UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Efeitos da desnutrição proteica na linfoproliferação e na produção *in vitro* de IFN-γ e IL-10 em células do baço. Quantificação de STAT-1 e STAT-3

Alexandra Siqueira Mello

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Efeitos da desnutrição proteica na linfoproliferação e na produção *in vitro* de IFN-γe IL-10 em células do baço. Quantificação de STAT-1 e STAT-3

Alexandra Siqueira Mello

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo
2013

ALEXANDRA SIQUEIRA MELLO

Efeito da desnutrição proteica na linfoproliferação e na produção *in vitro* de IFN-γ e IL-10 em células do baço. Quantificação de STAT1 e STAT3.

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

Orientador/Presidente

_____

1° Examinador

_____

2° Examinador

São Paulo, _____de 2013.

Aos meus pais, Mello e Lídia: pelo seu amor incondicional e pelos princípios inabaláveis que regem minha vida.

Ao meu marido, Hildevan: por seu amor e pela paciência de ter me dividido com uma tese por dois anos.

As minhas filhas, Letícia e Lorena, e meus sobrinhos, Abner e César: que lutam diariamente ao meu lado, transmitindo fé, amor, alegria, determinação, paciência e coragem, tornando os meus dias mais felizes e bonitos.

Sem vocês eu não seria nada!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo A. Fock, um agradecimento carinhoso por todos os momentos de paciência, compreensão, competência e também pelos momentos de descontração.

AGRADECIMENTOS

Ao ser Supremo, pela vida e a possibilidade de empreender esse caminho evolutivo, por propiciar tantas oportunidades de estudos e por colocar em meu caminho pessoas amigas e preciosas.

À Profa. Primavera Borelli, por sua amizade, pelos conselhos e pelos incentivos, mas, principalmente, por seus questionamentos incessantes, que me fizeram buscar respostas a perguntas que eu nem imaginava que existissem!

Aos amigos do laboratório de Hematologia Clínica, Graziela, Amanda, Karina, Maristela, Luciana, Mayara, Fabiana, Dalila, Jackeline e Ed Wilson, que compartilharam comigo esses momentos de aprendizado.

Às estagiárias de iniciação científica, Mayara Cortez, Carol e Ana Lígia, todo o meu carinho e amizade.

A minha amiga Tathiana Capeto, que, mesmo seguindo caminhos diversos, sempre se fez presente com palavras de encorajamento e amor. Rimos, choramos e nos ajudamos mutuamente.

À técnica Mariana Cristina Ferreira Silva, pela amizade desde o início e por estar sempre presente, ajudando nas horas mais difíceis.

Ao Prof. Anderson Nunes de Sá, muita competência e inteligência. Obrigada por sempre disponibilizar seu laboratório. Suas contribuições foram muito importantes para enriquecer esse trabalho.

A minha amiga Bruna, do laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas: obrigada pela sua disposição em sempre me ajudar. Obrigada pelas reuniões de discussão, pelos auxílios em bancadas e nos experimentos.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, e a todo o pessoal da secretaria da pós-graduação, pelo trabalho realizado.

A todos aqueles não citados aqui, mas que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho: muito obrigada.

“É preciso força para sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”.
(Los Hermanos)

SUMÁRIO

		Página
1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Desnutrição	15
1.2	Desnutrição e sistema imunológico	18
1.3	STAT (signal transducers and activators of transcription)	21
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo geral	26
2.2	Objetivos específicos	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Animais	27
3.2	Rações	27
3.3	Indução à desnutrição	28
3.4	Avaliação do estado nutricional dos animais	29
3.5	Obtenção de sangue total e soro	29
3.6	Determinação de proteínas totais, albumina, pré-albumina e hemograma	30
3.7	Dosagem de IgG e IgM	30
3.8	Obtenção de células da medula óssea e realização do mielograma	31
3.9	Obtenção de células do baço	31
3.10	Obtenção de células do timo	32
3.11	Esplenograma	32
3.12	Fenotipagem celular por citometria de fluxo	33
3.13	Avaliação do perfil proliferativo das células esplênicas utilizando iodeto de propídeo e RNAse, por citometria de fluxo	34
3.14	Avaliação histopatológica do baço	34
3.15	Cultura de células totais do baço	35
3.16	Avaliação da síntese de citocinas	35
3.17	Proliferação de linfócitos	36
3.18	Determinação da expressão de STAT-1 e STAT-3	37
3.19	SDS-PAGE e *Western Blotting*	38
3.19.1	Preparo do gel de poliacrilamida	38
3.19.2	Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE e *Western Blotting*	38
3.19.3	Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose)	39
3.19.4	Sondagens das proteínas com anticorpos	39
3.19.5	Revelação com sistema quimioluminescente	40
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5	RESULTADOS	41
5.1	Consumo de proteína, variação do peso e da ração	41
5.2	Análise das concentrações séricas de proteínas totais e albumina	41
5.3	Avaliação das concentrações séricas de imunoglobulinas	42
5.4	Avaliação hematológica	43
5.4.1	Eritrograma	43
5.4.2	Leucograma	43
5.5	Avaliação morfológica da medula óssea	44
5.6	Esplenograma	46
5.7	Análise histológica do baço	48

