Silvio Pires Gomes

Avaliação estereológica da microestrutura do fígado em animais desnutridos e submetidos à renutrição protéica.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi

São Paulo

2011

RESUMO

GOMES, S. P. **Avaliação estereológica da microestrutura do fígado em animais desnutridos e submetidos à renutrição protéica.** [Stereological evaluation of microstructure in the liver of animals denutrition of followed by proteic renutrition]. 2011. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A fome e a má nutrição permanecem entre os problemas mais devastadores que enfrentam a maioria dos pobres e carentes do mundo. A desnutrição está relacionada com o desequilíbrio do estado nutricional e ocorre sob diversas formas, podendo afetar o fígado. A desnutrição no início da vida pode afetar profundamente o corpo e o cérebro de ratos adultos. Alguns desses efeitos são permanentes enquanto outros desaparecem quando os animais são submetidos ao processo de renutrição. Sendo assim, outra maneira de interferir na regeneração hepática fundamenta-se no fato de que os processos proliferativos do fígado podem ser modulados por fatores alimentares. Experimentos de desnutrição protéico-energética mostraram que o fígado de ratos desnutridos regenera-se mais lentamente após a hepatectomia. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da desnutrição e renutrição protéica na microestrutura dos fígados de camundongos. Foram utilizados 12 camundongos Swiss machos, subdivididos nos seguintes grupos: Controle do desnutrido (CD) (n=3), Desnutrido (D) (n=3), Renutrido (R) (n=3) e Controle do renutrido (CR) (n=3). Os animais dos dois grupos controle e do grupo renutrido receberam ração normoprotéica (12%) ao passo que o grupo desnutrido recebeu ração hipoprotéica contendo (2%). Os seguintes parâmetros estereológicos do fígado foram estimados: volume, número total e o volume menor ($p=0,001$) em relação ao CR ($R=8020\ \mu\text{m}^3$ e $CR=10018\ \mu\text{m}^3$). O número total de hepatócitos nos animais desnutridos não apresentou diferença significativa ($p=0,055$) em comparação ao seu CR ($D=1.1 \times 10^7$ e $CD=1.6 \times 10^7$) e o R não apresentou diferença significativa ($p=0,055$) em comparação ao seu CR ($R=2.8 \times 10^7$ e $CR=2.2 \times 10^7$). Portanto, a renutrição atenuou a atrofia do volume do hepatócito ocasionada pelo processo de desnutrição (carência de proteína).

Palavras-chave: Estereologia. Desnutrição. Renutrição. Camundongo. Fígado.

ABSTRACT

GOMES, S. P. **Stereological evaluation of microstructure in the liver of animals denutrition of followed by proteic renutrition.** [Avaliação estereológica da microestrutura do fígado em animais desnutridos e submetidos à renutrição protéica]. 2011. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The hunger and the malnutrition remain the most devastating problems faced by the majority of poor and needy people in the world. The malnutrition is related to an unbalanced nutritional condition and it occurs in different ways may affecting the liver. In the beginning of life, the malnutrition can affect profoundly the body and the brain in adult rats. Most of these effects are permanent while others disappear when the animal are submitted to a renutrition process. In this way, other manner to interfere in the hepatic regeneration is based on the fact that the liver proliferative processes might be modulating by food factors. The energetic protein malnutrition experiments have showed that the undernourished rat livers regenerate slower after hepatectomy. The aim of this study was to evaluate the effects of the caloric protein malnutrition and renutrition in the liver microstructure. In this study were used 12 Swiss male mice divided in: control of the undernourished mice (UC) (n=3), undernourished (U) (n=3), renourished (RN) (n=3) and control of the renourished (RNC) (n=3). The animals from both control groups and the undernourished group received normal protein food (12% protein) and the undernourished group received hypoprotein food (2% protein). The following stereological parameters were estimated: volume, total number and mean volume of the hepatocytes. The mean volume of U was significantly lower ($p=0.001$) than the UC ($U= 23.57 \text{ mm}^3$ e $UC= 46.5 \text{ mm}^3$) and RN was lower ($p=0.001$) than the RNC ($RN= 38.89 \text{ mm}^3$ e $RNC= 52.03 \text{ mm}^3$). The mean volume of hepatocytes in undernourished animals was lower ($p=0.001$) in comparison with the respective control ($U= 4505 \text{ } \mu\text{m}^3$ e $CD= 8170.13 \text{ } \mu\text{m}^3$) and the RN was lower ($p= 0.001$) in relation to the RNC ($RN= 8020 \text{ } \mu\text{m}^3$ e $RNC= 10018 \text{ } \mu\text{m}^3$). The total number of hepatocytes in undernourished animals did not presented significant difference ($p= 0.055$) in comparison with the respective control ($U = 1.1 \times 10^7$ e $UC= 1.6 \times 10^7$). So, the renutrition attenuated the hepatocyte volume atrophy caused by the malnutrition process (protein deficiency).

