

# **BAIXOS NÍVEIS DE CITOCINAS PRÓ- INFLAMATÓRIAS NA INFECÇÃO *in* *vitro* DE MACRÓFAGOS COM *Staphylococcus aureus* METICILINA RESISTENTE**

Morais, N.G.; Costa, T.B; Pedrosa, A. L. F.; Lira, J. M. B.; De  
Castro, C.M.M.B; Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami,  
UFPE.

Recife, 2014



UFPE 60 ANOS

ENSINO  
PESQUISA  
EXTENSÃO



CCS

Programa de  
Pós-graduação  
em Medicina  
Tropical

# INTRODUÇÃO

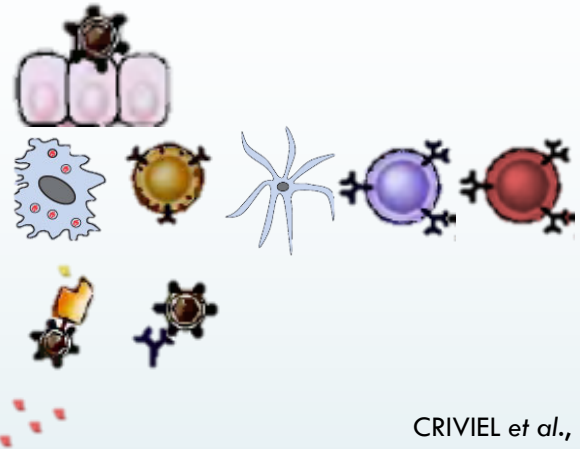
*SISTEMA IMUNE*

Barreiras físicas

Células

Fatores Humorais

Citocinas



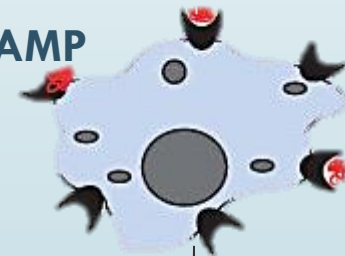
CRIVIEL et al., 2010

PAPEL CRÍTICO

→ **DEFESA** contra agentes infecciosos

PAMP

RRP



Pró-IL-1 $\beta$

Pró-IL-18

IL-1 $\beta$

IL-18

INFLAMASSOMA

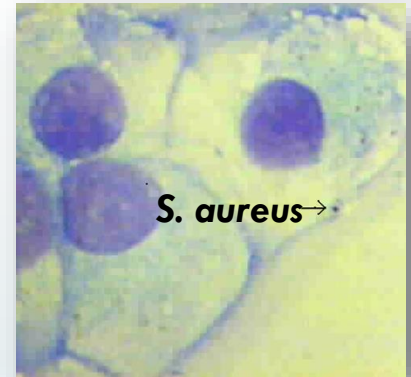
ILIAKIS, KRESSIG, 2014

# INTRODUÇÃO

## *INVASÃO por PATÓGENOS* **MECANISMOS DE ESCAPE da resposta imune**

MORAIS *et al.* 2013

CRUVIEL *et al.* 2010



ALTAS TAXAS DE MORBIDADE E MORTALIDADE  
DESFECHO FATAL ATÉ CINCO VEZES

PEREZ, D'ÁZEVEDO, 2008

FERREIRA *et al.*, 2009

↑ **IFN-  $\delta$ ; IL-10**

COSTA *et al.*, 2012

↓ **NO**

MORAIS *et al.*, 2013

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>; FAGOCITOSE**

MORAIS *et al.*, 2013  
SALGADO *et al.* 2008

**$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ -hemolisinas**

COIA *et al.*, 2012

*RESULTADOS CONFLITANTES*



# OBJETIVO

- **Analisar a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 por macrófagos infectados, in vitro, com *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e sensível à meticilina (MSSA).**

# METODOLOGIA

## ✓ Inóculo bacteriano



Fonte: [www.common.com](http://www.common.com)