5.8 Ensaio de proliferação de linfócitos 49
5.9 Ciclo celular 50
5.10 Caracterização imunofenotípica de células do baço 51
5.11 Caracterização imunofenotípica de células do timo 54
5.12 Avaliação da síntese *in vitro* de citocinas por células esplênicas 56
5.13 Avaliação da expressão das STAT-1 e STAT-3 58
6 DISCUSSÃO 61
7 CONCLUSÃO 73
REFERÊNCIAS 74
ANEXO A: Certificado de aprovação da Comissão de Ética 86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIN: Instituto Americano de Nutrição
APC: Aloficocianina
BCL: B cell receptors
CD: Cluster of differentiation
CONA: Concanavalina A
DPE: Desnutrição Proteico-Energética
DP: Desnutrição Proteica
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbet Assay
FAO: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FITC: Isotiocianato de flurescéína
GM-CSF: Fator estimulador de colônia grânulo-monocítica
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG: Imunoglobulina G
IgM: Imunoglobulina M
IL-1: Interleucina 1
IL-4: Interleucina 4
IL-5: Interleucina 5
IL-6: Interleucina 6
IL-10: Interleucina 10
IL-12: Interleucina 12
IL-13: Interleucina 13
INF-γ: Interferon gama
JAK: Janus kinase
LPS: Lipopolissacarídeo
MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade
MMP: Matrix metaloproteinases
MTT: brometo de metiltiazolildifenil-tetrazlium
NK: Linfócitos Natural Killer
NKT: Células T Natural Killer
NaCl: Cloreto de sódio
PE: Ficoeritrina
PI: Iodeto de propídeo
PBS: Phosphate buffered saline
PMSF: Phenylmethanesulfonyl fluoride
POF: Pesquisa de Orçamento Familiar
RNA: Ácido ribonucleico
STAT: signal transducers and activator of transcription
SDS: Sodium dodecyl sulfate
TCR: T-cell receptors
TBS: Tris buffered saline
TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa
TNF-β: Fator de necrose tumoral beta
WHO: World Health Organization

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Página

Tabela 1 - Composição percentual da ração 28

Tabela 2 - Ciclo celular de células esplênicas dos animais dos grupos controle e desnutrido estimuladas ou não com ConA 50

Figura 1. Foto representativa do baço de animal do grupo controle e do grupo desnutrido, evidenciando atrofia no baço dos animais do grupo desnutrido. 46

Figura 2. A: Corte histológico de baço de animal do grupo controle, apresentando imagem panorâmica do tecido (4X). **B:** Corte histológico de baço de animal do grupo controle, evidenciando cápsula delimitando parênquima tecidual (40X). **C:** Corte histológico de baço de animal do grupo desnutrido, apresentando imagem panorâmica do tecido (4X). **D:** Corte histológico de baço de animal do grupo desnutrido, mostrando espessamento capsular e rarefação linfocitária (40X). 48

Figura 3. Análise da dispersão dos eventos celulares adquiridos por citometria de fluxo: todas as células adquiridas de animais (controle e desnutrido) foram analisada em uma única janela eletrônica. Citograma bidimensional em "dot plot" formado por FSC na abscissa e SSC na ordenada. O tamanho celular é representado pelo canal de dispersão a 0° (FSC) e a complexidade interna é representada pelo canal de dispersão a 90° (SSC). 51