Keywords: Stereology. Malnutrition. Renutrition. Mice. Liver.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), a desnutrição infantil é um problema de dimensões alarmantes em boa parte do mundo. Associada à pobreza e à desigualdade, é um expressivo fator de mortalidade de crianças nos países em desenvolvimento, apesar dos esforços realizados nas últimas décadas para reduzir esse índice (UNICEF, 2006).

A desnutrição, segundo a Organização Mundial de Saúde, é um quadro de carência protéico-calórica, que abrange formas graves de doenças, como o marasmo (suprimento calórico insuficiente) e o Kwashiorkor (Privação protéica grave), além de fases e formas moderadas (WHO, 1992).

A desnutrição infantil continua a ser um dos problemas mais importantes da saúde pública do mundo atual, devido a sua magnitude e conseqüências desastrosas para o crescimento (MONTE, 2000). A OMS estima que mais de 20 milhões de crianças nasça com baixo peso a cada ano, cerca de 150 milhões de crianças com menos de 5 anos têm baixo peso para sua idade (ACC/SCN, 2000).

A desnutrição protéico-calórica é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, representando nas nações subdesenvolvidas cerca de 40% das causas dos pacientes hospitalizados. Considerando que o processo normal metabólico precisa de proteínas, acredita-se que todos os tecidos serão afetados por um estado precário de nutrição protéica embora não apresentem o mesmo grau e severidade de modificação (SANT'ANA et al., 1997).

Em países industrializados também são descritos casos de desnutrição, porém com maior acometimento de idosos (REDMOND et al., 1991b,c).

A desnutrição protéico-calórica acomete desde crianças provenientes de comunidades carentes, até pacientes idosos, potencializando processos infecciosos e aumentando o número de óbitos (CHANDRA, 1999).

A desnutrição protéico-energética é de longa data, considerada um problema social, sendo inclusive apontada como um marcador de pobreza (ISSLER et al., 1996), medida também através de habitações precárias, baixos salários, analfabetismo, desemprego ou empregos mal remunerados (AZEREDO et al., 1999).

A desnutrição no início da vida pode afetar profundamente o corpo e o cérebro de ratos adultos. Alguns desses efeitos são permanentes enquanto outros desaparecem quando os animais são submetidos ao processo de renutrição (YUCEL; WARREN; GUMUSBURUN, 1994).

É sabido que o tamanho do fígado é influenciado pelo estado nutricional. Sendo assim, outra maneira de interferir na regeneração hepática fundamenta-se no fato de que os processos proliferativos do fígado podem ser modulados por fatores alimentares. Experimentos de desnutrição protéico-energética mostraram que o fígado de ratos desnutridos regenera-se mais lentamente após a hepatectomia parcial (DOYLE; WILSON; HARTROFT, 1968).

Seu peso (órgão) em animais desnutridos chega a reduzir-se em 27%, por hipoplasia e atrofia do mesmo (PARRA et al., 1995).

O fígado é um órgão-alvo na terapia gênica por ser uma região de muitas alterações metabólicas. Ultimamente a transferência de genes estáveis aos hepatócitos pode compensar deficiências que afetam suas funções (MACHADO et al., 2002).

Analisando a literatura especializada verifica-se que embora os autores mencionados acima, realizando experimentos em animais submetidos à desnutrição, têm demonstrado algumas preocupações com a incidência desta condição durante o período de gestação e lactação, mencionando seus efeitos na glândula hepática. Constata-se uma carência principalmente de publicações enfocando os efeitos da desnutrição, principalmente no que tange aos seus aspectos morfoquantitativos.

Desta forma o estudo da estrutura hepática de camundongos, sob os aspectos quantitativos, estereológicos e morfométricos, durante estados de desnutrição e renutrição protéica será fundamental para aferir objetivamente (e não empiricamente) os possíveis danos ocasionados pela mesma no fígado.

