

# INFLUÊNCIA DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA SOBRE A FUNÇÃO FAGOCITÁRIA DE NEUTRÓFILOS DE RATOS

*Primavera Borelli Garcia<sup>1</sup> e Domênico Barbieri<sup>1</sup>*

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, Brasil

## RESUMO

Estudou-se os efeitos da carência proteica sobre a função fagocitária de neutrófilos do sangue e do exsudato peritoneal de ratos.

Os animais carentes apresentaram valores significativamente menores para o número de leucócitos e de neutrófilos, para os testes de redução do NBT, para a atividade da peroxidase e para a atividade bactericida. A ingestão de *S. aureus* e de partículas inertes não mostrou diferença entre os grupos. A fosfatase alcalina leucocitária apresentou-se aumentada nos neutrófilos dos animais deficientes.

## INTRODUÇÃO

A fagocitose induz nos granulócitos dos mamíferos alterações metabólicas que conduzem a um aumento do consumo de oxigênio (1, 2), estimulação da via glicolítica e da via da hexosemonofosfato (2, 3), produção de  $H_2O_2$  (1) e de radicais de superóxidos (4), geração de quimioluminescência (5) e redução de sais de tetrazólio (1). Em decorrência desse estímulo surgem substâncias tóxicas (1, 4) que levam à destruição do material ingerido através de mecanismos dependentes e independentes do oxigênio (6).

O binômio infecção-desnutrição está estabelecido, tanto por critérios clínicos, como de caráter epidemiológico, sendo que de uma maneira geral a incidência de doenças infecciosas, bem como a sua severidade, encontram-se aumentadas em indivíduos desnutridos (7). A desnutrição geralmente atua sinergicamente (8) com as doenças alterando os mecanismos de defesa do organismo (8); por sua vez, a própria doença agrava o estado nutricional do indivíduo, conduzindo a um balanço nitrogenado negativo (8).

---

Manuscrito modificado recebido: 4-6-86.

1 Professores de Hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Caixa Postal No. 30.786, São Paulo, Brasil.

A carência proteica conduz, na fagocitose, a alterações diversas não tendo, até o momento, sido perfeitamente esclarecidos os mecanismos afetados (9) visto encontrarem-se resultados controversos quanto aos parâmetros estudados. Indivíduos desnutridos e infectados apresentam respostas deficientes de polimorfonucleares (PMN) tanto no sangue como nos tecidos, o que segundo alguns dever-se-ia a uma redução na produção de células mielóides (10); porém Aschkenasy (10) não relata o achado de aplasia medular em casos de má nutrição. Os granulócitos apresentam comprometimento de funções metabólicas (11, 12) e bacteridas (13) e, também aqui, os resultados são inconclusivos. Para Belghiti *et al.* (11), a via glicolítica e da hexosemonofosfato e o consumo de oxigênio encontram-se diminuídos. Porém Balch e Spencer (14) relatam não haver diferença significativa da via de hexosemonofosfato entre os grupos. Os testes de redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) apresentaram valores baixos para Shousha e Kamel (15), enquanto que Schopfer e Douglas (16) citam o encontro de valores normais para o teste. A concentração de lactato e piruvato (12) bem como de AMP e ATP encontra-se diminuída e a atividade bacterida, segundo a maioria dos autores (17, 18), reduzida nos estados carenciais.

Frente a estas informações interessou-nos estudar a influência da carência proteica sobre alguns aspectos da função fagocitária dos neutrófilos oriundos do sangue e do exsudato peritoneal de ratos.

## MATERIAL E METODOS

### *Animais e Ração*

Foram utilizadas 42 fêmeas adultas da linhagem Wistar, sendo 17 destinadas ao grupo Controle (peso médio de 195.88 g) e 25 ao grupo Carente (peso médio 203.60 g). Os animais receberam água e ração *ad libitum* por 29 dias. Os animais do grupo Controle e Carente foram alimentados, respectivamente, com as rações I y II contendo 20% (19) e 4% (20) de proteínas (Tabela 1), sendo a caseína empregada como fonte proteica.

### *Sangue*

Foi obtido por punção cardíaca, empregando-se heparina como anti-coagulante (75 UI/ml) (21). Para as determinações citotóxicas não se utilizou anticoagulante.

### *Exsudato Peritoneal*

No 29º dia do experimento injetou-se intraperitonealmente, 10 ml de solução de glicogênio (tipo II-Sigma) 05% em NaCl 085% (22); 12 horas após, o abdomen foi lavado com tampão de Hank contendo heparina (10 UI/ml). As células foram a seguir lavadas por tres vezes com o referido tampão (700 xg, 5 minutos, 4°C).