Figura 4. Estratégia de definição da janela de identificação para mensuração da quantificação de linfócitos T CD3/CD4/CD8, CD19 e NK/NKT de células do baço. Inicialmente, foi feita uma janela de aquisição na região de leucócitos marcada com anti-$CD45^+$. Na sequência, foi feita outra janela de aquisição na região denominada $CD3^+$ e $CD19^+$ e, por fim, foi delimitada uma janela de aquisição de quadrantes para identificar as subpopulações de linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^-$, $CD8^-$, $CD4^+CD8^+$ e $CD4^-CD8^-$, respectivamente. Após, foi feita outra janela de aquisição na região denominada $CD3^+$ e CD49b e, finalmente, foi delimitada uma janela de aquisição de quadrantes para identificar as subpopulações de linfócitos NK e NKT. 52

Figura 5. Estratégia de definição da janela de identificação para mensuração da quantificação de linfócitos T CD3/CD4/CD8 do células Timo. Inicialmente, foi feita uma janela de aquisição na região denominada $CD3^+$ e, por fim, foi delimitada uma janela de aquisição de quadrantes para identificar as subpopulações de linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+CD8^+$ e $CD4^-CD8^-$, respectivamente. 55

LISTA DE GRÁFICOS

Página

Gráfico 1. Resultado, em valores médios ± o desvio padrão, do consumo de ração e de proteínas dos animais dos grupos controle (n=20) e desnutrido (n=20). Os animais dos grupos **controle** e **desnutrido** receberam, respectivamente, a ração I e a ração II. * Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados. 41

Gráfico 2. Resultado, em valores médios ± o desvio padrão, de proteínas totais, albumina e pré-albumina dos animais dos grupos controle e desnutrido. Os animais dos grupos **controle** (n=11) e **desnutrido** (n=11) receberam, respectivamente, a ração I e a ração II. * Valores significativos para p≤ 0,05. ** Valores significativos para p≤ 0,01. **n** representa o número de animais avaliados. 42

Gráfico 3. Resultado, em valores médios ± o desvio padrão, das concentrações de imunoglobulinas IgG e IgM dos animais dos grupos controle e desnutrido. Os animais dos grupos **controle** (n= 5) e **desnutrido** (n= 5). * Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados. 42

Gráfico 4. Resultado, em valores médios ± o desvio padrão, da concentração de hemoglobina, do número de hemácias e do volume do hematócrito de camundongos Balb/C dos grupos **controle** (n =10) e **desnutrido** (n =10). **n** representa número de animais avaliados. * Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados. 43

Gráfico 5. Resultados em valores médios ± o desvio padrão do número de leucócitos, do numero de bastonetes, segmentados, linfócitos, monócitos e eosinófilos presentes no sangue dos animais dos grupos controle (n=10) e desnutrido (n=10).).* Valores significativos para p≤ 0,05. ** Valores significativos para p≤ 0,01. *** Valores significativos para p≤ 0,001. **n** representa o número de animais avaliados. 44

G**ráfico 6.** Resultado, em valores médios ± o desvio padrão, do mielograma do número total de células nucleadas e dos diferentes tipos celulares presentes na medula óssea de camundongos dos grupos **controle** (n =6) e **desnutrido** (n =6).* Valores significativos para p≤ 0,05. ** Valores significativos para p≤ 0,01. **n** representa o número de animais avaliados. 45

Gráfico 7. Resultado, em valores médios ± o desvio padrão, do número de células nucleadas do baço de camundongos dos grupos **controle** (n=8**)** e **desnutrido** (n=8).** Valores significativos para p<0,01. **n** representa número de animais analisados. 46

Gráfico 8. Resultado, em valores médios ± o desvio padrão, do esplenograma dos grupos **controle** (n =6) e **desnutrido** (n =6). * Valores significativos para p≤ 0,05. ** Valores significativos para p≤ 0,01. **n** representa o número de animais avaliados. 47

Gráfico 9. Resultados, em valores médios ± o desvio padrão, do número total de células mononucleares viáveis do baço, avaliadas após 72 horas de cultivo, após estimuladas com LPS ou ConA. Animais dos **grupos controle** (n=6 animais) e **desnutrido** (n=6 animais). **n** representa o número de animais avaliados. 49