Ainda, o conhecimento destas informações quantitativas pode ser útil no entendimento da patogênese hipoprotéica hepática e conseqüentemente no seu tratamento, melhorando a qualidade de vida de pacientes animais e humanos.

8 CONCLUSÕES

Com base nos métodos empregados e nos resultados obtidos, podemos concluir que os animais desnutridos apresentaram uma alteração no fígado com uma redução em seu volume (atrofia), bem como uma perda do número total de hepatócitos e uma atrofia dos mesmos. Nos renutridos houve atenuação da atrofia do volume do fígado e no tamanho dos hepatócitos. Esta reversão foi de 83,6%. Será que se esta renutrição perdurasse por mais um ou dois meses essa atenuação seria de 100% ?

REFERÊNCIAS

ACC/SCN. Nutrition throughout life. In:_____ **4th Report on the World Nutrition Situation**. Geneva: ACC/SCN./World Health Organization, 2000.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Histologia: vida e morte das células nos tecidos. In:_____. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 1277.

AWADALLA, H. N.; SHERIF, A. F.; SHAFEI, A. Z.; KHALIL, H. A.; GURGIS, F. K. Enzyme levels in homogenate of liver from mice infected with *Schistosoma mansoni* and from uninfected mice. **International Journal of Parasitology**, v. 5, p. 27-31, 1975.

AZEREDO, V. B.; CARMO, M. G. T.; BOAVENTURA, G. T.; DIAS, M. M.; LOBO, F. P. **Multimistura: uma alternativa alimentar**. Rio de Janeiro: Independente, 1999. p. 79.

BACHOU, H.; TUMWINE, J. K.; MWADIME, R. K. N.; TYLLESKÄR, T. Risk factors in hospital deaths in severely malnourished children in kampala, Uganda. **BMC Pediatrics**, v. 6, n. 7, p. 1-9, 2006..

BADDELEY, A. J.; GUNDERSEN, H. J. G.; CRUZ-ORIVE, L. M. Estimation of surface área from Vertical Sections. **Journal of Microscopy**, v. 142, p. 259–276, 1986.

BARON, R. B. Desnutrição protéico-calórica. In: BENNET, J. C.; PLUM, F, C. **Tratado de medicina interna**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan, 1997, p.1273-1277.

BARRETO, U. S. T. Alkaline phosphatase in schistosomiasis. **Annals of Internal Medicine**, v. 74, p. 450-451, 1971.

BEDI, K. S. Early-life undernutrition causes deficits in rat dentate gyrus granule cell number. **Experientia**, v. 4, p. 1073-1074, 1991.

BERK, P. D.; POTTER, B. J.; STREMMED, W. The sinusoidal surface on the hepatocyte: a dynamic plasma membrane specialized for high volume molecular transit. In: REUTTER, W.; POPPER, H.; AREAS, I. M.; HEINRICH, P. C.; KEPPLER, D.; LANDMANN, L. (Ed.). **Modulation of liver cell expression**. Lancaster: MTP Press Ltda, 1987. p.107-125.

BISMUTH, H. Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. In: BLUMGARD, L. H. (Ed). Surgery of the liver and biliary Tract. Edinburgh: **Churchill Livingstone**, 1988, p.1-9.

BORELLI, P.; MARIANO, M.; BOROJEVIC, R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and cell mobilization into inflammatory reactions in mice. **Nutrition Research**, v. 15, n. 10, p. 1477-1485, 1995.

BORELLI, P.; FOCK, R. A.; BLATT, S.; PEREIRA, J.; BEUTLER, B.; TSUJITA, M.; SOUZA, A. C.; XAVIER, J. G. Effect of protein deprivation on erythropoiesis. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 2, p. 307-314, 2007.

BRANDÃO M. C. S.; DE ANGELIS R. C.; DE SOUZA R. R.; LIBERTI E. A. Effects of pre-and postnatal protein deprivation on the myenteric plexus of the small intestine: a morphometric study in weaning rats. **Nutrition Research**, v. 23, p. 215-223, 2003.

CARTHEW, P.; EDWARDS, R. E.; NOLAN, B. M. New approaches to the quantitation of hypertrophy and hyperplasia in hepatomegaly. **Toxicology Letters**, v. 102/103, p. 411-415, 1998.

