

# Avaliação de neutrófilos na desnutrição moderada

W. C. N. FORTE, C. C. L. GONZALES, S. CARIGNANI, I. MIMICA

Disciplina de Imunologia e Microbiologia do Departamento de Ciências Patológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, SP.

**RESUMO – OBJETIVO.** Avaliar a etapa de ingestão da fagocitose e do metabolismo oxidativo de neutrófilos em crianças portadoras de desnutrição moderada.

**MÉTODOS.** Foi analisado o sangue periférico de vinte e duas crianças portadoras de desnutrição moderada, sem infecção, comparando-se os resultados aos de vinte crianças eutróficas da mesma faixa etária (2 a 5 anos de idade). A ingestão fagocitária por neutrófilos foi avaliada através da ingestão de partículas de zimosan e o metabolismo oxidativo avaliado pela redução do nitro blue tetrazolium entre um número fixo de 200 neutrófilos.

## INTRODUÇÃO

Desde a Idade Média era conhecida a associação entre desnutrição e infecção: os portadores de peste bubônica eram reconhecidos pela desnutrição. O mesmo ocorreu no início deste século em relação à tuberculose. Só em 1968 é que Scrimshaw<sup>1</sup> comprovou que a desnutrição propiciava à infecção, observando uma diminuição da mortalidade infantil por sarampo e diarreia após uma única modificação feita durante cinco anos numa aldeia da Guatemala: a suplementação alimentar com farinha de peixe. Iniciaram-se então os estudos sobre a imunocompetência na desnutrição.

Pesquisas mostraram que os órgãos linfóides centrais e periféricos apresentam hipotrofia ou até mesmo atrofia na desnutrição. Foi observada hipotrofia em timo, nódulos linfáticos, baço e tonsilas palatinas<sup>2,3</sup>.

A resposta humoral sérica por IgM, IgG e IgA encontra-se conservada nestes pacientes ou até mesmo elevada quando os pacientes apresentaram infecções de repetição. A IgA secretora acha-se diminuída<sup>4</sup>. Resposta celular está diminuída em pacientes com desnutrição moderada: diminuição de linfócitos timo dependentes (T)<sup>5,6</sup>, de células CD4 positivas, levando a uma tendência à inversão da relação CD4/CD8 na desnutrição<sup>7</sup>. A fagocitose e a quimiotaxia de fagócitos mononucleares está reduzida na desnutrição moderada<sup>8,9</sup>. Todas as pesquisas relatadas foram realizadas em desnu-

**RESULTADOS.** As médias aritméticas da ingestão por neutrófilos de partículas de zimosan, zimosan incubado com soro homólogo e zimosan incubado com soro autólogo foram 18, 41 e 46 em desnutridos e 20, 57 e 63 em eutróficos. A redução espontânea e estimulada de nitro blue tetrazolium foi de 6 e 11 em desnutridos e 12 e 17 em eutróficos.

**CONCLUSÃO.** Concluiu-se haver uma diminuição da etapa da ingestão e do metabolismo oxidativo de neutrófilos nos pacientes estudados portadores de desnutrição moderada.

**UNITERMOS:** Desnutrição. Neutrófilos. Fagocitose Metabolismo oxidativo. Resposta Imunológica.

tridos sem infecção, uma vez que a infecção por si só pode levar a alterações na resposta imune.

Em nosso meio praticamente não existem estudos sobre avaliação dos neutrófilos em desnutridos. Por estas razões, pela grande incidência da desnutrição no Brasil e pela importância dos polimorfonucleares neutrofilicos na defesa individual, é que nos propusemos ao presente estudo.

## OBJETIVO

Avaliação de etapa da ingestão da fagocitose e do metabolismo oxidativo de polimorfonucleares neutrofilicos em crianças portadoras de má nutrição energético-protéica moderada.

## CASUÍSTICA

Foi estudado *in vitro* o sangue periférico de vinte e duas crianças entre dois e cinco anos de idade, seguindo-se os seguintes critérios: ambos os sexos; não portadores de atopias; sem terem recebido imunizações ou transfusões há pelo menos três meses; sem estarem recebendo medicamentos; com déficit ponderal entre 25,1 a 40%<sup>10,11</sup>, com estatura dentro da normalidade<sup>12</sup>, sem edemas; não portadores de infecções afastadas por anamnese, exame físico, leucograma e evolução após quinze dias da coleta.

