglobulins are selectively increased in weanling mice subjected to acute malnutrition. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005; 230: 128-34.
61. Nnoaham KE, Clarke A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 2008; 37: 113-9.
62. Opilla M. Epidemiology of bloodstream infection associated with parenteral nutrition. *Am J Infect Control*. 2008; 36: S173.e5-8.

63. Oumeish OY, Oumeish I. Nutritional skin problems in children. *Clin Dermatol.* 2003; 21: 260-3.
64. Palmqvist N, Foster T, Tarkowski A, Josefsson E. Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and death. *Microb Pathog.* 2002; 33: 239-49.
65. Pelletier DL, Frongillo Jr EA, Schroeder DG, Habicht JP. A methodology for estimating the contribution of malnutrition to child mortality in developing countries. *J Nutr.* 1994; 124: 2106S-22.
66. Perry RT, Halsey NA. The clinical significance of measles: a review. *J Infect Dis.* 2004; 189: S4-16.
67. Petro TM, Schwartz KM, Chen SS. Production of IL2 and IL3 in syngeneic mixed lymphocyte reactions of BALB/c mice are elevated during a period of moderate dietary protein deficiency. *Immunol Invest.* 1994; 23: 143-52.
68. Phillips RJ, Crock CM, Dillon MJ, Clayton PT, Curran A, Harper JI. Cystic fibrosis presenting as kwashiorkor with florid skin rash. *Arch Dis Child.* 1993; 69: 446-8.
69. Prentice A, Goldberg GR, Schoenmakers I. Vitamin D across the lifecycle: physiology and biomarkers. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88: 500S-6.
70. Redmond HP, Shou J, Kelly CJ, Schreiber S, Miller E, Leon P, et al. Immunosuppressive mechanisms in protein-calorie malnutrition. *Surgery.* 1991; 110: 311-7.
71. Rice AL, Sacco L, Hyder A, Black RE. Malnutrition as an underlying cause of childhood deaths associated with infectious diseases in developing countries. *Bull World Health Organ.* 2000; 78: 1207-21.
72. Rodríguez L, González C, Flores L, Jiménez-Zamudio L, Graniel J, Ortiz R. Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12: 502-7.
73. Rooijackers SH, Ruyken M, Roos A, Daha MR, Presanis JS, Sim RB, et al. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol.* 2005; 6: 920-7.
74. Rubinstein E. *Staphylococcus aureus* bacteraemia with known sources. *Int J Antimicrob Agents.* 2008; 32: S18-20.
75. Sakai T, Mitsuya K, Kogiso M, Ono K, Komatsu T, Yamamoto S. Protein deficiency impairs DNA vaccine-induced antigen-specific T cell but not B cell response in C57BL/6 mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2006; 52: 376-82.

76. Sakamoto M, Fujisawa Y, Nishioka K. Physiologic role of the complement system in host defense, disease, and malnutrition. *Nutrition*. 1998; 14: 391-8.
77. Sakurada S, Shido O, Sugimoto N, Hiratsuka Y, Yoda T, Kanosue K. Autonomic and behavioural thermoregulation in starved rats. *J Physiol*. 2000; 2: 417-24.
78. Sasaki S, Tagawa YI, Iwakura Y, Nakane A. The role of gamma interferon in acquired host resistance against *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Immunol Med Microbiol*. 2006; 46: 367-74.
79. Savino W. The thymus gland is a target in malnutrition. *Eur J Clin Nutr*. 2002; 56: S46-9.
80. Schaible UE, Kaufmann SH. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. *PLoS Med*. 2007; 4: 115.
81. Schofield C, Ashworth A. Why have mortality rates for severe malnutrition remained so high? *Bull World Health Organ*. 1996; 74: 223-9.
82. Scrimshaw NS, SanGiovanni JP. Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *Am J Clin Nutr*. 1997; 66: 464S-77.
83. Scrimshaw NS, Taylor CE, Gordon JE. Interactions of nutrition and infection. *Nutr Rev*. 1990; 48: 402-5.
84. Shankar AH. Nutritional modulation of malaria morbidity and mortality. *J Infect Dis*. 2000; 182: S37-53.
85. Singal A, Pandhi D, Agrawal SK. Multifocal scrofuloderma with disseminated tuberculosis in a severely malnourished child. *Pediatr Dermatol*. 2005; 22: 440-3.
86. Speziale P, Visai L, Rindi S, Pietrocola G, Provenza G, Provenzano M. Prevention and treatment of *staphylococcus* biofilms. *Curr Med Chem*. 2008; 15: 3185-95.
87. Stapleton PP, Fujita J, Murphy EM, Naama HA, Daly JM. The influence of restricted calorie intake on peritoneal macrophage function. *Nutrition*. 2001; 17: 41-5.
88. Stephen CA, Thame MM, Gray R, Barker D, Wilks R, Forrester TE, et al. Primary malnutrition. Can we always tell? *West Indian Med J*. 2002; 51: 148-52.
89. Stephensen CB, Jiang X, Freytag T. Vitamin A deficiency increases the in vivo development of IL-10-positive Th2 cells and decreases development of Th1 cells in mice. *J Nutr*. 2004; 134: 2660-6.
90. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Procariotos: domínios bactéria e Archaea. In: *Microbiologia*. 8a ed. Porto Alegre: Artmed; 2005. cap.11, p.305-33.

