



Avaliação das funções dos neutrófilos sob o efeito da penicilina e na presença do *streptococcus agalactiae*

Mariana Massiero*; Andrezza Furquim da Cruz**; Adilson César Abreu Bernardi**; Miriane da Costa Gileno**

*Egressa do Curso de Biomedicina no Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade de Araraquara - UNIARA.

**Docente nos cursos de Farmácia e Biomedicina no Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade de Araraquara - UNIARA.

*Autor para correspondência e-mail: mdcgileno@uniara.edu.br

Palavras-chave

Neutrófilos
Fagocitose
Streptococcus agalactiae
Penicilina

Keywords

Neutrophils
Phagocytosis
Streptococcus agalactiae
Penicillin

Resumo: O *Streptococcus agalactiae* faz parte da microbiota humana, residindo nos tratos geniturinários e gastrointestinais, no entanto, devido ao enfraquecimento do sistema imune esse microrganismo pode proliferar-se e causar sintomas. O *S. agalactiae* é o principal causador de doenças em recém-nascidos, com o sistema imune ainda em formação os bebês podem adquirir a infecção bacteriana através do parto normal quando o bebê está passando pela vagina da mãe, região a qual residem os *S. agalactiae*. São microrganismos sensíveis, porém possuem mecanismos de resistência os quais tentam driblar o sistema imunológico. O sistema imunológico é formado por uma complexa rede de células e moléculas que atuam na defesa do organismo. Os neutrófilos, que fazem parte da primeira linha de defesa, apresentam uma maquinaria intracelular eficaz na destruição dos patógenos, no entanto, esse combate pode apresentar uma complexidade necessitando do auxílio de um antimicrobiano. Diante desse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar as funções dos neutrófilos na presença do *Streptococcus agalactiae* sob o efeito do antimicrobiano mais utilizado nas infecções contra esse microrganismo, a Penicilina. Para a realização desse trabalho foram utilizadas práticas laboratoriais que incluíram o teste de viabilidade celular dos neutrófilos a diferentes doses de Penicilina por azul de Trypan; avaliação da atividade fagocítica do neutrófilo; avaliação da função bactericida do neutrófilo e teste da viabilidade bacteriana. Os resultados demonstraram que a viabilidade celular dos neutrófilos não apresentou alterações relevantes, as concentrações de Penicilina utilizadas para inibir o crescimento da bactéria não prejudicou a estrutura dos neutrófilos, bem como suas funções; o antimicrobiano também não interferiu na atividade fagocítica do neutrófilo. A presença do antibiótico não inibiu o crescimento bacteriano e a atividade bactericida do neutrófilo foi ineficiente, o que pressupõe que os fatores de virulência da bactéria influenciaram nesse resultado.

The evaluation of neutrophil functions under the penicillin effect and in the presence of *streptococcus agalactiae*

Abstract: *Streptococcus agalactiae* is part of the human microbiota, residing in the genitourinary and gastrointestinal tracts, however, due to the weakening of the immune system, this microorganism can proliferate and cause symptoms. *S. agalactiae* is the main cause of disease in newborns, with the immune system still in formation, babies can acquire the bacterial infection through normal delivery when the baby is passing through the mother's vagina, the region in which *S. agalactiae*. They are sensitive microorganisms, but they have resistance mechanisms which try to circumvent the immune system. The immune system is made up of a complex network of cells and molecules that act in the body's defense. Neutrophils, which are part of the first line of defense, have an effective intracellular machinery in the destruction of pathogens, however, this fight can be complex, requiring the help of an antimicrobial. Given this context, the objective of this study was to evaluate the functions of neutrophils in the presence of *Streptococcus agalactiae* under the effect of the most used antimicrobial in infections against this microorganism, Penicillin. To carry out this work, laboratory practices were used that included the cell viability test of neutrophils at different doses of Penicillin by Trypan blue; evaluation of neutrophil phagocytic activity; evaluation of the bactericidal function of the neutrophil and bacterial viability test. The results showed that the cell viability of neutrophils did not show relevant changes, the concentrations of Penicillin used to inhibit the growth of the bacteria did not harm the structure of neutrophils, as well as their functions; the antimicrobial did not interfere in the phagocytic activity of the neutrophil either. The presence of the antibiotic did not inhibit bacterial growth and the bactericidal activity of the neutrophil was ineffective, which presupposes that the bacterial virulence factors influenced this result.

Recebido em: 12/01/2023

Aprovação final em: 11/04/2023



Introdução

Os neutrófilos, que também são conhecidos como leucócitos polimorfonucleares compõem a primeira linha de defesa do organismo e apresentam um amplo mecanismo intracelular que é capaz de destruir os microrganismos por meio da fagocitose, liberação de agentes antimicrobianos e remodelação de tecidos (COICO *et al.*, 2015).

Para que o mecanismo intracelular aconteça de forma eficiente e destrua quaisquer agentes microbianos estranhos presentes no organismo, é essencial e indispensável à presença de sinais químicos específicos através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) e de estruturas moleculares características de patógenos microbianos que são os padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) (SILVA, 2015).

O *Streptococcus agalactiae* é um estreptococo do grupo B, e faz parte da microbiota de membranas mucosas de seres humanos e animais, colonizando principalmente o trato intestinal e geniturinário. A grande relevância médica deste microrganismo está na contaminação de neonatos, ocasionando quadros graves de septicemia, pneumonia e meningite (ARDOLINO *et al.*, 2016 e HACKER, 2018).

A Penicilina é um antimicrobiano do grupo B-lactâmicos e atua consideravelmente em bactérias gram-positivas, os beta-lactâmicos atuam na inibição da síntese da parede celular bacteriana, que é uma estrutura fundamental da célula para manter a sua integridade, protegendo-a da lise osmótica, e são recomendados como primeira linha de tratamento contra *Streptococcus agalactiae*, o mecanismo de resistência está associado à alteração do alvo situado nas proteínas que ligam as penicilinas (PBPs), que são um grupo de enzimas que contribuem na montagem de peptidoglicanos da membrana celular, principalmente de bactérias Gram positivas (JARAMILLO, *et al.*, 2018). Neste trabalho foi discutida a função dos neutrófilos na presença do *Streptococcus agalactiae* sob o efeito da penicilina em diferentes concentrações.

O sistema imunológico é composto por amplas células e moléculas que agem em defesa do organismo, que se designa pela habilidade de reconhecimento de invasores como microrganismos e agentes infecciosos. Entretanto, substâncias desconhecidas não patogênicas podem motivar respostas imunológicas, o próprio sistema de defesa libera partículas estranhas que são suficientes para provocar lesões teciduais. Em vista disso, o sistema imunológico não se embasa somente em impactos contra um agente infeccioso, mas em uma resposta a determinados componentes de um agente microbiano e a pequenas partículas químicas que são identificadas como partículas estranhas (ABBAS *et al.*, 2015).