TABELA 1

## COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DAS RAÇÕES

Constituintes	Ração I	Ração II
Caseína	20	4
Mistura salina	4	4
Mistura vitamínica	1	1
Sacarose	10	10
Oleo	8	8
Celulose	1	1
Amido q.s.p.	100	100

*Viabilidade Celular*

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste do azul de tripano (23), sendo utilizadas as amostras contendo 99% de células viáveis.

*Proteína Plasmática*

A proteína plasmática total e a fração albumínica foram determinadas pelo método do Biureto (24) e eletroforese em acetato de celulose (25), respectivamente.

*Fagocitose de Partículas Inertes — Índice de Fagocitose*

O teste foi realizado em granulócitos neutrófilos do sangue e do exsudato peritoneal, empregando-se a técnica de Garcia e Barbieri (26). O índice de fagocitose (I. F.) foi obtido através da fórmula:

$$IF = \frac{\text{No. de neutrófilos com partículas fagocitadas}}{\text{No. neutrófilos sem partículas}} \times 100,$$

sendo apresentado em valores percentuais e por  $\text{mm}^3$ .

*Fosfatase Alcalina*

Utilizamos a técnica citoquímica de Kaplow (27) e os resultados foram expressos segundo o índice de positividade ("score") em valores percentuais e por  $\text{mm}^3$ , para os neutrófilos obtidos do sangue e apenas em valores percentuais para os neutrófilos do exsudato.

*Peroxidase*

Empregamos a técnica de Graham (28) modificada (29, 30). O critério de positividade adotado para os neutrófilos do sangue foi o proposto por Meloni-Bruneri e Barbieri (31). Para os neutrófilos do exsudato peritoneal elaboramos novo critério: Reação negativa (-): citoplasma

sem grânulos corados; Reação positiva (+): citoplasma com raros grânulos corados em azul; Reação (++) : diversos grânulos corados; Reação positiva (+++): citoplasma com frequentes grânulos corados, agrupados; Reação positiva (++++): numerosos grânulos corados, ocupando todo o citoplasma. Os resultados foram expressos analogamente ao item anterior.

#### *Teste do Azul de Nitrotetrazólio (NBT)*

Foi realizado em neutrófilos do sangue e do exsudato peritoneal segundo a técnica de Park, Fikrig e Smithwick (21), modificada (31, 32), tendo sido por nós adaptada: em cubetas plásticas, adicionamos 100 µl de tampão fosfato 0.2M; pH 7.2; 10 µl de NaCl 0.85<sup>o</sup>/o; 50 µl de NBT (grau III-Sigma) 0.2<sup>o</sup>/o em NaCl 0.85<sup>o</sup>/o, e 100 µl de suspensão celular. A mistura foi homogeneizada, mantida em câmara úmida a 37<sup>o</sup>C por 10 minutos e a seguir, por mais 10 minutos à temperatura ambiente. Como critério de positividade utilizamos o proposto por Meloni-Bruneri e Barbieri (31), sendo os resultados expressos analogamente ao teste da Peroxidase.

#### *Teste do Azul de Nitrotetrazólio Estimulado*

A técnica utilizada foi semelhante a anterior sendo a solução de NaCl 0.85<sup>o</sup>/o substituída por igual volume de suspensão de partículas de látex 0.82 µ (Difco). O critério de positividade foi semelhante ao citado (31), considerando-se como positivas as células contendo 10 ou mais partículas de látex no citoplasma (33). Os resultados foram expressos como índice de positividade.

Foi realizado em granulócitos do exsudato peritoneal, segundo a técnica de Baehner (34), e os resultados expressos como Absorbância (30 minutos, 25 x 10<sup>6</sup> granulócitos/ml).

Empregamos a técnica de Solberg (35) e de Solberg e Hellum (36) por nós adaptada. Utilizamos os meios de tripticase-soja e agar Müller-Hinton (Difco); as alíquotas das suspensões celulares foram obtidas com auxílio de pipetas automáticas e as suspensões bacterianas foram semeadas na superfície do meio de cultura.

#### *Métodos Estatísticos*

A análise foi feita através de dois métodos nao-paramétricos: o Teste U de Mann e Whitney e o Coeficiente de Correlação de Spearman (37). O Teste U de Mann e Whitney foi aplicado para verificar-se a existência ou não de diferença significativa entre os resultados obtidos com os grupos Controle e Carente. Neste teste para que haja diferença significativa, o U\* deve ser menor que o U\*\* tabela.

---

U\* Valor de U do Teste de Mann e Whitney obtido com as amostras em estudo.  
U\*\* Valor crítico para U do Teste de Mann e Whitney, obtido em tabela, conforme o número de dados.

O Coeficiente de Correlação de Spearman foi utilizado para verificar a existência ou não de correlação entre os testes executados. Nos casos de existir a correlação  $r_{s^{***}}$  é menor que  $r_{tabela^{****}}$  e quando não houver correlação,  $r_s$  é igual a zero.