Meio TSB + 25% de Glicerol



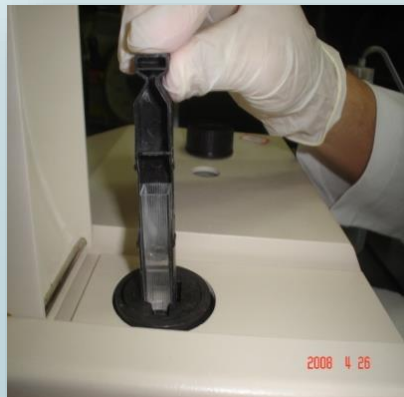
Fonte: Arquivo Pessoal



Fonte: Arquivo Pessoal



Fonte: Arquivo Pessoal



Fonte: Arquivo Pessoal

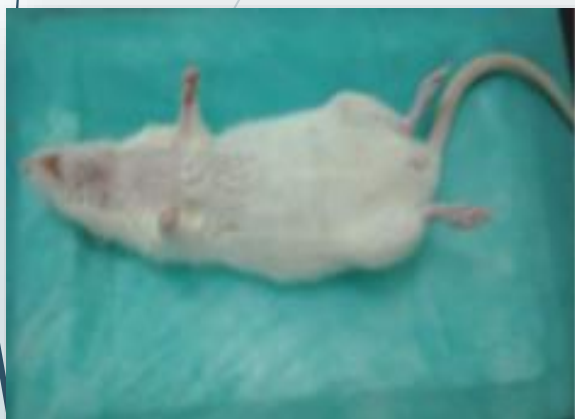
Leitura no espectrofotômetro

**Padronização: densidade óptica de  
0.15 em 570nm, equivalente a  
uma concentração aproximada de  
 $1 \times 10^6$  UFC/mL<sup>-1</sup>**

LU et al. 2007

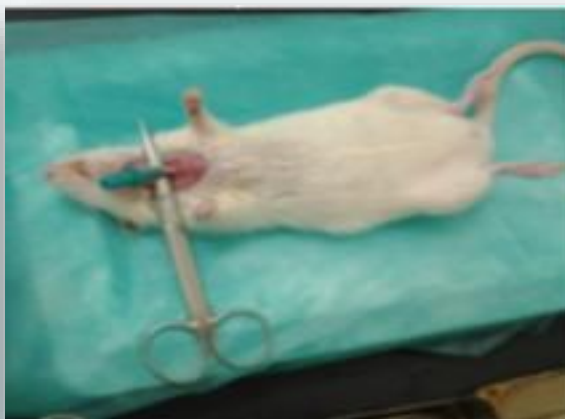
# METODOLOGIA

## ✓ Lavado Broncoalveolar



Fonte: Arquivo Pessoal

Uretana e Cloralose



Fonte: Arquivo Pessoal

Traqueostomia



Fonte: Arquivo Pessoal

Soro fisiológico estéril  
(NaCl 0,9%)