CASTELUCCI, P.; SOUZA, R. R.; ANGELIS, R. C.; FURNESS, J. B.; LIBERTI, E. A. Effects of pré-and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. **Cell and Tissue Research**, v. 310, n. 1, p. 1-7, 2002.

CHANDRA R. R. Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 58, p. 681-683, 1999.

CRUZ-ORIVE, L. M.; GEISER, M. Estimation of particle number by stereology: an update. **Journal of Aerosol Medicine**, v. 17, p. 197-212, 2004.

CRUZ-ORIVE, L. M. A general variance predictor for cavalieri slices. **Journal of Microscopy**, v. 222, p. 158-165, 2005.

CRUZ-ORIVE, L. M.; GARCÍA-FIÑANA, M. A review of the article: comments on the shortcomings of predicting the precision of cavalieri volume estimates based upon assumed measurement functions, by Edmund Glaser. **Journal of Microscopy**, v. 218, p. 6-8, 2005.

COUTINHO, E. M. Malnutrition and hepatic fibrosis in murine schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 85-92, 2004.

DEWAN, P.; FARIDI, M. M. A.; AGARWAL, K. N. Cytokine response to dietary rehabilitation with curd (Indian Dahi) & leaf protein concentrate in malnourished children. **Indian Journal of Medical Research**, v. 130, p. 31 – 36, 2009.

DIEHL, A. M.; RAI, R. Review: regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 5, p. 466-470, 1996.

DONOVAN, J.; BROWN P. **Current Protocol in Immunology**. New York: John Wiley & Sons, 1991, p. 141–144.

DOYLE, M.; WILSON, R. B.; HARTROFT, W. S. The effects of starvation on liver regeneration in rat after partial hepatectomy. **Experimental and molecular Pathology**, v. 9, p. 400-404, 1968.

DURAN, C.; AYDINLI, B.; TOKAT, Y.; YUZER, Y.; KANTARCI, M.; AKGUN, M.; PALAT, K. Y.; UNAL, B.; KILLI, R.; ATAMANALP, S. Stereological evaluation of liver volume in living donor liver transplantation using MDCT via the cavalieri method. **Liver Transplantation**, v.13, p. 693-698, 2007.

FLECKNELL, P. **Laboratory animal anaesthesia**. 2. ed. London: Academic Press, London, 1996. p. 15-73.

FOCK, R. A.; VINOLO, M. A.; ROCHA, V. M. S. ; SÁ ROCHA, L. C.; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-alpha in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. **Cytokine**, v. 40, n. 2, p. 105-114, 2007.

FOCK, R. A.; VINOLO, M. A. R.; CRISMA, A. R.; NAKAJIMA, K.; ROGERO, M. M.; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition modifies the production of interleukin-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) in a murine Model. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.54, p. 371-377, 2008.

GARCÍA-FINÁNA, M. **Muestro sistemático en R. aplicaciones a la estereología**. Tesis (Doctoral)-Universidad de Cantabria, 2000.

GARCÍA-FINÁNA, M.; CRUZ-ORIVE, L. M. New approximations for the efficiency of cavalieri sampling. **Journal of Microscopy**, v. 199, p. 224-238, 2000a.

GARCÍA-FINÁNA, M.; CRUZ-ORIVE, L. M.; MACKAY, C. E.; PAKKENBERG, B.; ROBERTS N. Comparison of MR imaging against physical sectioning to estimate the volume of human cerebral compartments. **NeuroImage**, v. 18, p. 505-516, 2002.

GARTNER, C. P.; HIAT, L. P. **Tratado de histologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2003. p. 456.

GERBER, M. A.; THUNG, S. N.; SHEN, S.; STROHMEYER, F. W.; ISHAK, K. G. Phenotypic characterization of hepatic proliferation. Antigenic expression by proliferation epithelial cells in fetal liver, massive hepatic necrosis and nodular transformations of the liver. **American Journal Pathologic**. v. 10, p. 70-74, 1983.

GOMES, O. A.; CASTELUCCI, P.; FONTES, R. B. V.; LIBERTI, E. A. Effects of preand postnatal protein and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat small intestine: a quantitative morphological study. **Clinical Autonomic Neuroscience**. v. 126, p. 277-284, 2006.