## RESULTADOS

Os animais alimentados com a ração hipoproteica (ração II) apresentaram valores significativamente (37) mais baixos para o peso corporal (11.80 g contra 220.59 g do grupo Controle), consumo diário e total de ração, consumo total de proteínas, proteínas totais, albumina, número de leucócitos e de neutrófilos (Tabelas 2 e 3).

TABELA 2

RESULTADOS, EM VALORES MEDIOS, DE PESO INICIAL (PI), PESO FINAL (PF), CONSUMO DIÁRIO DE RAÇÃO (CDR), CONSUMO TOTAL DE RAÇÃO (CTR) E CONSUMO TOTAL DE PROTEÍNAS (CTP) DOS RATOS PERTENCENTES AO GRUPO CONTROLE E CARENTE, SÃO PAULO, 1983

Grupo	PI (g)	PF (g)	CDR (g)	CTR (g)	CTP (g)
Controle	195.88	220.59	11.52	354.35	68.53
Carente	203.60	118.80	7.64	229.32	8.31

g = grama.

### *Índice de Fagocitose*

Não houve diferença significativa (37) entre o índice de Fagocitose nos grupos Controle e Carente, tanto para os neutrófilos do sangue como do exsudato (Tabela 4). Não houve correlação (38) entre os resultados dos testes e as concentrações de proteínas e albumina (Tabela 5).

### *Fosfatase Alcalina*

A atividade da enzima, quer nos neutrófilos do sangue quer nos do exsudato, revelou ser mais intensa no grupo Carente (Tabela 6), embora a diferença não tenha sido significativa (37). Os resultados revelaram que a

$r_{s^{***}}$  Coeficiente de Correlação de Spearman obtido com as amostras em estudo.

$r_{tabela^{****}}$  Coeficiente de Correlação de Spearman, obtido em tabela, conforme o número de dados.

TABELA 3

RESULTADOS, EM VALORES MEDIOS, DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE PROTEÍNAS TOTAIS E ALBUMINA E DO NÚMERO DE LEUCÓCITOS E DE GRANULÓCITOS NEUTRÓFILOS DOS ANIMAIS PERTENCENTES AOS GRUPOS CONTROLE E CARENTE EM PROTEÍNAS. SÃO PAULO, 1983

Grupo	Proteínas (g <sup>o</sup> /o)	Albumina (g <sup>o</sup> /o)	Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	Neutrófilos (%o)	Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )	
Controle	7.09	3.69	Sangue	7,364.71	45.35	3,418.41
			Exsudato	25,073.53	71.12	18,885.12
Carente	4.50	2.44	Sangue	4,016.00	49.48	1,977.00
			Exsudato	14,672.00	85.00	12,471.20

atividade enzimática foi mais intensa no sangue que no exsudato, independentemente do grupo a que pertença o animal. Encontramos correlação (37) entre a albuminemia e a atividade da enzima nos neutrófilos do sangue (Tabela 7).

#### *Peroxidase*

No grupo Controle os neutrófilos do sangue exibiram significativamente maior (37) atividade enzimática do que no grupo Carente (Tabela 4). A atividade enzimática exibiu correlação (37) com a proteinemia (Tabelas 8 e 9).

#### *Testes de Redução do NBT*

Nos testes de redução do NBT, espontâneo e estimulado, os neutrófilos peritoneais e sanguíneos dos animais carentes revelaram, em valores percentuais, maior atividade redutora (Tabela 4) sem, contudo haver diferença significativa (37). Entretanto, em valores absolutos, esta atividade apresentou-se significativamente (37) menor que a do grupo Controle (Tabela 4). A determinação espectrofotométrica do NBT (Tabela 3) revelou valores menores, mas não significativos (37), para o grupo Carente. O teste estimulado em neutrófilos sanguíneos do grupo Controle exibiu correlação (37) com a proteinemia (Tabela 8).

#### *Atividade Bactericida*

A atividade bactericida dos neutrófilos do exsudato peritoneal, nos animais carentes, apresentou-se reduzida em relação aos controles. Em média, o grupo Carente fagocitou 51.71% das bactérias enquanto que nos controles, a fagocitose foi de 67.40% (Tabela 9). O número de

TABELA 4

RESULTADOS, EM VALORES MEDIOS, DOS TESTES DE FAGOCITOSE DE PARTÍCULAS INERTES, FOSFATASE ALCALINA, PEROXIDASE, TESTES CITOQUÍMICOS, ESPONTÂNEO E ESTIMULADO, E ESPECTROFOTOMÉTRICO DE REDUÇÃO DO NBT, REALIZADOS EM NEUTRÓFILOS DO SANGUE E DO EXSUDATO PERITONEAL DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E CARENTE EM PROTEÍNAS E EXPRESSOS EM ÍNDICE DE POSITIVIDADE EM VALORES PERCENTUAIS ( $IP_p$ ) E EM VALORES ABSOLUTOS ( $IP_a$ )