Gráfico 10. Resultados, em valores médios ± o desvio padrão, do número total de células mononucleares viáveis do baço avaliadas após 72 horas de cultivo. Os animais dos grupos **controle** (n=6) e **desnutrido** (n=6).* Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados. 50

Gráfico 11. Resultado, em valores médios ± o desvio padrão, das subpopulações de linfócitos CD45/CD3/CD4/CD8/CD19 e NK/NKT do baço de animais dos grupos **controle** (n=6) e **desnutrido** (n=6). * Valores significativos para p≤ 0,05. ** Valores significativos para p≤ 0,01. **n** representa o número de animais avaliados. 54

Gráfico 12. Resultado, em valores médios ± desvio padrão, das subpopulações de linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+CD8^+$ e $CD4^-CD8^-$ do baço de animais dos grupos **controle** (n=6) e **desnutrido** (n=6). O **n** representa o número de animais avaliados. 55

Gráfico 13. Resultado, em valores médios ± desvio padrão, da concentração de IFN-y produzidas por células esplênicas dos grupos **controle** (n=8) e **desnutrido** (n=8) * Valores significativos para p<0,05. **n** representa número de animais analisados. 56

Gráficos 14. Resultado, em valores médios ± desvio padrão, da concentração de IL-10 produzidas por células esplênicas dos grupos **controle** (n=8) e **desnutrido** (n=8) * Valores significativos para p<0,05. **n** representa número de animais analisados. 57

Gráfico 15. Resultado, em valores médios ± desvio padrão, da concentração de IL-2 produzidas por células esplênicas dos grupos **controle** (n=8) e **desnutrido** (n=8) * Valores significativos para p<0,05. **n** representa número de animais analisados. 57

Gráfico 16. Resultado, em valores médio ± desvio padrão, da quantificação STAT-1 em células esplênicas de camundongos dos grupos **controle** (n=6) e **desnutrido** (n= 6) estimuladas, *in vitro*, durante 24 horas com 1,25 µg de LPS e 5µg/mL de ConA. **n** representa número de animais analisados. 58

Gráfico 17. Resultado, em valores médios ± desvio padrão, da quantificação STAT-1 P em células esplênicas de camundongos dos grupos **controle** (n= 6) e **desnutrido** (n= 6) estimuladas, *in vitro*, durante 24 horas com 1,25 µg de LPS e 5µg/mL de ConA. * Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados. 59

Gráfico 18. Resultado, em valores médios ± desvio padrão, da quantificação STAT-3 em células esplênicas de camundongos dos grupos **controle** (n= 6) e **desnutrido** (n= 6) estimuladas, *in vitro*, durante 24 horas com 1,25 µg de LPS e 5µg/mL de ConA. * Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados. 59

Gráfico 19. Resultado, em valores médio ± desvio padrão, da quantificação STAT-3 P em células esplênicas de camundongos dos grupos **controle** (n= 6) e **desnutrido** (n= 6) estimuladas, *in vitro*, durante 24 horas com 1,25 µg de LPS e 5µg/mL de ConA. * Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados. 60

RESUMO

MELLO, A. S. **Efeitos da desnutrição proteica na linfoproliferação e na produção *in vitro* de IFN-γ e IL-10 em células do baço. Quantificação de STAT-1 e STAT-3.** Dissertação [Mestrado] – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.86p.