91. Trabulsi LR, Alterthum F, editors. *Staphylococcus aureus*. In: Microbiologia. 4a ed. São Paulo: Atheneu; 2004. cap.20, p.175-259.
92. Trülzsch K, Rinder H, Trček J, Bader L, Wilhelm U, Heesemann J. "Staphylococcus pettenkoferi", a novel staphylococcal species isolated from clinical specimens. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2002; (43): 175-82.
93. Udani PM. BCG vaccination in India and tuberculosis in children: newer facets. *Indian J Pediatr*. 1994; 61: 451-62.
94. van Den Broeck J, Eeckels R, Vuylsteke J. Influence of nutrition status on child mortality in rural Zaire. *Lancet*. 1993; 341: 1491-5.
95. Vidueiros SM, Fernandez I, Slobodianik N, Roux ME, Pallaro A. Nutrition disorder and immunologic parameters: study of the intestinal villi in growing rats. *Nutrition*. 2008; 24: 575-81.
96. Waters WR, Palmer MV, Nonnecke BJ, Whipple DL, Horst RL. Mycobacterium bovis infection of vitamin D-deficient NOS2-/-mice. *Microb Pathog*. 2004; 36: 11-7.
97. Wiedermann U, Tarkowski A, Bremell T, Hanson LA, Kahu H, Dalhgren UI. Vitamin A deficiency predisposes to Staphylococcus aureus infection. *Infect Immun*. 1996; 64: 209-14.
98. Williams CD, Oxon BM, Lond H. Kwashiorkor: a nutritional disease of children associated with a maize diet. 1935. *Bull World Health Organ*. 2003; 81: 912-3.
99. Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Ann Nutr Metab*. 2007; 51: 301-23.
100. World Health Organization. World health report. Geneva: The Organization; 2002.
101. Wu B, Tang Y, Zhu J. High risk factor lead to nosocomial pulmonary infection caused by MRSA. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2000; 23: 413-6.
102. Young DB, Duncan K. Prospects for new interventions in the treatment and prevention of mycobacterial disease. *Annu Rev Microbiol*. 1995; 49: 641-73.

8- Anexos

8.1- Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 01/07-CEEA, sobre "Efeito da desnutrição protéico – calórica experimental na resposta imune e na susceptibilidade à infecção com *Staphylococcus aureus*", sob a responsabilidade de **ALEXANDRINA SARTORI**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** (CEEA), em reunião de 27/04/2007.

Botucatu, 27 de abril de 2007.


Prof. Dr. **MARCELO RAZERA BARUFFI**
Presidente - CEEA


NADIA JUVÊNCIO COTRIM
Secretária - CEEA

8.2- Manuscrito

IMPACT OF MALNUTRITION ON IMMUNITY AND INFECTION

Thais Graziela Donega França, Larissa Lumi Watanabe Ishikawa, Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella Pezavento, Fernanda Chiuso Minicucci, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza Cunha, Alexandrina Sartori.

Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.

Abstract

Malnutrition can be found as a consequence of energy deficit or as a micronutrient deficiency. It is considered the most relevant risk factor for illness and death, particularly in developing countries. In this review we described the size of this problem, its direct effect over the immune system and the consequent higher susceptibility to infection. A special emphasis was given to experimental models used to investigate the relationship between undernutrition and immunity.

Malnutrition is obviously a challenge that needs to be faced by health authorities and also by the scientific community.

Key words: malnutrition, infection, immunity, experimental models.

Conflicts o interest: There is not conflict.

Correspondence to:

Alexandrina Sartori, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences-UNESP, Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior, s/n 18.618-000, São Paulo State, Brazil. Phone: +55 14 3811-6240. Fax: +55 14 3811-6058. Email: sartori@ibb.unesp.br

Introduction

Malnutrition can be found as a consequence of energy deficit (protein-energy malnutrition – PEM) or as a micronutrient deficiency. In any case, it is still a major burden in developing countries. It is considered the most relevant risk factor for illness and death, being hundreds of millions of pregnant women and young children particularly affected (1). This direct relationship between malnutrition and death is mainly due to the resulting immunodeficiency and consequent greater susceptibility to infectious agents.

It is estimated that 852 million people were undernourished in 2000-2002, with most (815 million) living in developing countries, particularly in southern Asia and sub-Saharan Africa (2, 3, 4).

Malnutrition by itself can cause death (5) but epidemiological data reveals that malnutrition greatly increases susceptibility to and severity of infections, being a major cause of illness and death from disease (6, 7). It is the direct cause of about 300.000 deaths per year and is indirectly responsible for about half of all deaths in young children (8). A direct correlation between higher degrees of malnutrition and higher risk of death is supported by the observation that severely malnourished children experienced substantially higher mortality risk (9, 10).