		Fagocitose de partículas	Fosfatase alcalina	Peroxidase	NBT		Espectrofotométrico
					Espontâneo	Estimulado	
Grupo Controle	Exsudato ( $IP_p$ )	63.88	152.00	203.69	43.50	106.33	0.03567*
	Sangue ( $IP_p$ )	29.13	211.69	197.75	32.13	64.18	—
	( $IP_a$ )	1,068.38	7,020.00	6,553.25	1,089.25	2,822.27	
Grupo Carente	Exsudato ( $IP_p$ )	76.20	165.33	157.52	63.83	169.24	0.02873*
	Sangue ( $IP_p$ )	41.67	228.73	167.00	39.18	97.39	—
	( $IP_a$ )	626.89	3,998.00	3,561.00	813.73	1,702.61	

$IP_p$  = (% de neutrófilos x respectivo grau de intensidade da reação).

$IP_a$  = (No. de neutrófilos /mm<sup>3</sup> x respectivo grau de intensidade da reação).

\* =  $\Delta$  Absorbância (30 minutos, 25 x 10<sup>6</sup> granulócitos/ml).

TABELA 5

COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN ENTRE ALBUMINA E OS TESTES DE: ÍNDICE DE FAGOCITOSE (IP<sub>p</sub> e IP<sub>a</sub>), FOSFATASE ALCALINA (IP<sub>p</sub> e IP<sub>a</sub>), NBT ESPONTANEO (IP<sub>p</sub> e IP<sub>a</sub>), NBT ESTIMULADO (IP<sub>p</sub> e IP<sub>a</sub>) E NÚMERO DE LEUCÓCITOS (/mm<sup>3</sup>), REALIZADOS EM NEUTRÓFILOS DO SANGUE DE RATOS DOS GRUPOS CONTROLE E CARENTE

	Grupo Controle			Grupo Carente		
	r <sub>s</sub> (IP <sub>p</sub> )	r <sub>s</sub> (IP <sub>a</sub> )	r <sub>tab</sub>	r <sub>s</sub> (IP <sub>p</sub> )	r <sub>s</sub> (IP <sub>a</sub> )	r <sub>tab</sub>
Índice de fagocitose	0.23	0.40	0.60	0.08	0.13	0.58
Peroxidase	0.21	0.18	0.41	0.00	0.04	0.34
Fosfatase alcalina	0.25	0.06	0.41	0.09	0.58*	0.40
NBT espontâneo	0.07	0.13	0.53	0.26	0.25	0.40
NBT estimulado	0.28	0.44	0.53	0.48*	0.07	0.40
Número de leucócitos	+	0.40	0.41	+	0.13	0.34

r<sub>s</sub> (IP<sub>p</sub>) = Coeficiente de Correlação de Spearman obtido com os resultados, em valores percentuais, das amostras em estudo;

r<sub>s</sub> (IP<sub>a</sub>) = Coeficiente de Correlação de Spearman obtido com os resultados de Spearman, em valores absolutos, das amostras em estudo;

r<sub>tab</sub> = Coeficiente de Correlação de Spearman, obtido em tabela de acordo com o número de dados.

\* = Correlação obtida . + = Correlação não efetuada.

**TABELA 6**  
**ATIVIDADE BACTERICIDA EM NEUTRÓFILOS DO EXSUDATO PERITONEAL DE RATOS.**  
**MÉDIAS**

	No. de colônias iniciais (x 10 <sup>9</sup> col/ml)	No. de colônias viáveis após 120 minutos (x 10 <sup>8</sup> col/ml)	Colônias fagocitadas após 120 minutos (x 10 <sup>8</sup> col/ml) o/o		Colônias viáveis intracelulares após 120 minutos (x 10 <sup>7</sup> col/ml) o/o	
<b>Grupo Controle</b>	2.20	7.40	16.40	67.40	22.20	19.20
<b>Grupo Carente</b>	2.00	10.00	10.00	51.71	5.00	52.00

TABELA 7

COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E CARENTE EM PROTEÍNAS QUANTO A: CONSUMO DIÁRIO E TOTAL DE RAÇÃO; VARIAÇÃO DE PESO; PROTEÍNAS TOTAIS; ALBUMINA; NUMERO DE LEUCÓCITOS E DE NEUTRÓFILOS, NO SANGUE, ATRAVÉS DO TESTE U DE MAN E WHITNEY A NÍVEL DE 50/o

Testes	U	U <sub>T</sub>
Consumo diário de ração	49*	135
Consumo total de ração	49*	135
Variação de peso	0*	135
Proteínas totais	0*	135
Albumina	13.5*	135
Número de leucócitos	45*	135
Número de neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )	73.5*	135

U = Valor para U do teste de Mann e Whitney obtido com as amostras em estudo.