Precipitado  
=  
Células



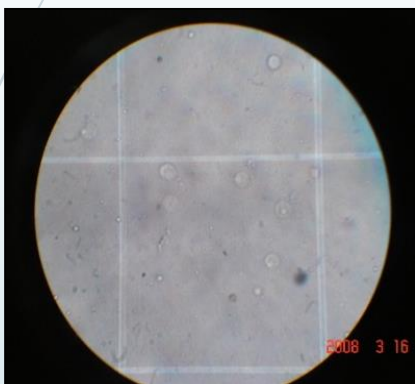
Fonte: Arquivo Pessoal

**Precipitado  
ressuspendido em meio  
RPMI 1640 + 3% SFB**

DE CASTRO *et al.* 1995

# METODOLOGIA

## ✓ Contagem e Cultura dos MA

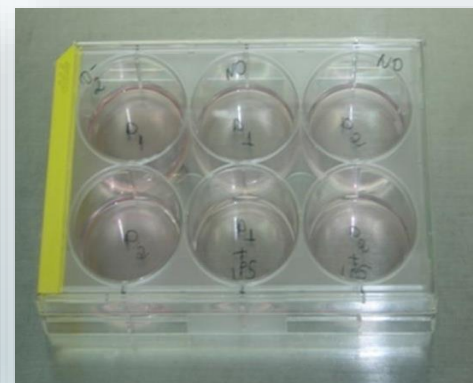


Fonte: Arquivo Pessoal

Contagem em Câmara de Neubauer

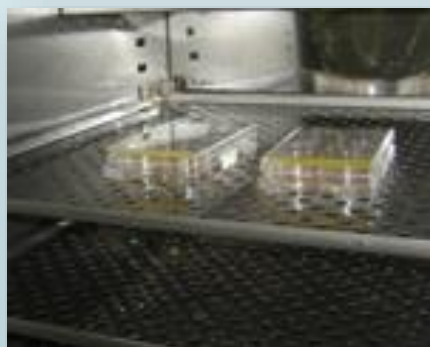


Fonte: Arquivo Pessoal



Fonte: Arquivo Pessoal

Proporção de  $10^6$  células/mL em meio RPMI 1640 + 3% SFB



Fonte: Arquivo Pessoal

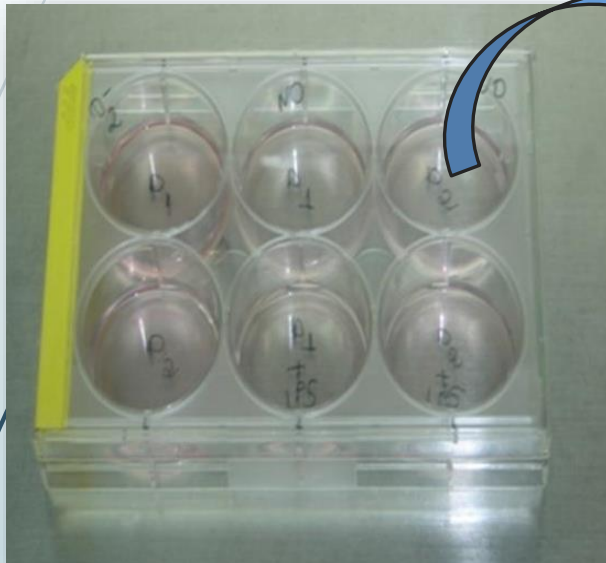
1h; 37°C; com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>;

Controle Negativo

Sistemas-testes {  
MSSA  
MRSA

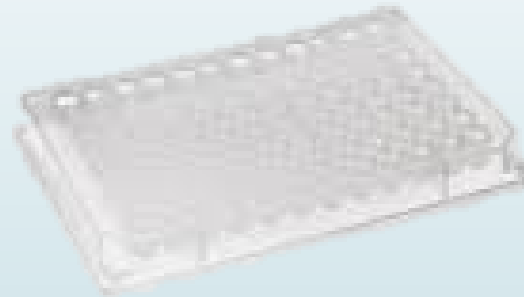
# METODOLOGIA

## ✓ Quantificação da IL-1 $\beta$ e IL-18



Fonte: Arquivo Pessoal

100 $\mu$ L do sobrenadante



**kit Quantikinem, R&D System**

*\*segundo as orientações do fabricante.*

# METODOLOGIA

## ✓ **Análise Estatística**

Foi empregada a ANOVA, para os dados paramétricos. Quando a ANOVA revelou a existência de diferença significativa foi utilizado o teste de *Tukey*, a fim de identificar que grupos diferiram entre si.

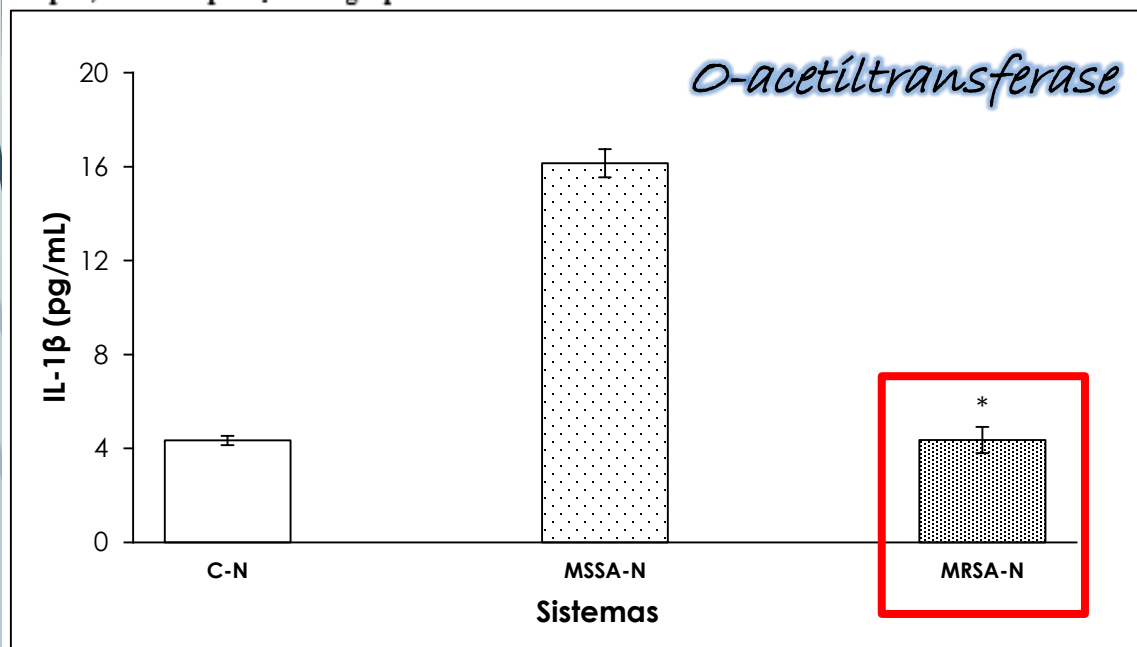
A significância foi definida para  $p < 0,05$ . O programa estatístico empregado para as análises foi o Sigma Stat®.