A defesa contra substâncias infecciosas é iniciada por reações da imunidade inata e por respostas tardias da imunidade adaptativa. A imunidade inata proporciona a primeira linha de defesa contra qualquer partícula estranha presente no organismo. Dispõe de um sistema de defesa natural do organismo, que está pronto antes mesmo de ocorrer a infecção, isso ocorre devido a existência de células apresentadoras de antígeno, as mesmas apresentam receptores específicos para variadas estruturas de microrganismos, por consequência, a resposta ocorre de forma mais rápida. Uma das funções do sistema imunológico é produzir barreiras químicas e físicas, sendo substâncias químicas antimicrobianas produzidas nas superfícies epiteliais células fagocitárias células dendríticas e células NK, mediadores de inflamação e proteínas do sistema complemento. (ABBAS *et al.*, 2015).

A imunidade adaptativa compõe uma forma mais especializada da imunidade, se desenvolve tardiamente e possui a capacidade de reconhecer e responder de forma mais rápida e intensa a repetidas exposições do mesmo microrganismo (COICO *et al.*, 2015).

Os neutrófilos, que também são conhecidos como leucócitos polimorfonucleares compõem a primeira linha de defesa do organismo e apresentam um amplo mecanismo intracelular que é capaz de destruir os microrganismos por meio da fagocitose, liberação de agentes antimicrobianos e remodelação de tecidos (COICO *et al.*, 2015). Circulam como células esféricas de aproximadamente 10 a 15 µm de diâmetro com numerosas projeções membranosas. O núcleo de um neutrófilo é segmentado em três a cinco lóbulos conectados, por isso o sinônimo de leucócito polimorfonuclear. Entretanto, quando a célula se encontra em sua fase jovem, apresenta um núcleo em forma de



bastonete e sem a presença de lóbulos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Seu citoplasma é profuso e possui grânulos dispersos. Seus grânulos primários aparecem na fase de promielócito, que contêm enzimas e polipeptídeos que participam da digestão celular. Os grânulos secundários são encontrados na fase mielocítica e predominam em neutrófilos maduros, que atuam na proteção da célula e combate aos patógenos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Neutrófilos são células que possuem receptores que são moléculas de proteínas, as quais reconhecem diversos antígenos. Migram para o sítio de infecção encaminhado por sinais químicos específicos, onde sua função é reconhecer, fagocitar e destruir o microrganismo invasor. Esses receptores são as quimiocinas, e compõem uma ampla família de citocinas, que são responsáveis pelo deslocamento dos leucócitos (ABBAS *et al.*, 2015). Os receptores de quimiocinas CXCR4 e CXCR2 são fundamentais para a manutenção e liberação dos neutrófilos na medula óssea, após o processo de maturação na medula óssea, os neutrófilos são estimulados pelos receptores de quimiocinas 2 (CXCR2), interleucina 8 (IL-8) e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) que faz com que os neutrófilos adentrem e circulem pelo sangue periférico (SILVA, 2015). São os leucócitos mais abundantes no sangue periférico e possuem um papel fundamental nas etapas precoces de reações inflamatórias, através de sinais químicos de interleucina-1 (IL-1), interleucina-8 (IL-8) e citocina (TNF) ocorre o estímulo de uma série de respostas do organismo para combater o patógeno (ABBAS *et al.*, 2015). Entretanto, para que ocorra uma resposta eficiente é essencial receptores de reconhecimento padrão (PRRs), de estruturas moleculares representativas de patógenos (SILVA, 2015).

O sistema imunológico inato não reconhece somente os padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), mas reconhece também moléculas endógenas que são liberadas ou produzidas por células lesionadas ou mortas, moléculas que são chamadas de padrões moleculares associado ao dano (DAMPs). Tais receptores são expressos na superfície da célula, na membrana plasmática ou na membrana endossômica e em vesículas fagocíticas de numerosas células, localizando-se onde o microrganismo patógeno se encontra presente. As células se conectam aos PAMPs e ao DAMP e estimulam as vias de transdução de sinal que motivam a serem expressas as funções antimicrobianas e pró-inflamatórias das células (ABBAS *et al.*, 2015). Há receptores de reconhecimento padrão, os quais estão relacionadas as vias de transdução intracelular de sinal e que reconhecem e ativam uma resposta celular, esses receptores são os do Tipo Toll (TLRs), que se ligam diretamente aos PAMPs. Segundo ABBAS *et al.*, 2015, existem outros receptores relacionados aos PRRs que provocam respostas inflamatórias na tentativa de combater o patógeno ou colaboram na captura do patógeno para o neutrófilo, entre eles estão os receptores para carboidratos microbianos e os receptores de manose, os mesmos pertencem à lectina de membrana do tipo C (ABBAS *et al.*, 2015).

Após o reconhecimento do patógeno no organismo por meio dos receptores, ocorre a produção de mediadores inflamatórios, que tem como função englobar e interiorizar os antígenos e formar um fagossoma, uma vesícula fagocítica. Posteriormente, ocorre à fusão com o lisossoma, que possibilita que substâncias microbicidas lesionem o microrganismo, simultaneamente, ocorre a ativação da cascata enzimática que gera diversas moléculas microbicidas que são lesivas tanto para parede microbiana, quanto para a parede celular, como óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROS), dessa forma serão destruídos os microrganismos fagocitados (ABBAS *et al.*, 2015). No momento que o neutrófilo é ativado, oxigênio molecular é convertido em espécies reativas de oxigênio (ROS) que são extremamente reativos e destroem os microrganismos. A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) ocorre na membrana plasmática do fagolisossoma por recurso chamado burst oxidativo. Além de tudo, neutrófilos têm a capacidade de destruir os microrganismos pela extrusão de seu DNA e conteúdos granulares, gerando redes extracelulares de neutrófilos (NETs) (ABBAS *et al.*, 2015).

A Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima decorrente de leucócitos, existente em grande parte nos neutrófilos e encontra-se armazenada nos grânulos azurófilos, executa uma importante função antimicrobiana e contribui com a produção de espécies reativas de oxigênio (FURTMULLER *et al.*, 2006). A MPO é armazenada nos neutrófilos na sua forma inativa. Quando os neutrófilos são ativados, ocorre ativação excessiva da enzima NADPH oxidase (NOX2), produzindo grande quantidade de



superóxido (O_2^-). O O_2^- é então convertido em H_2O_2 , espontaneamente ou enzimaticamente. Na presença do H_2O_2 , a MPO é transformada no composto I, um intermediário redox, e pode seguir dois ciclos de reações: o ciclo do halogênio e o ciclo da peroxidase. No ciclo do halogênio, o composto I utiliza haletos ou pseudo-haletos (X-), como Cl^- , Br^- e I^- , produzindo moléculas oxidantes, sendo o HOCl a molécula dominante *in vivo*. O ciclo da peroxidase ocorre na falta de haletos e o composto I é convertido em composto II por um processo de oxidação, formando ERO (FURTMULLER *et al.*, 2006).