U<sub>T</sub> = Valor crítico para U do teste de Mann e Whitney, obtido em tabela, de acordo com o número de dados.

\* = Encontram-se as diferenças significativas.

bactérias viáveis intracelulares foi significativamente (37) maior no grupo Carente do que nos controles, sendo encontrada correlação (34) entre o teste e a proteinemia (Tabela 9).

Verificamos ainda, existir correlação (37) nos testes realizados com neutrófilos do sangue (em valores absolutos), entre a peroxidase e índice de fagocitose (grupo Controle); fosfatase alcalina (grupo Carente); NBT espontâneo e estimulado (grupo Controle e Carente), conforme revela a Tabela 6.

## DISCUSSÃO

A importância dos neutrófilos atuando como células fagocitárias evidencia-se pela incidência e severidade das infecções em pacientes que apresentam alterações destas células como, por exemplo, na doença Granulomatosa Crônica (38). A má nutrição proteica poderia ser considerada como uma deficiência adquirida da célula fagocitária.

A leucopenia neutropenica observada no grupo Carente, não nos surpreendeu, visto admitir-se que a desnutrição conduza a um estado de hipoplasia medular (19). Entretanto são relatados casos de Kwashiorkor sem leucopenia, havendo casos acompanhados por leucocitose e neutrofilia (16, 18).

Os neutrófilos exercem, na maioria das vezes, função em situs extravasculares, acreditando-se que a deficiente mobilização extravascular dos leucócitos possa estar relacionada com a susceptibilidade às infecções (39). O número de leucócitos e de neutrófilos do exsudato dos animais

TABELA 8

COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN ENTRE PROTEÍNAS TOTAIS E OS TESTES DE: ÍNDICE DE FAGOCITOSE ( $IP_p$  e  $IP_a$ ), PEROXIDASE ( $IP_p$  e  $IP_a$ ), FOSFATASE ALCALINA ( $IP_p$  e  $IP_a$ ), NBT ESPONTÂNEO ( $IP_p$  e  $IP_a$ ), NBT ESTIMULADO ( $IP_p$  e  $IP_a$ ), NÚMERO DE LEUCÓCITOS ( $/mm^3$ ), REALIZADOS EM NEUTRÓFILOS DO SANGUE DE RATOS DOS GRUPOS CONTROLE E CARENTE EM PROTEÍNAS

	Grupo Controle			Grupo Carente			
	$r_s$ ( $IP_p$ )	$r_s$ ( $IP_a$ )	$r_{tab}$	$r_s$ ( $IP_p$ )	$r_s$ ( $IP_a$ )	$r_{tab}$	
Proteínas totais	Índice de fagocitose	0.16	0.02	0.60	0.18	0.08	0.58
	Peroxidase	0.04	0.31	0.41	-0.34*	0.28	0.34
	Fosfatase alcalina	0.01	0.28	0.41	0.39	0.29	0.40
	NBT espontâneo	0.28	0.39	0.53	0.04	0.05	0.40
	NBT estimulado	0.45	0.56*	0.53	0.26	0.18	0.40
	Número de leucócitos	+	0.64*	0.41	+	0.09	0.34

$r_s$  ( $IP_p$ ) = Coeficiente de Correlação de Spearman obtido com os resultados, em valores percentuais, das amostras em estudo.

$r_s$  ( $IP_a$ ) = Coeficiente de Correlação de Spearman obtido com os resultados, em valores absolutos, das amostras em estudo.

$r_{tab}$  = Coeficiente de Correlação de Spearman, obtido em tabela, de acordo com o número de dados.

\* = Correlações obtidas.

+ = Correlação não efetuada.

TABELA 9

COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN ENTRE PROTEÍNAS TOTAIS E OS TESTES DE: ÍNDICE DE FAGOCITOSE, PEROXIDASE, FOSFATASE ALCALINA, ATIVIDADE BACTERICIDA, NBT ESPONTÂNEO, NBT ESTIMULADO E NBT ESPECTROFOTOMÉTRICO, REALIZADOS EM NEUTRÓFILOS DO EXSUDATO PERITONEAL DE RATOS DOS GRUPOS CONTROLE E CARENTE EM PROTEÍNAS

	Grupo controle		Grupo carente	
	$r_s$	$r_{tab}$	$r_s$	$r_{tab}$
Proteínas totais				
Índice de fagocitose	0.05	0.60	0.25	0.55
Peroxidase	-0.14	0.43	-0.38*	0.34
Fosfatase alcalina	-0.42	0.48	0.37	0.40
Atividade bactericida	0.70	0.80	0.71*	0.68
NBT espontâneo	-0.36	0.60	0.28	0.50
NBT estimulado	0.03	0.53	0.05	0.41
NBT espectrofotométrico	-0.19	0.77	0.43	0.53

$r_s$  = Coeficiente de Correlação de Spearman, obtido com as amostras em estudo.