GOMES, S. P.; NYENGAARD, J. R.; MISAWA, R.; GIROTTI, P. A.; CASTELUCCI, P.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; MELO, M. P.; RIBEIRO, A. A. C. Atrophy and neuron loss: effects of a protein-deficient diet on sympathetic neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, p. 3568-3575, 2009.

GOSS, C. M. **Gray anatomia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 1017-1026.

GRAVES, M. J; DOMMETT, D. M. F. Comparison of cardiac stroke volume measurement determined using stereological analysis of breath-hold cine MRI and phase contrast velocity mapping. **The British Journal of Radiology**, v. 73, p. 825-832, 2000.

GRISHAM, J. W. Cell types in long-term propagable cultures of rat liver. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 349, p. 128-137, 1980.

GRISHAM, J. W. Cell types in rat liver cultures: their identification and isolation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 53-54, n. 1-2, p. 23-33, 1983.

GUNDERSEN, H. J. G.; JENSEN, E. B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **Journal of Microscopy**, v. 147, p. 229-263, 1987.

GUNDERSEN, H. J.; BAGGER, P.; BENDTSEN, T.; EVANS, S. M.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J. R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F. B.; VESTERBY, A.; WEST, M. J. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 96, n. 10, p. 858-881, 1988.

GUNDERSEN, H. J.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J. R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F. B.; VESTERBY, A. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 96, p. 379-394, 1988.

GUNDERSEN, H. J. G.; JENSEN, E. B. V.; KIEU, K.; JENSEN, J. The efficiency of systematic sampling in stereology - reconsidered. **Journal of Microscopy**, v. 193, p. 199-211, 1999.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 973.

HALICI, Z.; DURSUN, H.; KELES, O. N.; ODACI, E.; SULEYMAN, H.; AYDIN, N.; CADIRCI, E.; KALKAN, Y.; UNAL, B. Effect of chronic treatment of haloperidol on the rat liver: a stereological and histopathological study. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 379, p. 253-261, 2009.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. Number quantification. Unbiased stereology. three-dimensional measurement in microscopy. Oxford: **Bios Scientific Publishers**. p. 69-106, 1998.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased Stereology. Three-Dimensional Measurement in Microscopy**, 2. ed. Bios Scientific Publishers, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3 ed. São Paulo: INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985, p. 533.

IDOHO-DOSSOU, N.; WADE, S.; GUIRO, A. T.; SARR, C. S.; DIAHAM, B.; Cissé, D. Nutritional status of preschool senegalese children: long-term effects of early severe malnutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 90, p. 1123-1132, 2003.

ISSLER, R. M. S.; GIUGLIANI, E. R. J.; KREUTZ, G. T.; MENESES, C. F.; JUSTO, E. B.; KREUTZ, V. M. Poverty levels and children's health status: study of risk factors in an urban population of low socioeconomic level. **Revista Saúde Pública**, v. 30, n. 6, p. 506-511, 1996.

JACK, E. M.; STAUBLI, W.; WAECHTER, F.; BENTLET, P.; SUTER, J.; BIERI, F. Ultrastructural changes in chemically induced preneoplastic focal lesions in the rat liver: a stereological study. **Carcinogenesis**, v. 11, p. 1531-1538, 1990.

JAESCHKE, H.; GORES, G. J.; CDDERBAUM, A. I.; HERNSON, J. A.; PESSAYRE, D.; LEMASTERS, J. J. Mechanisms of hepatotoxicity. **Toxicological Sciences**, v. 65, p. 166-176, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 273-282.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 488.

KARBALY-DOUST, S.; NOORAFASHAN, A. Stereological study of the effects of nandrolone decanoate on the mouse liver. **Micron**, v. 40, p. 471-475, 2009.

LIMA, A. A. A. L.; RAMALHO, L. N. Z.; ZUCOLOTO, S.; BAGNATO, V. .; SILVA, JÚNIOR. O. C. Estudo da fosfatase alcalina em ratos cirróticos hepatectomizados após aplicação de laser. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 16, p. 16-17, 2001.

MACHADO, A. L. S.; ROCHA, R. F.; SANTOS, R. C. S. Hepatectomia parcial: estudo da resposta proliferativa. **Revista Biociência de Taubaté**, v. 8, n. 2, p. 27-35, 2002.

MARCOS, R.; MONTEIRO, A. F.; ROCHA, E. Estimation of the number of stellate cells in a liver with the smooth fractionator. **Journal of Microscopy**, v. 215, p. 174-182, 2004.