Como grupo controle foram selecionadas vinte crianças da mesma faixa etária, utilizando-se os

**Tabela 1 – Resultados da ingestão de zimosan por neutrófilos de vinte e duas crianças com desnutrição moderada e de vinte crianças eutróficas (3 ou mais partículas ingeridas)**

		Zy	Zy e SH	Zy e SA
<b>Desnutridos</b>	Média aritmética	18	41	46
	Desvio padrão	0,2	0,4	0,3
<b>Eutróficos</b>	Média aritmética	20	57	63
	Desvio Padrão	0,4	0,6	0,6
<b>Teste de "Student"</b>		p>0,01	p<0,01	p<0,01
Zy= zimosan; SH= soro homólogo; SA= soro autólogo				

**Tabela 2 – Resultados da digestão de NBT por neutrófilos (porcentual entre um número fixo de 200 células) de vinte e duas crianças com desnutrição moderada e de vinte crianças eutróficas.**

		NBT espontâneo	NBT estimulado por LPS
<b>Desnutridos</b>	Média aritmética	6	11
	Desvio padrão	0,4	0,4
<b>Eutróficos</b>	Média aritmética	12	17
	Desvio Padrão	0,2	0,5
<b>Teste de "Student"</b>		p>0,01	p<0,01
NBT= nitro blue tetrazolium; LPS= lipopolissacáride bacteriano			

mesmos critérios, porém, eutróficas<sup>12</sup>.

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa e os exames foram realizados apenas quando outros exames laboratoriais eram solicitados; os pais concordaram que parte do material colhido seria utilizado para pesquisa.

### METODOLOGIA

Para avaliação da ingestão fagocítica foram separados neutrófilos por sedimentação espontânea com temperatura de 37°C. Foram contados 10<sup>6</sup> neutrófilos /ml e realizados três ensaios em tubos de Leighton: 1º) neutrófilos incubados com 10<sup>8</sup>/ml partículas de zimosan (Zy); 2º) neutrófilos, Zy e 200 ml "pool" de soro humano normal; 3º) neutrófilos, Zy e 200 ml de soro autólogo. Após incubação por duas horas com CO<sub>2</sub> a 50% e temperatura de 37°C, foram contados o número de neutrófilos que apresentavam três ou mais vacúolos fagocíticos, entre um número fixo de duzentos neutrófilos.

A etapa da digestão foi observada pelo teste de nitro blue tetrazolium (NBT). Sangue periférico total heparinizado foi incubado em dois momentos: 1º) com solução de NBT tamponada (NBT espontâneo); 2º) com a mesma solução e 50 ml de lipopolissacáride (LPS) de *Escherichia coli* (NBT estimulado). Para leitura foram contados os neutrófilos que reduziram NBT em formazana (azul escuro) entre um número fixo de duzentos neutrófilos.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

### RESULTADOS

Os valores observados encontram-se em forma de tabelas e gráficos.

A tabela 1 e a figura 1 mostram os resultados observados em relação ao número de neutrófilos que apresentaram ingestão de partículas de Zy (Zy), ingestão de Zy incubado com soro homólogo (SH) e Zy incubado com soro autólogo (SA), entre duzentos neutrófilos analisados.

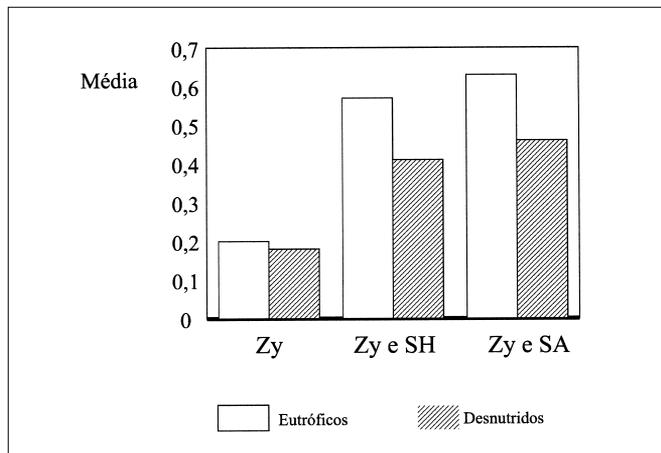
Na tabela 2 e figura 2 encontram-se os resultados observados para NBT espontâneo e NBT estimulado, entre duzentos neutrófilos observados.