Many factors affect the degree and distribution of PEM and micronutrient deficiency around the world being poverty at the top of the list. Other factors, whose relationship between cause and consequence is hard to establish, are also deeply involved in malnutrition: the socioeconomic and political instability, impaired development of education, sanitation and religious and food customs, breast-feeding habits and existence and effectiveness of nutrition programs (1, 11).

The causal relationship of malnutrition with immune suppression and infection is also aggravated by the profound effect of many infections on nutrition itself. For example, gastrointestinal parasites can lead to diarrhea, anemia and nutrient deprivation (12, 13, 14). It is also well established that aids, tuberculosis and other chronic infections cause cachexia and anemia (12,15).

PEM is defined, in children, by measurements that fall bellow 2 standard deviation of normal weight for corresponding age (underweight), height for age (stunting) and weight for height (wasting). Of all children under the age of 5 years old in developing countries, about 31% are underweight, 38% have stunted growth

and 9% show wasting (1). Severe malnutrition occurs almost exclusively in children and manifests as marasmus (severe wasting) marasmic kwashiorkor (severe wasting with edema) and kwashiorkor (malnutrition with edema) (16). Marasmus is diagnosed when subcutaneous fat and muscle are lost because of endogenous mobilization of all available energy and nutrients. Clinical aspects include a triangular face, primary or secondary amenorrhea, extended abdomen and anal or rectal prolapsed (17). Kwashiorkor usually manifests with edema, changes in hair and skin colour, anemia, hepatomegaly, lethargy, severe immunodeficiency and early death (18, 19).

Severe PEM is typically characterized by the occurrence of fat degeneration in diverse organs as the liver and heart. At the heart it causes subclinical or even overt cardiac insufficiency that demands urgent correction. The loss of subcutaneous fat, which markedly reduces the body's capacity to regulate temperature and also water storage, can also occur, determining dehydration, hypothermia and hypoglycemia (20, 21, 22). PEM is also associated with atrophy of the small bowel what triggers loss of both, absorption and digestion capacity (23, 24).

Malnutrition affects immunity

A condition resulting from a genetic or developmental defect in the immune system is called a primary immunodeficiency. Secondary or acquired immunodeficiency is the loss of immune function and results from a variety of extrinsic factors. The most well known secondary immunodeficiency is caused by HIV infection, however, the most prevalent cause of immunodeficiency worldwide is severe malnutrition, which affects as much as 50% of the population in some impoverished communities. The consequent abnormalities of the immune system affect both the innate and the adaptative immunity.

From a practical point of view, it is impossible to separate innate and specific arms of immunity because they work in an intrinsically connected way inside the body. However, for the sake of clarity, we will first refer to some mechanisms considered innate, i.e., the ones that are used against any kind of pathogen. For example, availability of complement components and phagocyte function are compromised during malnutrition and this will directly affect pathogen

elimination. This happens because the complement system by itself can destroy bacteria or viruses or because complement receptors present on phagocyte's surface intermediate capture of pathogens. Significantly lower levels of complement, especially C3 that is the main opsonic component, were described by Sakamoto et al., 1998. In addition, phagocyte's ability to ingest and kill pathogens was also reduced (26).

Antigen presenting cells (APCs) play a cardinal role during the induction, regulation and maintenance of innate and acquired immune response (27). A series of studies demonstrated that the biological function of different cell types (B lymphocytes, macrophages and Kupffer cells) is clearly decreased during nutritional deficiencies (28, 29, 30, 31).

The most relevant immunological alterations found in human beings or in experimental malnutrition models that affect the mechanisms associated with adaptative immunity will be briefly described below. Severe protein malnutrition in newborns and small children is clearly associated with atrophy in the so called primary lymphoid organs, i.e., bone marrow and thymus. The consequences are devastating because these organs are the generators of the B and T cell repertoires. Malnutrition clearly affects hematopoiesis, determining anemia, leucopenia and severe reduction in bone marrow. Production of IL-6 and TNF- α by bone marrow cells is also significantly lower in malnourished animals (32). The capacity of malnourished hematopoietic stroma to support the growth of hematopoietic stem cells (CD34+) in vitro is also decreased (33). This is a very relevant finding because CD34+ cells are able to generate multiple lymphohematopoietic lineages as myeloid, erythroid and lymphoid (B and T) cell lineages (34).

Severe protein malnutrition, mainly in newborns and small children, also determine atrophy of the thymus causing reduction in cell number in the thymus itself and also severely affecting the development of peripheral lymphoid organs (35). The immediate consequence of this atrophy is characterized by leucopenia, a decreased CD4 to CD8 ratio and increased numbers of immature T cells in the periphery. Recently, Cortés-Barberena et al., 2008, observed that significantly lower numbers of CD3+ lymphocytes were present in the spleen of moderately and severely malnourished rats. They also detected a significant impairment of T

cell activation characterized by decreased expression of CD25 and CD71 on these cells.