# RESULTADO

## ✓ Níveis de IL-1 $\beta$

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

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



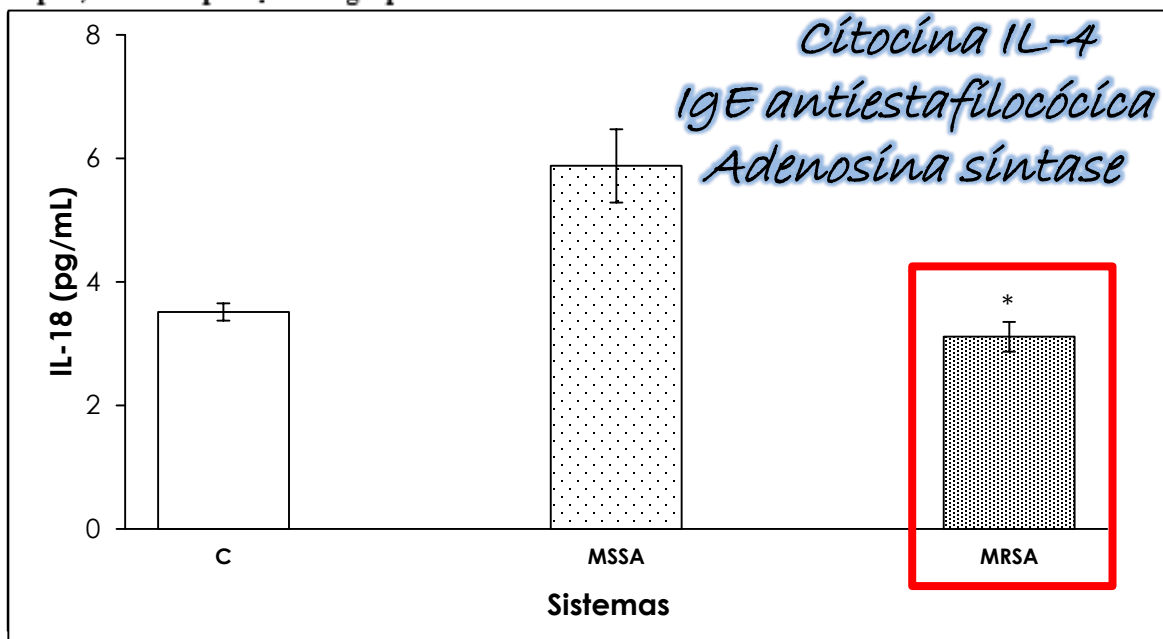
- ✓ LATZ, 2010
- ✓ SOONG et al., 2012
- ✓ SHIMADA et al., 2010

# RESULTADO

## ✓ Níveis de IL-18

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

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



- ✓ LATZ, 2010
- ✓ LALOR et al., 2011
- ✓ MARIANO et al., 2007
- ✓ KIM et al., 2012

# CONCLUSÃO

- **Sugere-se que a resistência à meticilina pode ser um fator que influencia a capacidade de evasão da bactéria à resposta microbida dos macrófagos. Uma vez que houve diferenças importantes quanto à produção de citocinas pró-inflamatórias, que poderão contribuir para a sobrevivência bacteriana, e consequentemente, favorecer a instalação do processo infeccioso.**