Os dados mostram uma diminuição significativa da ingestão por neutrófilos de partículas de Zy com "pool" de soro humano normal, com soro autólogo e da digestão de NBT estimulado com LPS das crianças desnutridas estudadas.

### CONCLUSÕES

A Conferência Mundial de Alimentação, que ocorreu em Roma, em 1996, refere que o Brasil apresenta 9,7 milhões de indivíduos com desnutrição primária. Acredita-se que esses valores possam ser ainda maiores pois os locais com maior número de crianças desnutridas são geralmente regiões carentes e com maior dificuldade de acesso médico, dificultando o diagnóstico da desnutrição.

A má nutrição energético-protéica primária (falta de ingestão de alimentos) crônica propicia a



**Fig. 1** - Ingestão de Zymosan por neutrófilos

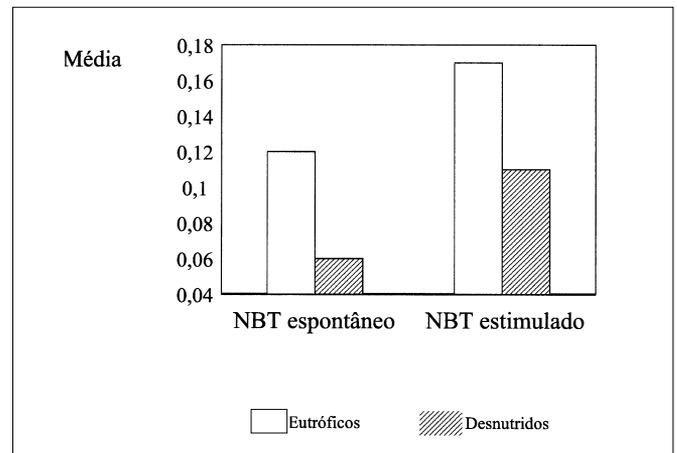
maior frequência de diarreias infecciosas, infecções de vias aéreas superiores (por depressão de IgA secretora), infecções por microorganismos intracelulares como vírus do sarampo, *Mycobacterium tuberculosis* (por diminuição da resposta celular e da atividade de fagócitos mononucleares). Todos estes fatos contribuem com a alta mortalidade e morbidade em pacientes desnutridos.

No Brasil não observamos desnutridos com sinais de hipocomplementemia pois a atividade do complemento está preservada<sup>13</sup>, diferentemente de desnutridos indianos, que por apresentarem desnutrição do tipo Kwashiorkor, e, portanto, maior probabilidade de comprometimento hepático e menor síntese de componentes do complemento<sup>14</sup>, apresentam quadros similares à doenças auto-imunes.

Quanto à avaliação da função neutrofilica, existem poucos estudos na literatura. As pesquisas existentes foram realizadas em outros países. Sabe-se que a desnutrição de regiões diferentes leva a distúrbios nutricionais diversos, o que provavelmente acarreta diferentes distúrbios imunológicos.

Pesquisa em vinte e nove prisioneiros desnutridos na Bósnia mostra diminuição significativa da ingestão e digestão de células "natural killer", sugerindo os autores que talvez ocorra o mesmo com neutrófilos<sup>15</sup>. Trabalho polonês refere diminuição da atividade quimiotática de neutrófilos em crianças desnutridas abaixo de um ano de idade<sup>16</sup>. Autores estudando seis crianças desnutridas no México concluem sobre uma menor capacidade de opsonização pelos neutrófilos<sup>17</sup>. Estudos em desnutridos indianos apontam uma diminuição da capacidade bactericida de neutrófilos desses pacientes<sup>18</sup>.