These disturbances at the thymus levels have been more intensely investigated in malnutrition experimental models. For example, it has been demonstrated that the patent atrophy is due to both, increased depletion by apoptosis, affecting mainly immature TCD4+ and TCD8+ cells. This has been, at least partially, attributed to the lowered leptin levels during starvation or malnutrition (37). Morphological changes in thymic epithelial cells associated with decreased thymic hormone production have also been described during malnutrition. This feature is apparently linked to a hormonal imbalance, involving a decrease in leptin and consequent increase in glucocorticoid hormone levels in the serum.

Immune responses at the epithelial barrier are also deeply affected by malnutrition. This is mainly characterized by alterations at the architecture of the gut mucosa as flattened hypotrophia microvilli, reduced lymphocyte counts in Peyer's patches and reduced immunoglobulin A secretion (38).

In our experience, BALB/c mice submitted to a dietary restriction (80% of the amount of food consumed by a control group) during 40 days showed very similar alterations. Together with a significant loss in body and spleen weights, respectively (figures 1a and b), these animals also presented alterations at the lymphoid organs (figure 2). By comparison to the normal thymus showed in figure 2a, a severe atrophy was observed in this organ in malnourished animals. In addition, the distinction between cortical and medullar areas was lost in the group with dietary restriction (figure 2b). Striking changes were also observed at the mucous membrane associated with small intestine. In addition of being smaller and irregular the intestinal villous also lost their brush borders. These alterations can be observed in figure 2d, comparing to the normal correspondent structures shown in figure 2c.

Antigen presentation to T cells is a fundamental event that precedes development of both, humoral and cellular immunity. Three different cell types (B lymphocytes, macrophages and dendritic cells-DC) have been described as the main antigen presenting cells (APCs). Among them only DCs have been more thoroughly studied during malnutrition. There is a general consensus that different aspects of DCs as number, cytokine production and ability to trigger proliferation of

antigen-specific memory T lymphocytes are significantly affected by undernutrition (39). Very recently, it was demonstrated that adoptively transferred dendritic cells were also able to restore primary cell-mediated inflammatory competence to acutely malnourished weanling mice (40).

There is a general agreement that deficits of protein, energy or both, produce a profound depression in acquired cell-mediated immune competence, whereas humoral competence is less predictably affected. This was supported by the observation that Th2-type immunoglobulins (IgG1 and IgE) were selectively elevated in weanling mice submitted to acute malnutrition whereas levels of the Th1-type immunoglobulins (IgG2a and IgG3) were unaffected (41). Similar and complementary information were obtained in a vitamin A deficiency mice model. Vitamin A deficiency at the time of initial antigen exposure significantly enhanced the development of IL-10 producing Th2 or T regulatory cells while diminishing the development of Th1 memory cells (42). More recently, Sakai et al., 2006, corroborated with these findings, demonstrating that protein deficiency impairs the induction of antigen-specific T cell proliferation but not the B cell response in DNA immunized mice.

One of the main mechanisms that avoids the complete activation of immunity during undernutrition seems to be related to the activation of T lymphocytes. It is well established that the voltage-dependent K (V) potassium channels are vital for the activation of T cells. Fernández et al., 2005, reported a significant decrease in the K⁺ current and activation to a 20 mV more positive membrane potential in T lymphocytes derived from rats with severe malnutrition. It has also been demonstrated that both, moderately and severely malnourished rats presented lower absolute and relative numbers of CD3⁺ and CD4⁺ lymphocyte subpopulations. This was also associated with a significant decrease in the expression of CD25 and CD27 that are molecules absolutely required for T cell activation and proliferation (36).

This impaired activation of T cells has been clearly associated with deficits in cytokine production that are the main molecular mediators of immunity. This was clearly evidenced in malnourished children that showed reduced production of type 1 cytokines (IL-2 and IFN- γ) (45).

Malnutrition increases risk of infection

The strong relationship between malnutrition and infection was originally described by Scrimshaw, Taylor and Gordon, 1990. From this framework, much investigation was done in this area and there is a total agreement among the authors that mortality is significantly more elevated in undernourished child compared to healthy ones. The study of Man et al, 1998, that included a large population of hospitalized Gambian children clearly illustrated the relationship between undernourishment, characterized by lower weight for age relationship (z-score, WAZ), and higher mortality indexes associated with many infectious diseases.

One-third of the world's population is infected with *M. tuberculosis* and it is the leading cause of death from an infectious disease (48, 49). This infection is particularly influenced by undernutrition and is a major cause of morbidity and mortality in developing countries where PCM is also prevalent (50). Malnutrition as a major risk for tuberculosis has also being reinforced by findings in experimental models (51). Undernutrition has also an impact on the clinical outcome of tuberculosis (52). A very recent meta-analysis suggested that low serum vitamin D levels are associated with higher risk of active tuberculosis (53). It is important to highlight that tuberculosis is a typical condition whose evolution, characterized by a chronic inflammatory process, accentuates undernutrition and causes a typical cachexia. This has been partially attributed to IgG1 antibodies that up-regulate TNF- α and IL-6 (proinflammatory cytokines) but not IL-10 (anti-inflammatory cytokines) (54). Emergence of highly virulente drug-resistant strains of *M. tuberculosis* have been largely attributed to derive from a combination of poorly implemented drug regimen and coinfection with HIV. It has been suggested by Prentice et al., 2008, that malnutrition might contribute to the appearance of these resistan Mtb strains as has been described for virus (56).