MARCOS, R.; MONTEIRO, R. A. F.; ROCHA, E. Design-based stereological estimation of hepatocyte number, by combining the smooth optical fractionator and immunocytochemistry with anti-carcinoembryonic antigen polyclonal antibodies. **Liver Internacional**, v. 26, p. 116-124, 2006.

MARCOS, R.; MONTEIRO, R. A. F.; ROCHA, E. Determination of hepatocellularity number in the rat. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1692-1693, 2007.

MAYHEW, T. M.; OLSEN, D. R. Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the cavalieri principle. **Journal of**

Anatomy, v. 178, p. 133-144, 1991.

MICHALOPOULUS, G. K.; DEFRANCES, M. C. Liver Regeneration. **Science**, v. 276, p. 60-66, 1997.

MONTE, C. M. G. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. **Jornal de Pediatria**, v. 76, n. 3, p. 285-297, 2000.

NUNES, M. L.; BATISTA, B. B.; MICHELI, F.; BATISTELLA, V. Effects of early malnutrition and nutritional rehabilitation in rats. **Journal of Pediatrics**, v. 78, n. 1, p. 39-44, 2002.

ODACI, E.; BILEN, H.; HACIMUFTUOGLU, A.; KELES, O. N.; CAN, I.; BILICI, M. Long-term treatments wit- and high-dose olanzapine change hepatocyte numbers in rats. A stereological and histopathological study. **Archives of Medical Research**, v. 40, p. 139-145, 2009.

ONYENEKE, E.C.; NJOYA, H. K.; EBOT, M. N.; UCHUNGO, G. A.; ERIYAMREMU, G. E.; ALUMANAH, E. O. Liver function status in some nigerian children with protein energy malnutrition. **Orient Journal of Medicine**, v. 15, p. 58-63, 2003.

PAKKENBERG, B.; GUNDERSEN, H. J. G. Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by the disector and fractionator. **Journal of Microscopy**, v. 150, p.1-20, 1988.

PAKKENBERG, B.; GUNDERSEN, H. J. G. The total number of neurons and glia cells in human brain nuclei estimated by disector and the fractionator. **Journal of Microscopy**, v. 215, p. 279-285, 1996.

PARRA, O. M.; SILVA, R. A. P. S.; SILVA, J. R. M. C.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; PEDUTO, L.; SAAD, W. A.; SAAD JUNIOR, W. A. Reduction of liver mass due to malnutrition in rats. Correlation with emaciation of animals and size of organs not insert in the portal system, **Revista Paulista de Medicina**, v. 113, n. 3, p. 903-909, 1995.

POPPER, H. Viral versus chemical hepatocarcinogenesis. **Journal of Hepatology**, v. 6, p. 229-238, 1988.

RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; ZUCOLOTO, S.; SILVA JR., O. C. Regeneração hepática. Algumas definições num universo de incertezas. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 8, n. 4, p.177-189, 1993.

REDMOND, H. P. Immuno suppressive mechanisms in protein-calorie malnutrition. **Surgery**, v. 110, n. 2, p. 311-317, 1991c.

REDMOND, H. P. Protein-calorie malnutrition impairs host defense against candida albicans. **Journal of Surgery Research**, v. 50, n. 6, p. 552-559, 1991b.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee

on the Reformulation of the AIN-T6A Rodent Diet. **American Institute of Nutrition**, n. 121, p. 1939-1951, 1993.

RIBEIRO, A.A.; DAVIS, C.; GABELLA, G. Estimate of size and total number of neurons in superior cervical ganglion of rat, capybara and horse. **Anatomy and Embryology (Berl)**, v. 208, n. 5, p. 367-380, 2004.

ROGERO, M. M.; BORELLI, P.; VINOLO, M. A. R.; FOCK, R. A.; PIRES, I. S. O.; TIRAPÉGUI, J. Dietary glutamine supplementation affects macrophage function, hematopoiesis and nutritional status in early weaned mice. **Clinical Nutrition**, v. 27, p. 386-397, 2008.

ROUILLER, C. **The liver**. London: Academic Press Inc., 1964. v. 2, p. 674.

SANT'ANA, D. M. G.; NETO, M. H.; SOUZA, R. E.; MOLINARI, S. L. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon of rats subjected to proteic desnutrition. **Neuropsiquiatr**, v. 4, n. 55, p. 687-695, 1997.