$r_{tab}$  = Coeficiente de Correlação de Spearman, obtido em tabela, de acordo com o número de dados.

\* = Correlações obtidas.

carentes foi cerca de 610/o menor que o dos controles. Admite-se ainda que a redução na mobilização dos granulócitos esteja relacionado às taxas plasmáticas de cortisol que encontram-se elevadas na deficiência proteica (39).

Embora alguns autores relatem alterações no processo de ingestão de partículas (40) não encontramos diferença entre os grupos estudados, seja quanto à ingestão de partículas inertes seja quanto à de bactérias, assim, não nos parece que o processo de englobamento de partículas pelos neutrófilos tenha sido afetado pela privação proteica.

As granulações específicas dos granulócitos de ratos exibem reação fortemente positiva para a fosfatase alcalina. A função desta enzima ainda não foi esclarecida admitindo-se que possa estar envolvida com a glicogênese e formação de ácidos nucleicos (41), ou reflita o desempenho das granulações específicas (40), ou ainda que, juntamente com a lisozima, exerça função na fase digestiva da fagocitose (42). O comportamento da fosfatase alcalina, em situações de carência proteica não está perfeitamente estabelecido, sendo relatado o aumento de sua atividade em crianças desnutridas. Os nossos resultados demonstram aumento de atividade enzimática nos neutrófilos do sangue e do exsudato dos animais carentes.

A avaliação de alguns mecanismos bactericidas dos neutrófilos pode ser realizada através da determinação de peroxidase, da redução do NBT e da atividade bactericida. Os resultados obtidos indicam que os neutrófilos do exsudato e do sangue dos animais carentes apresentaram menor atividade enzimática da peroxidase que os respectivos controles, fato este

que pode ser relacionado à alteração da atividade bactericida. A maior atividade de enzima em neutrófilos do exsudato parece indicar que, nessas condições, as células encontram-se sob maior atividade metabólica.

Nos polimorfonucleares humanos, durante a fagocitose, a atividade de enzimas relacionadas à função bactericida, como NADPH oxidase e a mieloperoxidase, encontram-se significativamente aumentadas. Nos estados carenciais surgem alterações no metabolismo celular durante a fagocitose. Os dados da literatura quanto à peroxidase são contrários: Avila *et al.* (42), Schopfer e Douglas (16), encontraram valores normais, enquanto Felsenfeld e Gyr (40) relatam valores elevados para esta enzima. Apesar destas divergências, julgamos provável que um dos mecanismos afetados pela carência envolva a peroxidase. Nossos resultados corroboram esta hipótese pois os animais carentes exibiram menor atividade juntamente com uma redução da atividade bactericida.

Introduzimos alguma modificação no teste citoquímico para o NBT espontâneo e estimulado, objetivando conseguir adequada proporção entre células e reagente visando a manutenção da integridade celular e maior intensidade de reação. Reduzimos o tempo originalmente recomendado (21, 32) para a incubação, visto o mesmo acarretar intensa degeneração celular, especialmente nos neutrófilos do exsudato peritoneal. Nos testes de redução do NBT os neutrófilos dos animais carentes exibiram, em valores percentuais maior capacidade redutora. Estes resultados não eram os esperados pois julgávamos que devido a desnutrição uma das prováveis alterações ocorreris em relação às oxidases NADPH ou NADH e seria evidenciada pela diminuição da atividade redutora do teste do NBT. Contudo quando os resultados foram expressos em valores absolutos, demonstrou-se que as células dos animais carentes exibiram menor capacidade em reduzir o NBT, conforme hipótese inicial. A determinação espectrofotométrica do NBT demonstrou que o grupo Carente tem diminuída a sua capacidade em reduzir o corante, reforçando a idéia de que na carência proteica ocorram alterações nos mecanismos oxidativos.

As células do exsudato peritoneal, independentemente do grupo animal, exibiram maior capacidade em reduzir o NBT que os neutrófilos do sangue, o que seria explicável devido à maior ativação dessas células.

A atividade bactericida exibida pelos granulócitos é diretamente proporcional ao número de bactérias mortas e inversamente ao de bactérias viáveis intracelulares (43). Os nossos resultados revelaram que o número de bactérias viáveis intracelulares foi significativamente maior nos animais Carentes do que nos Controles, havendo pois, correlação entre a atividade bactericida e a concentração proteica. Nossos resultados são concordantes com os da literatura, justificando a idéia de que há maior susceptibilidade às infecções nos desnutridos. Estes resultados nos induzem a concluir que na desnutrição proteica ocorram alterações de mecanismos envolvidos no "burst" respiratório (17, 18).