Even though effective vaccines are licensed for measles, it continues to cause death and severe disease in children worldwide. Complications from this viral infection can occur in almost every organ system, including pneumonia, croup and encephalitis. Among other things, malnutrition and vitamin A deficiency are factors that increase complication rates (57). There is experimental evidence that vitamin A supplementation in children is associated with a reduction of 23% to

30% in mortality risk and attenuation in disease severity (58). For this reason, the World Health Organization recommends administration of an oral dose of vitamin A to children with measles that live in vitamin A deficiency areas (59).

Malnutrition and intestinal parasitism share a similar geographical distribution, with the same individuals experiencing both disease status simultaneously (60). The co-existence between undernutrition and nematode infection involves two causal pathways: malnutrition that augments susceptibility to infection and the infection itself that leads to a more accentuated undernutrition (61). Intestinal nematodes may lead to malnutrition because they cause anorexia and a variety of pathophysiological responses in the gastrointestinal tract as vomiting, diarrhea and malabsorption. Together, these alterations deleteriously affect the ability of the host to get enough nutrients from the diet (62). The most important parasites related to nutritional status are specially soil transmitted helminths, *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica*, followed by other parasites as the coccidia and *Schistosoma* sp (63).

There is also a general consensus that PEM is associated with greater malaria morbidity and mortality in humans (64). Supporting this observation, controlled clinical trials of either vitamin A or zinc supplementation indicated that these nutrients can substantially reduce clinical malaria attacks (64, 65). Opinions regarding the effect of certain micronutrients as iron for example are still contradictory (65, 55).

Noma is an opportunistic infection promoted by extreme poverty. It evolves rapidly from a gingival inflammation to mutilating orofacial gangrene. Even though it can be observed worldwide, it is much more common in sub-Saharan Africa. It results from very complex interactions among malnutrition, infection and compromised immunity, being very frequently preceded by malaria, measles and severe necrotizing ulcerative gingivitis (66).

Experimental models

Many studies made in human populations from the developing countries pointed to important deficiencies in macronutrients (proteins, carbohydrates and fat, leading to protein-energy deficiencies), micronutrients (electrolytes, minerals and vitamins, leading to specific micronutrients deficiencies) or both (67, 68, 69).

These studies were obviously very relevant because they allowed demarcation of the most severely affected regions and consequent intervention programs by humanitarian organizations and the local governments. However, laboratory animals have been very useful in studying the effects of varying levels of malnutrition because non-nutritional factors that affect humans can be controlled in this kind of evaluation. The use of malnutrition animal models has inputted a great deal of information in the molecular mechanisms involved in the higher susceptibility to infections and also in immunodeficiency secondary to undernutrition (70, 13).

The most employed models are adult mice and rats (outbred or isogenic) feed with a reduced amount of proteins, vitamins or micronutrients. The percentage of dietary restriction varies from 10 to 70% according to the different authors. As immuno deficiency associated with prepubescent malnutrition underlies a staggering burden of infection-related morbidity, acute weanling mice have also been explored to investigate the effects of malnutrition (40). More seldom, cats and dogs have also been used. More recently, transgenic and knockout mice have also been employed to better understand the mechanisms involved in the higher susceptibility to infectious agents in malnourished mice (71, 72).

These numerous animal models allowed a growing understanding and characterization of the immunological disturbances triggered by undernutrition. Some examples of the most relevant findings in this research area are exemplified in table 1.

References

1. Müller O, Krawinkel M. Malnutrition and health in developing countries. *CMAJ* 2005; 173: 279-86.
2. Schofield C, Ashworth A. Why have mortality rates for severe malnutrition remained so high? *Bull World Health Organ* 1996; 74: 223-9.
3. World Health Organization. World health report. Geneva: The Organization; 2002.
4. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Undernourishment around the world. In: *The state of food insecurity in the world 2004*. Rome: The Organization; 2004.