SANTOS, R. M. S. **Avaliação do estado nutricional relativo à vitamina A e ferro em crianças HIV positivas ou com AIDS**. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, 2009.

SCHMITZ, C.; HOF, P. R. Recommendations for straightforward and rigorous methods of counting neurons based on a computer simulation approach. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 20, p. 93–114, 2000.

TANDRUP, T. Unbiased estimates of number and size of rat dorsal root ganglion cells in studies of structure and cell survival. **Journal of Neurocytology**, v. 33, n. 5, p. 173-192, 2004.

UNICEF – Desnutrição: situação da infância brasileira 2006. Disponível em: <<http://www.unicef.org/brazil/Pags_040_051_Desnutricao.pdf>>, acesso em: maio, 2010.

USP - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Parâmetros biológicos dos animais de experimentação no biotério da FMUSP, 2004. São Paulo. Disponível em: <<http://www.tcirurgica.fm.usp.br/bioterio/asnell/bioquimica.doc>>. Acesso em: 27/12/2010.

VAN VRÉ, E. A.; VAN BEUSEKOM; H. M.; VRINTS, C. J.; BOSMANS, J. M.; BULT, H.; VAN DER GIESSEN, W. J. Stereology: a simplified and more time-efficient method than planimetry for the quantitative analysis of vascular structures in different models of intimal thickening. **Cardiovascular Pathology**, v.16, p. 43-50, 2007.

VÁZQUEZ-GARIBAY, E.; CAMPOLLO-RIVAS, O.; ROMERO-VELARDE, E.; MÉNDEZ-ESTRADA, C.; GARCIA-IGLESIAS, T.; ALVIZO-MORA, J. G.; VIZMANOS-LAMOTTE, B. Effect of renutrition on natural and cell-mediated immune response in infants with severe malnutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 34, n. 3, p. 296-301, 2002.

VEDEL-JENSEN, E. B.; GUNDERSEN, H. J. G. The Rotator. **Journal of Microscopy**, v. 170, p. 35-44, 1993.

VINOLO, M. A. R.; CRISMA, A. R.; NAKAJIMA, K.; ROGERO, M. M.; FOCK, R. A.; BORELLI, P. Malnourished mice display an impaired hematologic response to granulocyte colony-stimulating factor administration. **Nutrition Research**, v. 28, p. 791-797, 2008.

VITURI, C. L.; BORELLI, P.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. Z. Alterations of the bone marrow in extracellular matrix in undernourished Mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 889-895, 2000.

WALRAND, S.; CHAMBON-SAVANOVITCH, C.; FELGINES, C.; JACQUES, C.; RAUL, F.; NORMAND, B.; FARGES, M. C.; BEAUFRÈRE, B.; VASSON, M. P.; CYNOBER, L. Aging: a barrier to renutrition? nutritional and immunologic evidence in rats. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, p. 816-824, 2000.

WALRAND, S.; MOREAU, K.; CALDEFIE, F.; TRIDON, A.; CHASSAGNE, J.; PORTEFAIX, G.; CYNOBER, L.; BEAUFRÈRE, B.; VASSON, M. P.; BOIRIE, Y. Specific and nonspecific immune responses to fasting and refeeding differ in healthy young adult and elderly persons. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 670-678, 2000.

WEIBEL, E. R.; STÄUBLI, W.; GNÄGI, H. R.; HESS, F. A. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. **Journal Cell Biology**, v. 42, p. 63-91, 1969.

WEST, M. J. S.; GUNDERSEN, H. J. G. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. **Anatomical Record**, v. 231, p. 482-497, 1991.

WHO. **Expert Committee on Nutrition**. 6th report. 1992. (Who Technical Report Series, 45).

YUCEL, F.; WARREN, A.; GUMUSBURUN, E. The effects of undernutrition on connectivity in the cerebellar cortex of adult rats. **Journal of Anatomy**, v. 184, p. 59-64, 1994.

ZANIN, S. T.; MOLINARI, S. L.; SANT'ANA, D. M.; DE MIRANDA NETO, M. H. NADH-Diaphorase positive neurons of the jejunum of disnurtured adult rats (*Rattus Norvegicus*): quantitative aspects. *Neuropsiquiatr*, v. 61, n. 3, p. 650 -653, 2003. GARTNER, C. P.; HIAT, L.P. **Tratado de Histologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara koogan, p. 456, 2003.