Embora a MPO contribua para o combate de microrganismos, em situações onde há intensa produção de agentes oxidantes a MPO pode se tornar um agente responsável ou estimulador de algumas doenças por consequência da sua capacidade de aumentar a inflamação e danificar os tecidos (KHAN *et al.*, 2018). Estudos relataram a participação da MPO na produção das armadilhas celulares de neutrófilos (NETs), uma das vias a qual a MPO favorece patologicamente. Mesmo sendo raro, algumas pessoas podem manifestar uma deficiência de MPO causada por mutações no gene MPO no cromossomo 17. Um quadro de deficiência de MPO leva à diminuição da capacidade bactericida dos neutrófilos contra os microrganismos e também a uma maior sensibilidade às infecções em geral em razão de uma ineficiência na atividade antimicrobiana a alguns patógenos (ROH *et al.*, 2020).

Após a fagocitose, muitos neutrófilos sofrem apoptose e são removidos por macrófagos, prevenindo a liberação de proteínas neutrofílicas que podem causar danos aos tecidos. Foi descrito em 2004 um novo mecanismo de eliminação de patógenos pelos neutrófilos no qual envolve a formação de estruturas denominadas *neutrophil extracellular traps* (NETs), as NETs são formadas a partir da morte dos neutrófilos, durante o processo acontece a perda das membranas intracelulares e mistura dos componentes nucleares e citoplasmático e posteriormente a desintegração da membrana plasmática e liberação das NETs (BRINKMANN *et al.*, 2004). Para que ocorra a formação das NETs, é fundamental que seja gerado através da enzima NADPH oxidase a produção de ERO, uma vez que a inibição da enzima interrompe totalmente a liberação das NETs em neutrófilos. As armadilhas têm como principais funções a captura e atividade antimicrobiana, essas funções resultam em um bloqueio da disseminação do local inicial da infecção (ANDRADE, 2016).

O microrganismo *Streptococcus agalactiae* pertence à microbiota humana, residindo nos tratos geniturinários e gastrointestinais (ARDOLINO *et al.*, 2016 e HACKER, 2018). Modificação dos fatores que contribuem para o controle da microbiota pode favorecer significativamente para o seu crescimento. (CASTELLANO *et al.*, 2008). Durante o período de 1970, os *Streptococcus* beta hemolíticos do grupo B (EGB) eram os agentes etiológicos da mastite bovina, a principal consequência da mastite é a redução na produção de leite e significativa alteração físico-química, o que determina comprometimento da qualidade dos produtos lácteos (LANGONI *et al.*, 2017), e devido a esta referência foi nomeado de *Streptococcus Agalactiae*. Desde então, foi considerado como um poderoso patógeno humano (COUTINHO *et al.*, 2011).

O *Streptococcus agalactiae* são cocos Gram positivos, com diâmetro em torno de 0,6 a 1,2 μm que formam cadeias curtas quando visualizados diretamente nos espécimes clínicos e cadeias mais longas quando visualizados em cultura. Crescem bem em meios nutricionalmente ricos, as colônias de *Streptococcus agalactiae* são grandes, com uma zona estreita de β -hemólise, possuem catalase negativa, oxidase-negativa, são imóveis e não esporulados, considerados e classificados como anaeróbios facultativos, obtendo energia para a síntese de material celular através da fermentação dos carboidratos (CASTELLANO *et al.*, 2008, HACKER, 2018). As cepas de *Streptococcus agalactiae* podem ser identificadas com base em três marcadores sorológicos: antígeno polissacarídico de parede celular grupo específico ou antígeno do grupo B; nove polissacarídeos capsulares tipos específicos (Ia, Ib, II a VIII); e proteínas de superfície. Os polissacarídeos específicos são marcadores de importância epidemiológica, sendo os sorotipos Ia, III e V os mais relacionados a colonização e doença. O entendimento dos sorotipos específicos é de extrema importância para o desenvolvimento de vacinas (MURRAY *et al.*, 2006).

Os principais fatores de virulência dos *S. agalactiae* são a cápsula polissacarídica que auxilia



na fuga, dificultando a fagocitose da bactéria; a hemolisina, uma toxina com particularidades pró-inflamatória, associada à invasão e apoptose celular; a C5a peptidase, que impossibilita o recrutamento de neutrófilos e contribui na invasão de células epiteliais, intermediando a ligação com a fibronectina; o fator de CAMP, que proporciona a lise de células eucarióticas e dificulta a opsonização bacteriana, unindo-se a Fc das imunoglobulinas; ácido lipoteicóico que contribui na adesão da bactéria à célula; a proteína C que facilita na invasão de hialurosidade facilitando a disseminação da bactéria para outras regiões do organismo (MIRANDA, 2016).

Os anticorpos produzidos contra os antígenos capsulares tipos específicos são protetores, o que esclarece parcialmente a predileção e maior incidência das infecções por estes microrganismos em neonatos. Na inexistência de anticorpos maternos, o neonato apresenta um maior risco de adquirir a doença. A colonização genital com estreptococos do grupo B pode aumentar o risco de um parto prematuro. São necessárias as vias clássicas e alternativa do sistema complemento para eliminar os estreptococos do grupo B, em especial os tipos Ia, III e V (CASTELLANO *et al.*, 2008 e HACKER, 2018). Há uma perspectiva de maior disseminação sistêmica do microrganismo em crianças prematuras colonizadas com pequenos níveis de sistema complemento, ou em crianças onde os receptores para o complemento ou para o fragmento Fc de anticorpos IgG não sejam expostos aos neutrófilos. Além disso, considera-se que os polissacarídeos capsulares estreptocócicos tipos específicos Ia, Ib e II expõe um resíduo terminal de ácido siálico. O ácido siálico pode impossibilitar a ativação da via alternativa do sistema complemento, interferindo assim com a fagocitose destas cepas de estreptococos do grupo B (MURRAY *et al.*, 2006).

Os estreptococos do grupo B colonizam o trato gastrointestinal inferior e o trato geniturinário. Aproximadamente 60% das crianças nascidas de mães colonizadas adquirem as cepas maternas e passam a ser colonizadas. A possibilidade de colonização durante o nascimento é maior se a mãe estiver excessivamente colonizada. Outros possíveis fatores de risco para a colonização neonatal são o parto prematuro, a ruptura prolongada de membranas e febre intraparto (MURRAY *et al.*, 2006). Em recém-nascidos com até sete dias de idade a doença é chamada de início precoce, já aquela que se manifesta entre a primeira semana e os três meses de idade é classificada como doença de início tardio. Os sorotipos mais comuns associados à doença neonatal de início precoce são Ia (35% a 40%), III (30%) e V (15%). O sorotipo III é responsável pela maioria das doenças de início tardio. Os sorotipos Ia e V são os mais comuns nas doenças que acometem os adultos (MURRAY *et al.*, 2006).

Streptococcus agalactiae é o agente mais comum de septicemia e meningite em recém-nascidos. A aplicação de uma profilaxia antibiótica intraparto tem sido responsável por uma significativa diminuição de doença neonatal, em torno de 8.000 infecções em 1993 para 1.800 casos registrados em 2002 (MURRAY *et al.*, 2006). O risco de adquirir a doença é maior em gestantes do que em homens e em mulheres não grávidas. Os indícios mais comuns em mulheres grávidas são: infecções do trato urinário, amnionites, endometrites. As doenças que afetam homens e mulheres não grávidas são, especialmente, infecções de pele e tecidos moles, bacteremias, sepsis urinária e pneumonia. As circunstâncias que induzem a aquisição de infecção nessas pessoas incluem diabetes melito, doença crônica renal ou hepática, câncer e infecção pelo vírus HIV (COUTINHO *et al.*, 2011).