Os neutrófilos provenientes do exsudato peritoneal e do sangue apresentaram comportamento semelhante quanto ao tipo de resposta frente aos testes executados, diferindo no que se refere à intensidade da reação. Esta diferença provavelmente decorre de modificações e estímulos a que estão expostos os neutrófilos peritoneais, fato este que deve ser considerado quando da análise de resultados.

## CONCLUSÕES

O processo de ingestão de partículas inertes e bacteriais não é comprometido pela carência. Nossos resultados demonstraram que na carência proteica os neutrófilos dos animais Carentes apresentaram diminuição da capacidade das células em reduzir o NBT, diminuição da atividade enzimática e da atividade bactericida. Houve correlação direta entre a atividade da peroxidase, atividade bactericida e a concentração proteica plasmática. Acreditamos ocorrerem alterações no metabolismo oxidativo, provavelmente nas oxidases NADH ou NADPH e no sistema envolvendo a peroxidase, acarretando em diminuição da capacidade bactericida dos neutrófilos. Estas alterações contribuem para a maior susceptibilidade às infecções observadas nos estados de má-nutrição. Os neutrófilos obtidos do exsudato peritoneal exibiram reações mais intensas nos testes da peroxidase, de redução de NBT e da fagocitose de partículas de látex.

## SUMMARY

## EFFECT OF PROTEIN DEFICIENCY ON THE PHAGOCYtic FUNCTION OF NEUTROPHILS IN RATS

A study was carried out to determine the effect of protein deficiency on the phagocytic function of blood neutrophils and of peritoneal exudate of rats.

The deficient animals exhibited significantly lower leukocyte and neutrophil values, as well as NBT reduction and diminished peroxidase and bactericidal capacity. Englobement of *S. aureus* and latex particles was found to be normal in both groups. Alkaline phosphatase activity in the neutrophils appear to be increased in the deficient animals.

## BIBLIOGRAFIA

1. Babior, B.M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N. Engl. J. Med.*, **298**: 659-668, 1978.
2. Sbarra, J.A. & M.L. Karnovsky. The biochemical basis of phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **234**: 1355-1362, 1959.
3. Karnovsky, M.L. & J.A. Sbarra. Metabolic changes accompanying the ingestion of particulate matter by cells. *Am. J. Clin. Nutr.* **8**: 147-155, 1960.
4. Babior, B.M., R.S. Kipnes & J.T. Curnutte. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.*, **52**: 741-744, 1973.
5. Allen, R.C., R.L. Stjernholm & R.H. Steele. Evidence for the generation of an electronic excitation(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**: 679-684, 1972.
6. Robbins, S.L. & R.S. Cotran. *Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia, PA., W.B. Saunders, 1979, p. 68.
7. Scrimshaw, N.S. Nature of protein requirements. *J. Am. Diet. Assoc.*, **54**: 94-102, 1969.
8. Lamus, L.R. Desnutrición e infecciones. Importancia en la salud pública. *Arch. Venez. Pueric. Pediatr.*, **41**: 75-93, 1975.