5. Stephen CA, Thame MM, Gray R, Barker D, Wilks R, Forrester TE, et al. Primary malnutrition. Can we always tell? *West Indian Med J* 2002; 51: 148-52.
6. Rice AL, Sacco L, Hyder A, Black RE. Malnutrition as an underlying cause of childhood deaths associated with infectious diseases in developing countries. *Bull World Health Organ* 2000; 78: 1207-21.
7. Black R. Micronutrient deficiency--an underlying cause of morbidity and mortality. *Bull World Health Organ* 2003; 81: 79.
8. Black RE, Morris SS, Bryce J. Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet* 2003; 361: 2226-34.
9. Chen LC, Chowdhury A, Huffman SL. Anthropometric assessment of energy-protein malnutrition and subsequent risk of mortality among preschool aged children. *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 1836-45.
10. van Den Broeck J, Eeckels R, Vuylsteke J. Influence of nutrition status on child mortality in rural Zaire. *Lancet* 1993; 341: 1491-5.
11. Schaible UE, Kaufmann SH. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. *PLoS Med* 2007; 4:115.
12. Agarwal D, Chakravarty J, Sundar S, Gupta V, Bhatia BD. Correlation between clinical features and degree of immunosuppression in HIV infected children. *Indian Pediatr* 2008; 45: 140-3.
13. Katona P, Katona-Apte J. The interaction between nutrition and infection. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1582-8.
14. Chong VH. Hepatobiliary tuberculosis: a review of presentations and outcomes. *South Med J* 2008; 101: 356-61.
15. Williams CD, Oxon BM, Lond H. Kwashiorkor: a nutritional disease of children associated with a maize diet. 1935. *Bull World Health Organ* 2003; 81: 912-3.
16. Bhan MK, Bhandari N, Bahl R. Management of the severely malnourished child: perspective from developing countries. *BMJ* 2003; 326: 146-51.
17. Phillips RJ, Crock CM, Dillon MJ, Clayton PT, Curran A, Harper JI. Cystic fibrosis presenting as kwashiorkor with florid skin rash. *Arch Dis Child* 1993; 69: 446-8.
18. Oumeish OY, Oumeish I. Nutritional skin problems in children. *Clin Dermatol* 2003; 21: 260-3.

19. Sakurada S, Shido O, Sugimoto N, Hiratsuka Y, Yoda T, Kanosue K. Autonomic and behavioural thermoregulation in starved rats. *J Physiol* 2000; 2: 417-24.
20. Alam NH, Hamadani JD, Dewan N, Fuchs GJ. Efficacy and safety of a modified oral rehydration solution (ReSoMaL) in the treatment of severely malnourished children with watery diarrhea. *J Pediatr* 2003; 143: 614-9.
21. de Mello MA, Luciano E, Carneiro EM, Latorraca MQ, Machado de Oliveira CA, Boschero AC. Glucose homeostasis in pregnant rats submitted to dietary protein restriction. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2003; 113-114: 229-46.
22. Lenaerts K, Sokolović M, Bouwman FG, Lamers WH, Mariman EC, Renes J. Starvation induces phase-specific changes in the proteome of mouse small intestine. *J Proteome Res* 2006; 5: 2113-22.
23. Vidueiros SM, Fernandez I, Slobodianik N, Roux ME, Pallaro A. Nutrition disorder and immunologic parameters: study of the intestinal villi in growing rats. *Nutrition* 2008; 24: 575-81.
24. Sakamoto M, Fujisawa Y, Nishioka K. Physiologic role of the complement system in host defense, disease, and malnutrition. *Nutrition* 1998; 14: 391-8.
25. Chandra RK. Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56-3: S73-6.
26. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001; 106: 255-8.
27. Redmond HP, Shou J, Kelly CJ, Schreiber S, Miller E, Leon P, et al. Immunosuppressive mechanisms in protein-calorie malnutrition. *Surgery* 1991; 110: 311-7.
28. Petro TM, Schwartz KM, Chen SS. Production of IL2 and IL3 in syngeneic mixed lymphocyte reactions of BALB/c mice are elevated during a period of moderate dietary protein deficiency. *Immunol Invest* 1994; 23: 143-52.
29. Honda M, Kamiyama Y, Kawamura K, Kawahara K, Shishido S, Nakai H, et al. Growth, development and nutritional status in Japanese children under 2 years on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Pediatr Nephrol* 1995; 9: 543-8.

30. Stapleton PP, Fujita J, Murphy EM, Naama HA, Daly JM. The influence of restricted calorie intake on peritoneal macrophage function. *Nutrition* 2001; 17: 41-5.
31. Fock RA, Vinolo MA, de Moura Sá Rocha V, de Sá Rocha LC, Borelli P. Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-alpha in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. *Cytokine* 2007; 40: 105-14.
32. Xavier JG, Favero ME, Vinolo MA, Rogero MM, Dagli ML, Arana-Chavez VE, et al. Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. *Histol Histopathol* 2007; 22: 651-60.
33. Giassi LJ, Pearson T, Shultz LD, Laning J, Biber K, Kraus M, et al. Expanded CD34+ human umbilical cord blood cells generate multiple lymphohematopoietic lineages in NOD-scid IL2rgamma(null) mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; 233: 997-1012.
34. Savino W. The thymus gland is a target in malnutrition. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56: S46-9.
35. Cortés-Barberena E, González-Márquez H, Gómez-Olivares JL, Ortiz-Muñiz R. Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry. *Clin Exp Immunol* 2008; 152: 585-92.
36. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996; 382: 250-2.
37. Beisel WR. Nutrition in pediatric HIV infection: setting the research agenda. *Nutrition and immune function: overview. J Nutr* 1996; 126: 2611S-2615S.
38. Abe M, Akbar F, Matsuura B, Horiike N, Onji M. Defective antigen-presenting capacity of murine dendritic cells during starvation. *Nutrition* 2003; 19: 265-9.
39. Hillyer L, Whitley C, Olver A, Webster M, Steevens T, Woodward B. Adoptively transferred dendritic cells restore primary cell-mediated inflammatory competence to acutely malnourished weanling mice. *Am J Pathol* 2008; 172: 378-85.