Os estreptococos do grupo B crescem em meios nutricionalmente ricos, formando grandes colônias após 24 horas de incubação. Pode ser de difícil visualização ou até mesmo estar ausente a β -hemólise, sendo assim, um problema para detecção dos estreptococos do grupo B quando estiverem presentes na cultura outros microrganismos. Deste modo, para evitar o crescimento de outros microrganismos utiliza-se um meio líquido seletivo com antibióticos, como por exemplo, caldo LIM com colistina e ácido nalidíxico (MURRAY *et al.*, 2006). Para a identificação, pode ser utilizada uma pesquisa preliminar de uma cepa isolada pela demonstração de um teste para a catalase negativo, positivo para o teste de Christie, Atkins, Munch-Petersen e pela hidrólise do hipurato. Os estreptococos do grupo B produzem uma proteína difusível e estável ao calor (fator CAMP) que aumenta a β -hemólise de *Staphylococcus aureus*. O *Staphylococcus aureus* é semeado sob a forma de estria da parte superior até a inferior na placa de ágar e produz esfingomielinase C, que se liga à membrana dos eritrócitos, que no momento em que são expostas ao fator CAMP do



grupo B, as células sofrem hemólise.

O fármaco de escolha para o tratamento de infecções causadas pelo *Streptococcus agalactiae* é a penicilina. Em relação à sensibilidade, as cepas isoladas manifestam sensibilidade à penicilina, que é a droga de escolha para a profilaxia intraparto e também para o tratamento da infecção neonatal pelo EGB. Em casos de alergia a penicilina e ampicilina, os antibióticos utilizados são eritromicina ou clindamicina (KAYSER, *et al.*, 2005). O *Streptococcus agalactiae* é sensível à penicilina, entretanto, na última década foram observados casos isolados de redução de susceptibilidade à penicilina, provocando o aumento da concentração mínima inibitória (CMI) (MIRANDA, 2016).

A resistência ocorre quando um microrganismo deixa de ser afetado por um antimicrobiano ao qual era sensível anteriormente, isso pode ser decorrente de mutações da bactéria ou à aquisição de um gene de resistência. Diante disso, o microrganismo ganha capacidade de resistir à ação de uma concentração estabelecida de um agente antimicrobiano, neutralizando seu efeito e sobrevivendo ao mesmo (JARAMILLO, *et al.*, 2018). Existem alguns tipos de resistência, entre eles a resistência intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca está relacionada às características bioquímicas e estruturais que são do próprio microrganismo, como a ausência ou redução da afinidade do alvo onde o antimicrobiano atua, como a baixa permeabilidade celular e mecanismos de efluxo pela bactéria. Alguns microrganismos possuem capacidade de se defender de um ataque por antimicrobianos e para que isso aconteça há a formação de biofilmes, que impedem que a droga alcance a população bacteriana em concentrações adequadas para erradicá-la, situação essa, que proporciona a possibilidade das bactérias atingirem um equilíbrio entre o crescimento e a morte celular e, por consequência permanecerem estáveis ao longo do tempo (JARAMILLO, *et al.*, 2018).

A prevalência de infecções causadas pelo *Streptococcus agalactiae* pode estar relacionada com a sua habilidade de formar biofilmes. O biofilme é caracterizado como uma comunidade de microrganismos ligados em superfícies de materiais abióticos ou bióticos encapsulados em uma matriz extracelular composta por proteínas, ácidos nucleicos e exopolissacarídeos. Fatores do meio ambiente como temperatura, pH e osmolaridade podem influenciar na produção de biofilmes (MIRANDA, 2016). A formação de biofilmes é um importante fator de virulência associado à linfadenite, cárie dentária, enxertos vasculares, em consequência de formação de biofilmes em superfícies de cateteres, lentes de contato, marca-passos, articulações artificiais e válvulas cardíacas. O biofilme pode preservar o microrganismo tornando-o mais resistente ao antimicrobiano, essa resistência pode estar associada a fatores como a baixa penetração dos antimicrobianos, resultante de uma matriz de exopolissacarídeos, presença de células com o metabolismo baixo no interior do biofilme e transmissão de genes de resistência (MIRANDA, 2016).

A resistência adquirida ocorre quando um microrganismo que, geralmente é suscetível ao antimicrobiano desenvolve uma resistência através de um determinado tipo de modificação genética ou obtém novos genes de outro microrganismo que modifica a sua susceptibilidade ao medicamento. Este tipo de resistência está normalmente relacionado a condições ambientais, como a exposição repetida ao antimicrobiano, fazendo com que o mesmo se adapte e resista ao efeito (JARAMILLO, *et al.*, 2018).

Os antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos são recomendados como primeira linha de tratamento contra *Streptococcus agalactiae*, o mecanismo de resistência está associado à alteração do alvo situado nas proteínas que ligam as penicilinas (PBPs), que são um grupo de enzimas que contribuem na montagem de peptidoglicanos da membrana celular, principalmente de bactérias gram-positivas. PBPs são os principais alvos dos beta-lactâmicos, que têm seu efeito inibitório focado na acilação de um sítio ativo de serina dessas enzimas, que resulta em uma interrupção da síntese da parede bacteriana e morte celular (JARAMILLO, *et al.*, 2018).

Alterações ou transformações na estrutura de um ou mais PBPs, por mutações ou substituição de sequências de aminoácidos, prejudica a qualidade de ligação do antimicrobiano ao alvo, o que afeta seu efeito inibitório. Estudos relataram que o EGB tem 100% de susceptibilidade à penicilina, ampicilina, cefazolina, rifampicina, cloranfenicol e vancomicina, ambas nas cepas de origem humana. Contudo, estudos recentes retrataram um aumento na concentração inibitória mínima de beta-



lactâmicos como a penicilina e a ampicilina em isolados (EGB), expondo concentrações superiores a 0,25 µg / mL (JARAMILLO, *et al.*, 2018).

A Penicilina foi descoberta em 1928 por Alexander Fleming, um médico oficial que iniciou seus estudos com a bactéria *Staphylococcus aureus*, a qual era responsável por ocasionar infecções em soldados. Alexander Fleming tirou férias e deixou em seu laboratório as culturas das bactérias, no Hospital St. Mary, em Londres, sem proteção e supervisão as placas ficaram ali até o retorno de Fleming. Após algumas semanas, Fleming reparou que a cultura estava repleta de bolor e que ao redor do mesmo, não havia presença de *Staphylococcus aureus* o que sugestionava que o fungo teria interrompido a atividade bacteriana. Os estudos demonstraram que o fungo em questão era do gênero *Penicillium* e que a substância secretada por ele era capaz de destruir bactérias (ALEXANDER, 2009).