A desnutrição modifica a resistência à infecção, alterando grande variedade de processos fisiológicos, incluindo a hematopoiese e a resposta imune. Os mecanismos exatos que comprometem o sistema imunológico em condições de desnutrição ainda não estão totalmente compreendidos, sendo que a desnutrição modifica a funcionalidade das células efetoras na resposta inflamatória/infecciosa, causando redução da síntese de citocinas pró-inflamatórias, além de alterações na hematopoiese. Os linfócitos têm papel-chave tanto na resposta imune inata quanto adaptativa. Nesse contexto, propusemo-nos a avaliar alguns aspectos da resposta linfoide esplênica em um modelo de desnutrição proteica. Camundongos BALB/c, machos, submetidos à desnutrição proteica, após perda de aproximadamene 20% do peso corpóreo, foram eutanasiados. Hemograma, mielograma, esplenograma e análise das concentrações séricas de proteína totais, albumina, pré-albumina e dosagem de imunoglobulinas G e M foram realizados. As células do timo e do baço foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo – e foi realizado o ciclo celular. Para avaliação da linfoproliferação, as células esplênicas foram cultivadas, *in vitro*, e estimuladas com LPS ou ConA durante 72 horas. Foram quantificadas a capacidade de produção de INF-γ, IL-2 e IL-10 e a expressão de STAT-1 e STAT-3. Os animais desnutridos apresentaram anemia, leucopenia e severa redução na celulariedade da medula óssea, com comprometimento no setor mieloide e diminuição da celulariedade do baço, com redução da população de linfócitos. Os animais desnutridos apresentaram alterações no desenvolvimento celular linfoide, alteração na capacidade de proliferação, menor produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, e, ao mesmo tempo, aumento da produção de IL-10. Os animais também apresentaram maior porcentagem de células $CD3^+$ e $CD4^+$ no baço em relação aos animais controle. Quando as células esplênicas foram estimuladas, apresentaram maior expressão de STAT-3 e menor expressão de STAT-1. Baseando-se nestes resultados, discutimos se deficiências nutricionais alteram a imunocompetência e aumentam o risco de infecções.

Palavras-chave: Desnutrição, Linfócitos, Citocinas, STAT.

ABSTRACT

MELLO, A. S. **Protein malnutrition effects on lymphocyte proliferation and in vitro production of IFN-γ and IL-10 in spleen cells. Quantification of STAT-1 and STAT-3.** Dissertation [Master Degree] – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.86p.

Malnutrition modifies the resistance against infection by changing a variety of physiological processes, including the hematopoiesis and the immune response. The exact mechanisms that compromise the immune system in conditions of malnutrition is not yet thoroughly understood, since malnutrition modifies the functionality of the effector cells in inflammatory / infectious response, causing the reduction of the synthesis of proinflammatory cytokines, besides causing alterations in hematopoiesis. The lymphocytes have a key role in both innate and adaptive immune responses, in this context, we proposed to evaluate some aspects of lymphoid spleen cells response in a model of protein malnutrition. Male mice BALB / c submitted to protein malnutrition after approximately 20% loss of body weight were euthanized. The complete blood count, bone marrow examination, spleen cells count and analysis of serum total protein, albumin, pre-albumin and immunoglobulin G and M were performed. The thymus and spleen cells were collected and analyzed by flow cytometry as well as the cell cycle performed. For evaluation of the lymphocyte proliferation the spleen cells were cultivated in vitro and stimulated with LPS or ConA for 72 hours and the ability to produce IFN-γ, IL-2 and IL-10 as well as the expression of STAT-1 and STAT -3, were quantified. The malnourished animals presented anemia, leukopenia and severe reduction in celulariedade bone marrow with myeloid commitment in the sector and decreased celulariedade spleen, with reduced lymphocyte population. The malnourished animals showed changes in lymphoid cell development, abnormal proliferation capacity, reduced production of proinflammatory cytokines such as IL-2, and at the same time, increased production of IL-10. The animals also had higher percentages of CD3 + and CD4 + spleen compared to control animals. When spleen cells were stimulated, showed higher expression of STAT-3 and lower expression of STAT-1. Based on these results, we discussed whether nutritional deficiencies alter immunocompetence and increase the risk of infections.

Keywords: Malnutrition, Lymphocytes, Cytokine, STAT.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Desnutrição

A desnutrição é definida pela Organização Mundial da Saúde como “condição patológica que provém da menor ingestão, em várias proporções, de proteínas e calorias” (ONIS et al., 1993). É um termo geral que significa a falta de alguns ou de todos os nutrientes necessários para a saúde humana.

Há dois tipos básicos de desnutrição: a primeira e mais importante é a desnutrição proteico e proteico-energética, na qual há falta de quantidade suficiente de proteína e de alimentos que forneça energia. Este é o tipo de desnutrição que é referido quando a fome no mundo é discutida (BARON, 1997; MONTEIRO, 2003; WHO, 2011). O segundo tipo de desnutrição, também muito importante, é a deficiência de micronutrientes, como vitaminas e minerais. Recentemente, há discussões para incluir a obesidade como o terceiro tipo de desnutrição; neste caso, não relacionado à falta de alimentos, mas sim com a má nutrição, ou seja, as pobres escolhas alimentares (BARON, 1997; MONTEIRO, 1995; WHO, 2011).