Polimorfonucleares neutrofilicos são importantes células na defesa contra bactérias piogênicas como *Staphylococcus aureus*. São as células de defesa inicial para esses microorganismos. Os



**Fig. 2** - Redução de NBT por neutrófilos

neutrófilos e células endoteliais, na presença de agentes infecciosos, passam a expressar maior número de moléculas de adesão, como CD15 e selectina respectivamente. Nestas condições deixam o centro dos vasos sanguíneos, passando a se deslocar mais lentamente na periferia destes vasos. As moléculas de adesão dos neutrófilos LFA-1 (antígeno 1 associado à função linfocítica) se unem então aos seus receptores presentes nas células endoteliais - ICAM-1 (molécula 1 de adesão intercelular), havendo consolidação da união entre neutrófilos e células endoteliais. Os neutrófilos deixam, assim, a corrente circulatória e passam para os tecidos onde deverá ocorrer a defesa imunológica.

Na presença de agentes quimiotáticos como lipopolissacárides da parede bacteriana e de citocinas (IL-8) e leucotrieno B4 produzidos por monócitos e macrófagos, ocorre a quimiotaxia de neutrófilos para os locais de infecção.

Diante do agente infeccioso, o polimorfonuclear neutrofilico tenta fagocitá-lo. Numa primeira etapa ocorre a ingestão do agente, através de receptores, formando o vacúolo fagocítico, contendo o antígeno. Os grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos são, então, lançados no vacúolo fagocítico formando o fagolisossoma, onde ocorrerá a digestão. As substâncias contidas nos grânulos como lisozima, fosfatase alcalina, lactoferrina, hidrolases ácidas, arginina, mieloperoxidase, citocromo b 558, serão responsáveis pelo metabolismo oxidativo destas células. Haverá redução do pH intracelular, formação de ânion peróxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Estas substâncias finalmente irão digerir os microorganismos dentro do fagolisossoma e que depois serão eliminados.

A fagocitose de partículas de zimosan utilizada em nossa metodologia avalia a etapa da ingestão por neutrófilos e é semelhante a usada anteriormente

para monócitos<sup>19</sup>, pois monócitos e neutrófilos apresentam receptores análogos para fagocitose. A incubação com soro permite que o complemento seja ativado pelo zimosan, resultando na ativação dos componentes C3b e C5b que se unem a essas partículas e permitem a ingestão. O primeiro ensaio (controle) verifica a migração espontânea da célula, sem estímulos quimiotáticos. O fato de não haver diferença significativa entre o segundo ensaio (células incubadas com Zy e "pool" de soro humano) e terceiro ensaio (células, Zy e soro do próprio paciente), acompanhados da dosagem normal de complemento nesses pacientes, indica que a diminuição da fagocitose seja devida a problema intrínseco do neutrófilo nos desnutridos.

O nitro blue tetrazolium, um corante amarelo e solúvel, capta elétrons liberados durante o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Torna-se reduzido em partículas azuis escuras, denominadas formazana, que se depositam no citoplasma do neutrófilo. O teste do NBT torna-se mais evidente quando estimulado por substâncias como lipopolissacarídeos. Este teste pode então avaliar a liberação de elétrons que ocorre na fase de digestão por metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

Nossos resultados mostram uma diminuição na etapa de ingestão da fagocitose e do metabolismo oxidativo de polimorfonucleares neutrofilicos em crianças portadoras de má nutrição energético-proteica moderada. Esses resultados são coerentes com os dados clínicos de maior frequência de infecções por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* que ocorrem com maior frequência na desnutrição e que dependem da defesa por polimorfonucleares neutrofilicos.

Acreditamos que pesquisas sobre a imunocompetência na desnutrição são importantes, pois indiretamente tentam diminuir a alta incidência de infecções e mortalidade nesses pacientes.

### SUMMARY

#### Evaluation of polymorphonuclear neutrophils in moderate malnutrition

**PURPOSE.** To evaluate the phagocytic function of polymorphonuclear neutrophils in moderate malnutrition.

**METHODS.** The phagocytic function of neutrophils obtained through peripheral blood sampling of twenty two children with moderate malnutrition without infections was analyzed. The results were compared to a group of twenty well nourished children matched for age (two to five years old). The phagocytic function was assessed by the ingestion of zymosan particles and nitro blue tetrazolium reduction among 200 cells.