As penicilinas fazem parte do grupo dos beta-lactâmicos e são frequentemente utilizadas no tratamento de infecções causadas por bactérias sensíveis. A maior parte das penicilinas são derivadas do ácido 6-aminopenicilânico, diferenciando-se umas das outras conforme a substituição na cadeia lateral do seu grupo amino e de acordo com o seu espectro de ação. A benzilpenicilina é eficaz contra bactérias gram-positivas e deve ser administrada por via parenteral devido à sua sensibilidade ao pH ácido do estômago. A fenoximetilpenicilina é resistente a este pH e pode ser administrada por via oral. A ampicilina apresenta resistência ao pH e é eficaz contra bactérias gram-negativas (MURO *et al.*, 2009).

Os beta-lactâmicos atuam na inibição da síntese da parede celular bacteriana, que é uma estrutura fundamental da célula para manter a sua integridade, protegendo-a da lise osmótica. Em bactérias gram-positivas a parede celular é mais densa por conta de uma espessura maior de peptidoglicano, o principal constituinte da parede celular nestas células. O que constitui o peptidoglicano é principalmente N-acetil-glicosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM). A síntese da camada de peptidoglicano envolve a participação da proteína ligadora de penicilina (PBP - *penicillin binding protein*), que atua como enzima neste processo de síntese. As penicilinas exercem sua ação antimicrobiana ao se ligarem e inativarem as proteínas ligadoras de penicilina (PBP) (SANTANA, 2017).

Objetivo Geral

Esse trabalho tem como objetivo, avaliar a atividade fagocítica dos neutrófilos frente ao *Streptococcus agalactiae* sob a interferência da penicilina.

Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade fagocitária do neutrófilo na presença do *Streptococcus agalactiae* e da Penicilina em diferentes concentrações.
- Avaliar a atividade bactericida do neutrófilo na presença do *Streptococcus agalactiae* e da Penicilina em diferentes concentrações.
- Avaliar a viabilidade celular do neutrófilo pelo teste do azul de Trypan na presença da Penicilina em diferentes concentrações.

Materiais E Métodos

Amostra da pesquisa

A amostra sanguínea utilizada nesse trabalho foi coletada da aluna voluntária, onde o material utilizado foi exclusivamente para a obtenção dos neutrófilos totais e soro para opsonizar o Zymosan. A coleta foi realizada no laboratório de Hematologia Clínica da Universidade de Araraquara. Todo procedimento foi realizado com seringa e agulha estéril e descartável. Foi coletado um volume de 20 ml de sangue, transferindo-se 10 mL para o tubo com K₂-EDTA e 10 mL para tubo seco para obtenção de soro. Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Uniara, sob o registro do CAAE n° 30671620.9.0000.5383.



Separação de neutrófilos

O sangue colhido com EDTA foi centrifugado a 400 g (raio =16 cm) durante 10 minutos, em seguida foi retirado o plasma e o volume foi reconstituído com PBS. Adicionou-se uma solução de gelatina 2% em Na Cl 0,15 M mantida a 37° C. As suspensões de células sanguíneas reconstituídas com PBS foram homogeneizadas e incubadas a 37° C durante 30 minutos. Após a incubação, retirou-se o sobrenadante rico em neutrófilos e lavou-se três vezes com PBS durante 10 minutos a 200 g (raio = 16 cm), e para finalizar ressuspendeu-se o sedimento celular com 3 mL de tampão PBS pH 7,4.

Preparação do Zymosan- opsonizado (ZO) 10 mg/ mL

Para a preparação do Zymosan foi adicionado 150 mg do mesmo em 15 mL de água tipo I, ferveu-se por aproximadamente 10 minutos até ficar em consistência pastosa, centrifugou-se a 200 x g por 5 minutos, lavou-se uma vez com PBS. Ressuspendeu-se em 10 mL de PBS, os quais foram divididos em alíquotas de 1 mL. Centrifugou-se por 5 minutos a 200 x g, lavou-se uma vez com PBS sendo desprezado o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensão com 1 mL de PBS. Durante o uso essa suspensão foi mantida o gelo.

Contagem de neutrófilos em câmara de Neubauer

Posteriormente a obtenção dos neutrófilos totais através do sangue coletado com anticoagulante, os mesmos foram submetidos para contagem na câmara de Neubauer. Nessa metodologia, foi preparada uma suspensão de célula com 10µL de suspensão de neutrófilos e líquido de Turk, que resultou a amostra uma diluição com proporção de 1:20. O líquido de Turk tem como função lisar completamente as hemácias, o que possibilita destacar somente os leucócitos, proporcionando uma contagem simples e eficaz. Para a realização da metodologia, uma alíquota da amostra foi pipetada e inserida na câmara de Neubauer para contagem, essa contagem foi realizada em microscopia com a lente objetiva de 10X (aumento de 100x). A suspensão foi ressuspensão para 5×10^6 neutrófilos /µL.

Preparação da bactéria

As colônias de *Streptococcus agalactiae* (cepa ATCC-13813) utilizadas nesse projeto foram fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade de Araraquara. Essas colônias foram semeadas em Ágar BHI, as colônias foram suspensas em tampão salina estéril, obedecendo ao padrão de turvação da escala nefelométrica Mc Farland de número 0,5, para determinar a intensidade de multiplicação bacteriana. A quantidade de bactéria presente nessa suspensão foi de $1,5 \times 10^8$ (NEFELOBAC).

Preparação da Penicilina

Para obter uma concentração adequada de Penicilina, foi preciso ressuspender um frasco em tampão PBS, em seguida diluiu-se até chegar à concentração de 2000 µg/ mL. As concentrações no teste CIM foram 1.000; 500; 250; 125; 62,2; 31,25; 15,6; 7,8; 3,9; 1,95; 0,98; 0,49; 0,24; 0,12; 0,06 µg /mL.

Teste para obter concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da Penicilina

Para obter a concentração inibitória mínima para esse trabalho, foi realizado o teste CIM. Esta técnica foi utilizada na avaliação da sensibilidade ao agente antimicrobiano (Penicilina), e envolveu a preparação de diluições seriadas do mesmo, em um meio de cultura líquido.

A suspensão da bactéria foi obtida a partir de um cultivo de *S. agalactiae* em meio BHI. A bactéria foi adicionada a um tubo contendo 2 mL de PBS, pH 7,2 até que atingisse a turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL).

Para a determinação da CIM, foi utilizada a técnica de macrodiluição em caldo segundo o CSLI (2013). Para o teste, foram realizados 3 controles: controle negativo contendo apenas caldo BHI



acrescido de 100µL de PBS, controle da droga contendo apenas caldo BHI acrescido de 100 µL de penicilina na maior concentração e o controle de crescimento bacteriano contendo 1 mL de BHI acrescido de 100 µL da suspensão bacteriana. Foram utilizadas 15 concentrações de penicilina com redução progressiva da concentração na razão 2: 1.000; 500; 250; 125; 62,2; 31,25; 15,6; 7,8; 3,9; 1,95; 0,98; 0,49; 0,24; 0,12; 0,06 µg /mL em volume final de 1 mL. Posteriormente à diluição, foram adicionados 100 µL da suspensão bacteriana em todas as concentrações, obtendo-se assim uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL. Os tubos foram então, incubados em estufa a 37°C por 24 horas para leitura de turvação.

A CIM foi determinada pela menor concentração de penicilina onde não houve crescimento do *S. agalactiae*, comparando-se com o controle negativo.