9. Suda, A.K., M. Mathur, K. Deo & M.G. Deo. Kinetics of mobilization of neutrophils and their marrow pool in protein - calorie deficiency. **Blood**, **48**: 865-875, 1974.
10. Aschkenasy, A. On the pathogenesis of anemias and leukopenias induced by dietary deficiency. **Am. J. Clin. Nutr.**, **5**: 14-25, 1975.
11. Belghiti, J., G. Goldfard, H. Gantero, F. Fekete & P. Boivin. Impaired *in vitro* bactericidal power of polymorphonuclear leukocytes in patients with protein-calorie malnutrition. **Surg. Gynecol. Obstet.**, **156**: 489-492, 1983.
12. Yoshida, T. & J. Metcalf. Intermediary metabolites and adenine nucleotides in leukocytes of children with protein-calorie malnutrition. **Nature**, **214**: 525-526, 1967.
13. Ratnakar, K.S., M. Mathur, V. Ramalingaswami & M.G. Deo. Phagocytic function of reticuloendotelial system in protein deficiency - A study in Rhesus monkeys using P-labeled *E. coli*. **J. Nutr.**, **102**: 1233-1237, 1972.
14. Balch, H.H. & M.T. Spencer. Phagocytosis by human leukocytes. Relation of nutritional deficiency in man to phagocytosis. **J. Clin. Invest.**, **33**: 1321-1328, 1954.
15. Shousha, S. & Kamel. Nitro-blue tetrazolium test in children with kwashiorkor with a comment on the use of latex particles in the test. **J. Clin. Pathol.**, **25**: 497, 1972.
16. Schopfer, K. & S.D. Douglas. Neutrophil function in children with kwashiorkor. **J. Lab. Clin. Med.**, **88**: 450-461, 1976.
17. Chandra, R.K. Reduced bactericidal capacity of polymorphos in iron deficiency. **Arch. Dis. Child.**, **48**: 864-868, 1973.
18. Douglas, S.D. & K. Schopfer. Phagocyte function in protein-calorie malnutrition. **Clin. Exp. Immunol.**, **17**: 121-123, 1974.
19. Fried, W., S. Shapiro, J. Barone & A. Anagnostou. Effect of protein derivation on hematopoietic stem cells and on peripheral blood counts. **J. Lab. Clin. Med.**, **92**: 303-310, 1978.
20. Muñoz, E., A. Marcos & M.T. Unzaga. Effect of protein deficiency on the lysosomal enzyme activities of the spleen and thymus of weanling rats. **J. Nutr.**, **111**: 2133-2141, 1981.
21. Park, B.H., S.M. Fikrig & E.M. Smithwick. Infection and nitrobluetetrazolium reduction by neutrophils. **Lancet**, **2**: 532-534, 1968.
22. Calamai, E.G. & J.K. Spitznagel. Characterization of rat polymorphonuclear leukocyte subcellular granules. **Lab. Invest.**, **46**: 597-604, 1982.
23. Bessis, M. **Living Blood Cells and Their Ultrastructure**. New York, N.Y., Springer-Verlag, 1973, p. 52.
24. Gornall, A.G., C.J. Bardawill & M.M. David. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, **117**: 751-766, 1949.
25. Wybenga, D.R. Electrophoresis. In: **Clinical Chemistry Principles and Technics**. New York, N.Y., Harper & Row, 1974.
26. Garcia, P.B. & D. Barbieri. Avaliação da capacidade fagocitária de neutrófilos através de partículas de látex. (Em publicação).
27. Kaplow, L.S. A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. **Blood**, **10**: 1023-1029, 1955.
28. Graham, G.S. Benzidine as a peroxidase reagent for blood smears and tissues. **J. Med. Res.**, **39**: 15-24, 1918.
29. Goodspature, L.E.W. A peroxidase reaction with sodium nitroprosside and benzidine in blood smears and tissues. **J. Lab. Clin. Med.**, **4**: 442-444, 1919.

30. Washburn, A.H. A combined peroxidase and Wright's stain for routine blood smears. *J. Lab. Clin. Med.*, **14**: 246-250, 1928.
31. Meloni-Bruneri, L.H. & D. Barbieri. Determinação citoquímica de peroxidase, da redução do azul de nitro tetrazólio (NBT) e do índice de fagocitose em eosinófilos. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, **19**: 133-145, 1983.
32. Soares-Leonart, M.S. **Redução do Nitroblue Tetrazolium (NBT) e Atividade Fagocitária nos Granulócitos Neutrófilos em Processos Infecciosos**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. São Paulo, Brasil, 63 p.
33. Windhorst, D. B., B. Holmes & R. A. Good. A newly defined x-linked trait in man with demonstration of the lyon effect in carrier females. *Lancet*, **1**:737-739, 1967.
34. Baehner, R.L. & D.G. Nathan. Quantitative nitroblue tetrazolium test in Chronic Granulomatous Disease. *N. Engl. J. Med.*, **278**: 971-976, 1968.
35. Solberg, C.O. Enhanced susceptibility to infection. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, **80B**: 10-18, 1972.
36. Solberg, C.O. & K.B. Hellum. Neutrophil granulocyte function in bactericidal infections. *Lancet*, **2**: 727-730, 1972.
37. Siegel, E. *Estatística Não Paramétrica*, São Paulo, Mc-Graw-Hill, 1981, 350 p.
38. Baehner, R. L., S. K. Murrmann, J. Davis & R. B. Johnston, Jr. The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in phagocytosis-associated oxidative metabolic reactions. *J. Clin. Invest.*, **56**:571-576, 1975.
39. Fruhman, G.J. Extravascular mobilization of neutrophils. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **113**: 968-1002, 1964.
40. Felsenfeld, O. & K. Gyr. Polymorphonuclear neutrophilic leukocytes in protein deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.*, **30**: 1393-1397, 1977.
41. Wachstein, M. Alkaline phosphatase activity in normal and abnormal human blood and bone marrow cells. *J. Lab. Clin. Med.*, **31**: 1-17, 1946.
42. Avila, J. L., V. A. Glaydys, C. Correa, C. Castillo & J. Convit. Leukocytic enzyme differences between the clinical forms of malnutrition. *Clin. Chim. Acta*, **49**: 5-10, 1973.
43. Suda, A.K., M. Mathur, K. Deo & M.G. Deo. Kinetic of mobilization of neutrophils and their marrow pool in protein-calorie deficiency. *Blood*, **48**: 865-875, 1974.