40. Neyestani TR, Woodward B. Blood concentrations of Th2-type immunoglobulins are selectively increased in weanling mice subjected to acute malnutrition. *Exp Biol Med* (Maywood) 2005; 230: 128-34.
41. Stephensen CB, Jiang X, Freytag T. Vitamin A deficiency increases the in vivo development of IL-10-positive Th2 cells and decreases development of Th1 cells in mice. *J Nutr* 2004; 134: 2660-6.
42. Sakai T, Mitsuya K, Kogiso M, Ono K, Komatsu T, Yamamoto S. Protein deficiency impairs DNA vaccine-induced antigen-specific T cell but not B cell response in C57BL/6 mice. *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo) 2006; 52: 376-82.
43. Fernández RG, Leehan JA, Pastrana RF, Muñiz RO. Effect of malnutrition on K⁺ current in T lymphocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 808-13.
44. Rodríguez L, González C, Flores L, Jiménez-Zamudio L, Graniel J, Ortiz R. Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 502-7.
45. Scrimshaw NS, Taylor CE, Gordon JE. Interactions of nutrition and infection. *Nutr Rev* 1990; 48: 402-5.
46. Man WD, Weber M, Palmer A, Schneider G, Wadda R, Jaffar S, et al. Nutritional status of children admitted to hospital with different diseases and its relationship to outcome in The Gambia, West Africa. *Trop Med Int Health* 1998; 3: 678-86.
47. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 93-129.
48. Young DB, Duncan K. Prospects for new interventions in the treatment and prevention of mycobacterial disease. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 641-73.
49. Udani PM. BCG vaccination in India and tuberculosis in children: newer facets. *Indian J Pediatr* 1994; 61: 451-62.
50. Cegielski JP, McMurray DN. The relationship between malnutrition and tuberculosis: evidence from studies in humans and experimental animals. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 286-98.
51. Singal A, Pandhi D, Agrawal SK. Multifocal scrofuloderma with disseminated tuberculosis in a severely malnourished child. *Pediatr Dermatol* 2005; 22: 440-3.

52. Nnoaham KE, Clarke A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol* 2008; 37: 113-9.
53. Hussain R, Shiratsuchi H, Phillips M, Ellner J, Wallis RS. Opsonizing antibodies (IgG1) up-regulate monocyte proinflammatory cytokines tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and IL-6 but not anti-inflammatory cytokine IL-10 in mycobacterial antigen-stimulated monocytes-implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 2001; 123: 210-8.
54. Prentice A, Goldberg GR, Schoenmakers I. Vitamin D across the lifecycle: physiology and biomarkers. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 500S-506S.
55. Beck MA. Selenium and vitamin E status: impact on viral pathogenicity. *J Nutr* 2007; 137: 1338-40.
56. Perry RT, Halsey NA. The clinical significance of measles: a review. *J Infect Dis* 2004; 189: S4-16.
57. Oliveira JM, Rondó PH. Evidence of the impact of vitamin A supplementation on maternal and child health. *Cad Saude Publica* 2007; 23: 2565-75.
58. Huiming Y, Chaomin W, Meng M. Vitamin A for treating measles in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 19: CD001479.
59. Pelletier DL, Frongillo EA Jr, Schroeder DG, Habicht JP. A methodology for estimating the contribution of malnutrition to child mortality in developing countries. *J Nutr* 1994; 124: 2106S-2122S.
60. Scrimshaw NS, SanGiovanni JP. Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 464S-477S.
61. Koski KG, Scott ME. Gastrointestinal nematodes, nutrition and immunity: breaking the negative spiral. *Annu Rev Nutr* 2001; 21: 297-321.
62. Hesham MS, Edariah AB, Norhayati M. Intestinal parasitic infections and micronutrient deficiency: a review. *Med J Malaysia* 2004; 59: 284-93.
63. Shankar AH. Nutritional modulation of malaria morbidity and mortality. *J Infect Dis* 2000; 182: S37-53.
64. Caulfield LE, Richard SA, Black RE. Undernutrition as an underlying cause of malaria morbidity and mortality in children less than five years old. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71: 55-63.
65. Enwonwu CO, Falkler WA Jr, Phillips RS. Noma (cancrum oris). *Lancet* 2006; 368: 147-56.