Após a leitura dos tubos no teste do CIM, foram semeados 20 µL da suspensão bacteriana em placa de ágar Mueller-Hinton acrescido de sangue e as placas foram incubadas por 24h a 37°C. O crescimento foi observado e a CBM determinada considerando-se a menor concentração de penicilina capaz de impedir o crescimento bacteriano visível.

Teste de viabilidade celular dos neutrófilos a diferentes doses de Penicilina por azul de Trypan

Os neutrófilos foram separados pelo método de gelatina a 2%. Após contagem das células, essas foram ressuspensas para 5×10^6 células/mL. Este ensaio foi realizado para determinar se as concentrações da Penicilina utilizadas no experimento, não alteraram a viabilidade celular dos neutrófilos.

1×10^6 de células/ mL foram incubadas em PBS na presença e na ausência (controle da reação) da Penicilina nas concentrações de 1,95; 0,98; 0,49; 0,24; 0,12; 0,06 µg /mL. O ensaio foi realizado em três tempos diferentes de incubação: 30 minutos, 60 minutos e 90 minutos. O volume final da reação foi de 250 µL, com 50 µL de neutrófilo, decorrido o tempo de incubação, 50 µL da solução da reação foram incubados por 5 minutos em 20 µL de Azul de Trypan. Cem células foram contadas em Câmara de Neubauer e o resultado obtido a partir da porcentagem de células vivas (não coradas, portando, íntegras e viáveis) e mortas (coradas em azuis devido á permeabilização da membrana que permite a entrada do corante). A fórmula usada para o cálculo foi: O percentual de viabilidade celular, na presença da substância em estudo, foi calculado pela proporção do número de células viáveis para cada concentração e o número de células viáveis do controle.

Avaliação da atividade fagocitária do neutrófilo

Para avaliar a atividade fagocitária do neutrófilo, estes foram incubados a 37° C em tempos de 30,60 e 90 minutos com *Streptococcus agalactiae* e Penicilina em diferentes concentrações. Para esse fim, foi preparado um tubo de controle negativo sem antibiótico e os demais tubos contendo concentrações de Benzilpenicilina Benzatina de: 1,95; 0,98; 0,49; 0,24; 0,12; 0,06 µg /mL, 1×10^6 /µL neutrófilos, 25 µL de suspensão de *Streptococcus agalactiae*, 10% de soro fetal bovino, 1 % de Zymozan opsonizado e tampão PBS. Todas as reações tiveram o volume final de 250 µL. Os tubos foram levados a banho maria de 37° C por 30 minutos, 60 minutos e 90 minutos. Os esfregaços foram confeccionados em seus devidos tempos, corados pelo método de Rosenfeld modificado e então foi feita a leitura.

Avaliação da função bactericida do neutrófilo

Para avaliar a função bactericida do neutrófilo, estes foram incubados a 37° C em tempos de 30,60 e 90 minutos com *Streptococcus agalactiae* e Penicilina em diferentes concentrações. Para esse fim, foi preparado um tubo de controle negativo sem antibiótico e os demais tubos contendo concentrações de Benzilpenicilina Benzatina de: 1,95; 0,98; 0,49; 0,24; 0,12; 0,06 µg /mL, 1×10^6 /µL neutrófilos, 25 µL de suspensão de *Streptococcus agalactiae*, 10% de soro fetal bovino, 1 % de Zymozan opsonizado e tampão PBS. Todas as reações tiveram o volume final de 250 µl. Os tubos foram levados a banho maria de 37° C, no intervalo de tempo de 30 minutos, 60 minutos e 90 minutos, as células foram sonicadas para a disruptura da parede celular e em seguida realizou-se a semeadura



da suspensão em Ágar BHI com o auxílio de uma pipeta de 10 µl e incubadas a 37° C por 24 horas.

Resultados e discussão

Teste de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Os tubos foram inspecionados visualmente para evidenciar o crescimento bacteriano que se traduz em um aumento da turbidez. O tubo límpido demonstra que não houve crescimento bacteriano e apresenta a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. O teste CIM desse trabalho demonstrou que a partir do tubo 10 ocorreu turvação, ou seja, as concentrações de 1,95; 0,98; 0,49; 0,24; 0,12; 0,06 µg /mL não inibiram o crescimento do *Streptococcus agalactiae* (Figuras 1 e 2).

Figura 1 - Resultado do teste CIM em caldo BHI, apresentando turvação a partir do tubo 10 contendo 3,9 µg /mL de penicilina.



Figura 2 - Resultado do teste CBM em Ágar sangue, apresentando crescimento bacteriano.

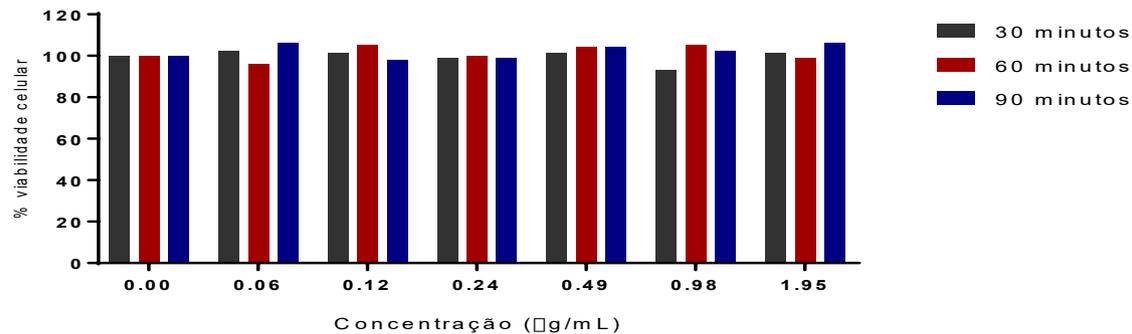


Teste de viabilidade celular dos neutrófilos a diferentes doses de Penicilina por azul de Trypan

Para verificar o efeito das diferentes concentrações da Penicilina sobre os neutrófilos, foi realizado o teste de viabilidade celular utilizando o método do azul de Trypan. Foi observado que a penicilina não interfere no ciclo celular do neutrófilo, uma vez que as células se mantiveram viáveis em todas as concentrações estudadas (Figura 3).



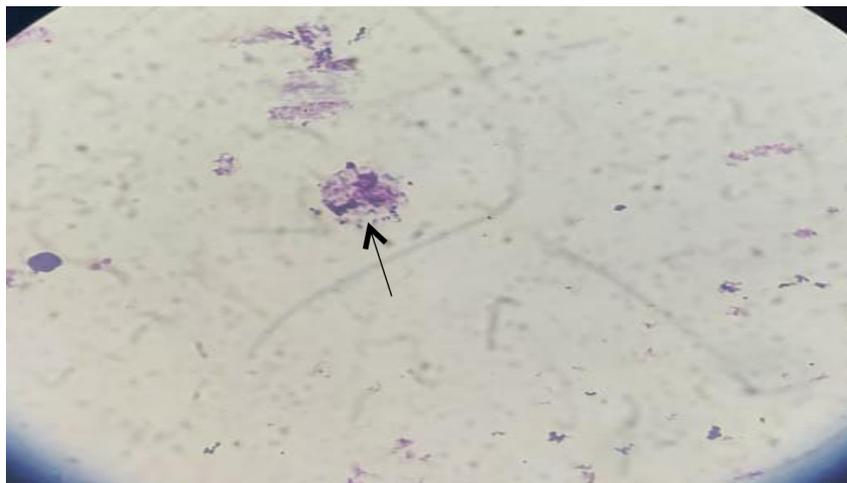
Figura 3 - Viabilidade celular dos neutrófilos frente a diferentes doses de Penicilina pelo teste do Azul de Trypan.