**RESULTS.** The mean number of zymosan particles ingested by neutrophils incubated with homologous human serum and autologous human serum were 18, 41 and 46 in the malnutrition group compared to 20, 57 and 63 in the well nourished group. The spontaneous and stimulated reduction of nitro blue tetrazolium was 6 and 11 in the malnourished patients, respectively, and 12 and 17 in the well nourished group.

**CONCLUSION.** A decrease in the process of ingestion and digestion during phagocytosis occurs in malnourished patients. [Rev As Med Brasil 1999; 45(2): 147-51.]

**KEY WORDS:** Malnutrition. Polymorphonuclear Neutrophils. Phagocytosis. Oxidative Metabolism. Immune Response.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Scrimshaw NS, Taylor CE, Gordon JE. Interrelation of nutrition and infection. New York. *World Health Organization*, 329 p. (Monograph Serie 57), 1968.
2. Chandra RK. Immunocompetence in undernutrition. *J Pediatr* 1972; 81: 1.194-1.200.
3. Faulk P. The immunological system in health and malnutrition. *Proc Nutr Soc* 1976; 35: 253-61.
4. Sirisinha S, Suskind R, Edelman R, Osvapaka C, Olson RE. Secretory and serum IgA in children with protein-calorie malnutrition. *Pediatrics* 1975; 55: 166-70.
5. Forte WCN, Leão RC. Linfócitos na desnutrição moderada. *Rev Paul Ped* 1986; 12: 26-8.
6. Kulapongs P, Suskind RM, Vithayasai V, Olson RE. In vitro cell-mediated immune response in Thai Children with protein-calorie malnutrition. In, Suskind, R.M, ed. *Malnutrition and the Immune Response*, 4th ed. New York, Raven Press, 1977; 99-104.
7. Forte WCN, Akagawa YY, Leão RC. Subpopulações de linfócitos timo dependentes na desnutrição. *Rev Bras Al Imunop* 1991; 14: 20-2.
8. Douglas SK, Schopfer K. Phagocyte function in protein-calorie malnutrition. *Clin Exp Immunol* 1974; 17: 121-8.
9. Wunder JA, Stinnett TD, Alexander JW. The effects of malnutrition of variables of host defense in the guinea pig. *Surgery* 1978; 84: 542-50.
10. Gomes F. Desnutrición. *Bol Med Hosp Inf Mex* 1946; 3: 543-51.
11. Marques RM, Berquio E, Yunes J, Marcondes E. Crecimiento de niños brasileños, peso y altura en relación com la edad y el sexo y la influencia de factores socioeconomicos. Washington. *Organización Panamericana de la Salud*, 1975 (Publicación científica, 309).
12. Marcondes E. Conceito e classificação dos distúrbios de crescimento. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 1975; 30: 490-4.
13. Forte WCN, Forte AC, Leão RC. Complement system in malnutrition. *Allerg Immunopath* 1992, 20: 157-60.
14. Sirisinha S, Suskind R, Edelman R, Charupatan A C, Olson RE. Complement and C3 proactivator and effect of dietary treatment. *Lancet* 1973; 2: 1016-20.
15. Dekaris D, Sabioncello A, Mazuran R, Rabatic S et al. Multiple changes of immunologic parameters in prisoners of war. Assessments after release from a camps in Manjaca, Bosnia.

## AVALIAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA DESNUTRIÇÃO MODERADA

- JAMA* 1993; 270:995-9.
16. Jakubas - Przew Locka J, Niznikowska - Marks MJ. Motility of polymorphonuclear leukocytes in malnutrition. *Pol Tyg Lek* 1991; 46:888-9.
  17. Soria-Rodriguez C, Arbososa A, Basurto-Celaya G, Santos JI. Capacity of opsonic recognition of polymorphonuclear neutrophils in malnourished children. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1990; 47: 65-71.
  18. Nayak KC, Sethi AS, Aggarwal TD, Chadda VS, Kumar KK. Bactericidal power of neutrophils in protein calorie malnutrition. *Indian J Pediatr* 1989; 56: 371-7.
  19. Forte WCN, Campos JVM, Leão RC. Non specific immunological response in moderate malnutrition. *Allerg Immunopath* 1984, 12:489-95.