66. Millward DJ, Jackson AA. Protein/energy ratios of current diets in developed and developing countries compared with a safe protein/energy ratio: implications for recommended protein and amino acid intakes. *Public Health Nutr* 2004; 7: 387-405.
67. Cunningham-Rundles S, McNeeley DF, Moon A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 1119-28.
68. Grossniklaus DA, O'Brien MC, Clark PC, Dunbar SB. Nutrient intake in heart failure patients. *J Cardiovasc Nurs* 2008; 23: 357-63.
69. Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Ann Nutr Metab* 2007; 51: 301-23.
70. Waters WR, Palmer MV, Nonnecke BJ, Whipple DL, Horst RL. *Mycobacterium bovis* infection of vitamin D-deficient NOS2-/-mice. *Microb Pathog* 2004; 36: 11-7.
71. Chatraw JH, Wherry EJ, Ahmed R, Kapasi ZF. Diminished primary CD8 T cell response to viral infection during protein energy malnutrition in mice is due to changes in microenvironment and low numbers of viral-specific CD8 T cell precursors. *J Nutr* 2008; 138: 806-12.
72. Molrine DC, Polk DB, Ciamarra A, Phillips N, Ambrosino DM. Impaired human responses to tetanus toxoid in vitamin A-deficient SCID mice reconstituted with human peripheral blood lymphocytes. *Infect Immun* 1995; 63: 2867-72.
73. Anstead GM, Chandrasekar B, Zhao W, Yang J, Perez LE, Melby PC. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun* 2001; 69: 4709-18.
74. Rivadeneira DE, Grobmyer SR, Naama HA, Mackrell PJ, Mestre JR, Stapleton PP, et al. Malnutrition-induced macrophage apoptosis. *Surgery* 2001; 129: 617-25.
75. Nodera M, Yanagisawa H, Wada O. Increased apoptosis in a variety of tissues of zinc-deficient rats. *Life Sci* 2001; 69: 1639-49.
76. Anstead GM, Chandrasekar B, Zhang Q, Melby PC. Multinutrient undernutrition dysregulates the resident macrophage proinflammatory

cytokine network, nuclear factor-kappaB activation, and nitric oxide production. *J Leukoc Biol* 2003; 74: 982-91.

77. Niiya T, Akbar SM, Yoshida O, Miyake T, Matsuura B, Murakami H, et al. Impaired dendritic cell function resulting from chronic undernutrition disrupts the antigen-specific immune response in mice. *J Nutr* 2007; 137: 671-5.

Legends

Figure 1: Effect of dietary restriction on body (a) and spleen (b) weights. Body weight was measured everyday and each group included eight mice. Spleen weight was measured only at the 40th day after the beginning of dietary restriction; the normal group included four mice and the restricted included three. *Mean value was significantly different from that of the normal group ($P < 0.05$).

Figure 2: Effect of dietary restriction on thymus (a and b) and small intestine (c and d) architecture. BALB/c mice were fed with a normal diet (left column) or 80% of normal diet (right column). Sections were obtained after 40 days and stained with H&E.

Table 1 - Experimental models used to study the effect of malnutrition on immunity and susceptibility to infection.

	DIET RESTRICTION	EFFECT	REFERENCE
Human reconstituted SCID mice	Total vitamin A restriction 7 days gestations	Impaired antibody production to tetanus toxoid immunization	(73)
BALB/c mice	Three diets containing 6, 3 or 1% protein, 6 weeks	Excessive production of PGE2 and decreased levels of IL-10 and nitric oxide	(74)
Swiss-Webster mice	Total protein restriction 1 week	Decreased PKC activity and Bcl-2 protein expression, higher macrophage apoptosis	(75)
SD rats	Total Zn restriction, 34 weeks	Thymus atrophy, oligospermia, testicular atrophy and loss of sperm cells and spermatocytes	(76)
BALB/c mice	Multinutrient restriction (protein, iron and zinc) 6 weeks	Lost 12% weight body, lower NF- κ B activity, decreased production of TNF- α and NO by macrophages	(77)
BALB/c mice	Total vitamin A restriction 2-5 weeks	Increased Th2 and Treg. Decreased Th1	(42)
C57BL/6 mice	Lower casein diet (75%); 4 weeks	Impaired T cell response to DNA vaccination	(43)
Swiss mice	PEM 4% protein	20% body weight loss, anemia, leucopenia and severe reduction in bone marrow lower production of TNF-alpha, IL-1 α , IL-6	(32)
C57BL/6 mice	Total dietary restriction (70%), 52 weeks	Decreased humoral response to hepatitis B virus	(78)

Figure 1

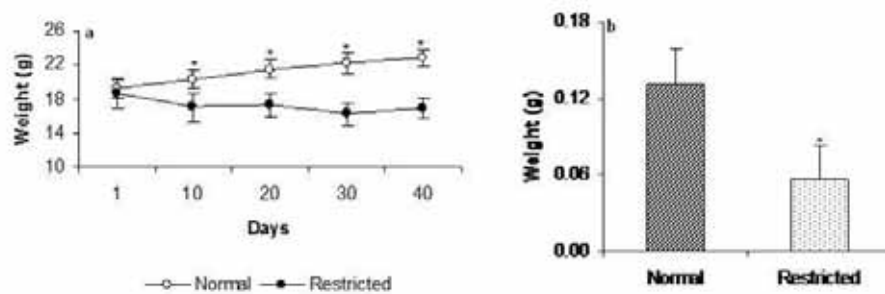


Figure 2