Teste da atividade fagocítica do neutrófilo

Após serem expostos ao *Streptococcus agalactiae* e na presença e ausência da Penicilina, os neutrófilos foram contados e analisados em microscopia. Constatou-se que em todas as concentrações de Penicilina, até mesmo em sua ausência (controle negativo) ocorreu fagocitose do *Streptococcus agalactiae*. Então, conclui-se que independente da concentração do antimicrobiano ou do tempo de exposição, o neutrófilo foi capaz de fagocitar a bactéria (Figura 4).

Figura 4 - Neutrófilo exercendo sua função fagocítica após exposição à Penicilina e *Streptococcus agalactiae* (Concentração 1,95 µg/mL- tempo 60 minutos).



Atividade bactericida dos neutrófilos

O estudo realizado demonstrou que em todas as concentrações de Penicilina houve crescimento bacteriano, mesmo no controle negativo o qual não possuía o antimicrobiano, constatando então, que os neutrófilos não foram capazes de destruir o *Streptococcus agalactiae* independente da concentração da Penicilina ou do tempo de ação. Visto que, as concentrações utilizadas não inibiram o crescimento bacteriano, como observado no teste CIM. Portanto, ocorreu um efeito da bactéria sobre o neutrófilo (Figura 5).



Figura 5 - Crescimento de *Streptococcus agalactiae* em meio nutritivo de Ágar BHI, na presença de diferentes concentrações de Penicilina.



O sistema imunológico é constituído por uma ampla rede de células e moléculas que agem em defesa do organismo, as quais têm como característica o reconhecimento e ataque aos agentes infecciosos. Na primeira linha de defesa do organismo estão os neutrófilos, que apresentam uma maquinaria intracelular eficiente para destruição de patógenos. Entretanto, essa batalha contra microrganismos pode apresentar um alto grau de dificuldade, necessitando então, de um auxílio de um antimicrobiano. Diante disso, realizou-se experimentos para avaliar as funções dos neutrófilos sob o efeito do antimicrobiano Penicilina e as ações geradas pelos *Streptococcus agalactiae*.

A colonização por *Streptococcus agalactiae* gera uma resposta imunológica, a qual recruta células que atuam na intenção de eliminar o microrganismo. Quando o *S. agalactiae* coloniza o organismo, os polimorfonucleares são recrutados rapidamente por quimiotaxia e desencadeiam a resposta imunológica. Para que ocorra uma resposta imune eficiente, é indispensável a presença de receptores de reconhecimento padrão, os quais o sistema imune inato reconhece, interage e traduz os sinais, que estimulam as funções antimicrobianas e pró-inflamatórias dos neutrófilos, promovendo a captação e eliminação do patógeno (ROSALES *et al.*, 2016).

Entretanto, o *S. agalactiae* pode escapar do sistema imune ao se aderirem nas células epiteliais do hospedeiro, que por conta da sua cápsula impede a captura e destruição pelos neutrófilos, podendo também produzir exotoxinas que inativam ou destroem os leucócitos (BRADLEY, 2002). Estudos demonstraram fatores de virulência relacionados com infecções em seres humanos, onde há evidências para a β -hemolisina/citolisina que possibilita a entrada da bactéria na célula, favorecendo a sua sobrevivência e disseminação sistêmica com lise celular e falência de órgãos vitais, C5a peptidase que impossibilita o recrutamento de neutrófilos e viabiliza a adesão celular, serina protease que impede a cascata de coagulação, proteínas 21 ligantes de penicilina que conferem resistência aos peptídeos catiônicos antimicrobianos, adesina bacteriana imunogênica que promove aderência às células hospedeiras e inibe o sistema complemento, bem como aderência à célula do hospedeiro (RAJAGOPAL, 2009).

Perante o exposto, e baseando-se nos resultados obtidos da atividade da Penicilina, verificou-se que a viabilidade celular dos neutrófilos não apresentou alterações relevantes, isto é, as concentrações de Penicilina utilizadas para inibir o crescimento da bactéria não prejudicaram a estrutura dos neutrófilos, bem como suas funções em defesa do sistema imunológico, uma vez que, como demonstra na Figura 11, as células permaneceram viáveis após exposição ao antimicrobiano.

A viabilidade do *S. agalactiae* perante as concentrações de Penicilina não foi alterada, essa confirmação foi notada através do crescimento bacteriano em meios de cultivo. A presença da Penicilina



não impediu o crescimento dos *S. agalactiae*. Esse acontecido pode ser justificado pela resistência aos antimicrobianos, ou até mesmo pela utilização de doses insuficientes do mesmo. De acordo com JARAMILLO *et al.*, 2018, essa resistência pode estar relacionada a fatores como baixa penetração do antimicrobiano devido a uma matriz de exopolissacarídeos, alterações ou transformações na estrutura das proteínas que ligam as Penicilinas (PBPs).

A atividade fagocítica do neutrófilo na presença do *S. agalactiae* foi testada, e notou-se uma função fagocítica satisfatória, onde em todos os tempos e concentrações da Penicilina o neutrófilo foi capaz de fagocitar a bactéria, concluindo então, que as concentrações utilizadas do antimicrobiano não influenciaram na atividade fagocítica do neutrófilo.

Contudo, mesmo possuindo uma atividade fagocítica satisfatória, os neutrófilos não foram eficazes na destruição da bactéria. A ineficiência da função bactericida foi confirmada através do cultivo da bactéria em meio nutritivo juntamente com os neutrófilos, onde apresentou crescimento. Uma possível explicação para esse resultado seria que, tratando-se de um teste *in vitro*, o mesmo não possui todas as moléculas e componentes do sistema imune, sendo assim, a resposta imunológica pode não ser eficiente.

De acordo com ARPINO *et al.*, 2011, os *Streptococcus agalactiae* possuem em seu genoma, o gene *sodA*, que é capaz de codificar uma superóxido dismutase com cofator de Mn^{2+} , essa enzima compõe um dos principais mecanismos de defesa das células contra o estresse oxidativo.

As respostas inflamatórias humoral e celular que colaboram para a depuração de *S. agalactiae* no hospedeiro são a opsonização da bactéria com anticorpos específicos ou com complemento, seguida de fagocitose por macrófagos ou neutrófilos. Entretanto, a funcionalidade das células fagocíticas pode ser importante na patogênese da infecção por *S. agalactiae*. O mecanismo de morte de fagócitos inclui a produção de metabólitos de oxigênio altamente microbicidas reativos durante a chamada explosão oxidativa, que normalmente é induzida pelo envolvimento da bactéria. Intermediários reativos de oxigênio, incluindo ânions superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila ($OH\cdot$), têm muitos efeitos deletérios nos organismos vivos, que pode causar danos graves ao DNA, RNA, proteínas e lipídios (POYART *et al.*, 2001)

A morte bacteriana oxidativa por neutrófilos e macrófagos envolve uma NADPH oxidase, que se engloba na membrana fagossômica e converte o oxigênio em superóxido no momento em que as bactérias são ingeridas. As bactérias são capazes de usar cinco mecanismos enzimáticos para desintoxicar os radicais de oxigênio, esses mecanismos envolvem superóxido dismutase (SOD), catalase, NADH oxidase, alquil hidroperóxido redutase e glutathione redutase. Como todos os estreptococos, o *S. agalactiae* é um anaeróbio facultativo e não possui catalase. A inexistência dessa enzima neste gênero bacteriano indica que a SOD pode desempenhar um papel importante contra o estresse oxidativo, afetando tanto a sobrevivência quanto, por consequência, a virulência da bactéria (POYART *et al.*, 2001)

Estudos realizados demonstraram que o *S. agalactiae* é habilidoso em entrar e persistir de forma eficiente em macrófagos, a posição intracelular de *S. agalactiae* em macrófagos é capaz de proteger essas bactérias da atividade microbicida dos neutrófilos e da ação de antimicrobianos. De acordo com POYART *et al.*, 2001, a enzima SOD desempenha um papel na patogenicidade do *S. agalactiae* e é fundamental para a sua sobrevivência e proteção de *S. agalactiae* contra o estresse oxidativo, o que explicaria a ineficiência da função bactericida testada nesse trabalho.

Conclusão

Os resultados observados nesse trabalho denotam uma viabilidade dos neutrófilos sob o efeito do antimicrobiano Penicilina, o que comprova que os níveis de concentrações utilizadas não influenciaram na viabilidade do mesmo.

Em relação às funções dos neutrófilos, concluiu-se que mesmo com a atividade fagocítica eficiente, o neutrófilo não foi capaz de destruir a bactéria, pois o *S. agalactiae* possui fatores de virulência que podem contribuir significativamente para sua sobrevivência, interferindo na função bactericida dos neutrófilos.



Referências

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 335 p. v. 2.
- ABRAHAM L. Kierszenbaum. **Histologia e Biologia celular, Uma introdução à patologia**. 3ª edição. Elsevier, 2012
- ALEXANDER, F. **A descoberta da penicilina**. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro, p. 1, 5 out. 2009.
- ANDRADE, F. F. D. ;PENAFORTE, C. L.; VELOSO, C. A. **Mecanismos moleculares de formação das armadilhas extracelulares dos neutrófilos e seu papel na imunidade inata**. Arquivos de Ciências da Saúde, v. 23, n. 2, p. 03-08, jul. 2016.
- ARPINO, Clarisse M. *et al.* **Genes de virulência de Streptococcus agalactiae associados à mastite bovina em rebanhos de Minas Gerais**. Orientador: Patricia Gomes Cardoso. 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2011.
- BABIOR, B. M. NADPH Oxidase: na update. **Blood: the journal of hematology**. New York, v.93,pt.5,p.1464-1476, 1999.
- BENZETACIL – Benzilpenicilina benzatina. **Momenta Farmaceutica Ltda: Eurofarma Laboratórios S.A.** 04/18.
- BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, London, v. 164, n. 2, p. 116-128, Sept. 2002.
- COICO, Richard *et al.* **Imunologia**. Tradução: Ellen F. Toros *et al.* 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. 380 p.
- CRUVINEL, W. M. *et al.* Sistema Imunitário-Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. Bras. Reumatol.** São Paulo, v. 50, n. 4, p. 434-447, Aug. 2010.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. **Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo**. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 43, p. 61-68. 1997.
- FURTMULLER, P. G.; ZEDERBAUER, M.; JANTSCHKO, W.; HELM, J.; BOGNER, M.; JAKOPITSCH, C.; OBINGER, C. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 445, n. 2, p. 199-213. 2006. DOI: 10.1016/j.abb.2005.09.017.
- JARAMILLO-Jaramillo AS, Cobo-Ángel CG, Moreno-Tolosa Y, Ceballos-Márquez A. Resistencia antimicrobiana de Streptococcus agalactiae de origen humano y bovino. **Rev. CES Med. Zootec.** 2018; Vol 13 (1): 62-79.
- JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, José. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 554 p.
- KHAN, A; ALSAHLI, M; RAHMANI, A. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: recent biochemical and pathological perspectives. **Medical Sciences (Basel)**, v. 33, n. 6, p. 01-21, 2018. DOI:



10.3390/medsci6020033.

KATZUNG, Bertram G. *et al.* **Farmacologia Básica e Clínica**. Tradução: Fernando D. Mundim *et al.*, 6. ed. [S. l.]: Guanabara Koogan, 1998.

KIERSZENBAUM, Abraham L. *et al.* **Histologia e Biologia celular: Introdução à patologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 720 p.

KLEBANOFF, S. J. **Microbicidal mechanisms, oxygen-dependent**. Department of Medicine, University of Whashington. p. 1714-1718, 1998.

MACHADO, P. R. L. *et al.* **Mecanismos de resposta imune às infecções**. Anais Brasileiros de Dermatologia., v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MIMS, Cedric *et al.* **Microbiologia Médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

MIRANDA, Priscila S. D. **Estreptococos do grupo B de origem humana e bovina: formação de biofilme e expressão de genes de resistência**. Orientador: Priscila Emy Negão ferreira. 2016. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

MURRAY, Patrick R. *et al.* **Microbiologia Médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 979 p.

PAGE, Clive *et al.* **Farmacologia integrada**. 2. ed. Tambore: Manole, 2004.

PINHEIRO, D. S. *et al.* **Atlas Virtual de Hematologia**. Disponível em: <https://lacs.icb.ufg.br/p/19038-atlas-virtual-de-hematologia>. Acesso em: 12 jan. 2022.

POYART, Claire *et al.* Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. **Infection and immunity**, v. 69, n. 8, p. 5098-5106, 2001.

RAJAGOPAL, L. Understanding the regulation of group B Streptococcal virulence factors. **Future Microbiology**, London, v. 4, n. 2, p. 201-221, Feb. 2009.

RANG, H.P. *et al.* **Farmacologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

ROH, S *et al.* **Myeloperoxidase Deficiency Manifesting as Pseudoneutropenia with Low Mean Peroxidase Index and High Monocyte Count in 4 Adult Patients**. American Society For Clinical Pathology, v. 51, n. 2, p. e16-e19, 2020. DOI: 10.1093/labmed/lmz060.

ROSALES, C. *et al.* Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity. **Journal of Immunology Research**. v. 2016, p. 1-2, 2016.

SANTANA, Rodrigo C. **Antibióticos beta-lactâmicos**. Curso Básico de Antimicrobianos Divisão de MI – CM – FMRP-USP, [s. l.], 2017.

TORTORA, G. J. ;FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. São Paulo. Editora Artmed, 2012.