A desnutrição, em geral, é uma condição causada por uma dieta desbalanceada ou por deficiência de nutrientes. O mais comum na desnutrição é a insuficiência de calorias na alimentação ou a ingestão deficiente de proteínas, vitaminas e micronutrientes, como zinco, vitamina A, vitamina B e ferro (BENDICH & CHANDRA, 1990; KRENITSKY, 1996).

Dentre as causas da desnutrição, se encontram dieta inadequada, deficiência de absorção, ingestão insuficiente, aumento da utilização dos nutrientes e excreção excessiva. Desta forma, é possível ocorrer mais de uma causa de desnutrição no mesmo indivíduo simultaneamente (SAUDERS; SMITH, 2010).

Com base na severidade e nas características que apresenta, a desnutrição proteica é definida como *marasmus*, uma condição de perda crônica, ou como *kwashiorkor*, que é distinguido pelo edema e pelo quadro anêmico que se desenvolve. *Marasmus* ocorre quando há insuficiência de alimento, enquanto o *kwashiorkor* se desenvolve pela deficiência de proteína na dieta alimentar (CUNNINGHAN-RUNDLES et al., 2005). *Kwashiorkor* e *marasmus* são dois extremos da desnutrição, porém muitos estados intermediários são reconhecidos, sendo que em todos eles é frequente a presença de infecções (CHANDRA 1989; DE ANGELIS, 1986; SHETTY, 2006).

Estas síndromes podem cursar com retardo no crescimento (MONTEIRO, 2003) e alterações morfológicas e funcionais nos sistemas cardiovascular, renal, respiratório, digestório (WAITZBERG, 2006) e também nos sistemas endócrino e imunológico (AUGUSTO, 1995; ROBBINS et al., 2003). Também pode diminuir habilidades mentais e provocar efeitos psicossociais, como depressão e ansiedade (WHO, 2000; SAUNDERS; SMITH 2010).

Enquanto nos países em desenvolvimento a principal causa de desnutrição é primária e acomete principalmente lactante e crianças, nos países industrializados a desnutrição, geralmente, é secundária, acometendo principalmente indivíduos

hospitalizados por períodos prolongados, aqueles que necessitam de dieta enteral/parenteral, portadores de doenças crônicas e inflamatórias, que sofrem de neoplasias e aqueles que realizam quimioterapia (BARON, 1997; SHETTY, 2006; SAKA et al., 2011).

Dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO) demonstram que, em 2012, havia cerca de 868 milhões de pessoas desnutridas mundialmente, sendo que a maior parte da população desnutrida vive em países em desenvolvimento. Dois terços vivem em apenas sete países (Bangladesh, Congo, Etiópia, Indonésia e Paquistão) e mais 40% vivem na China e na Índia. A proporção de pessoas desnutridas continua maior na África subsaariana, com 30% em 2012. A desnutrição por carência de energia (calorias) e proteínas é responsável por 55% das mortes de crianças no mundo inteiro, estando associada a várias outras doenças e ainda considerada como uma das causas que mais mata crianças abaixo de cinco anos (SAWAYA, 2006).

No Brasil, dados publicados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE) mostraram queda nos índices de desnutrição. Nas regiões Norte e Nordeste, os índices são entre 8,5% e 5,9%. Nas regiões Sudeste e Sul, o percentual de crianças desnutridas encontra-se entre 6,1% e 3,9%, a região Centro-oeste apresentou índice de 6,1% (POF, 2008-2009). Segundo Monteiro et al. (2009), esse declínio esta relacionado com a redução da pobreza, com a melhoria da distribuição de renda, consequência da reativação do crescimento econômico e diminuição do desemprego, reajustes do salário-mínimo e expansão da cobertura dos programas de transferência de renda.

Observações de caráter epidemiológico e experimental evidenciam que indivíduos desnutridos, especialmente crianças, apresentam maior susceptibilidade frente a processos infecciosos e índices mais elevados de morbidade e mortalidade (CHANDRA, 1991; LEE et al., 2003; JOOSTEN, 2010). De acordo com Waitzerg et al. (2006), a desnutrição pode ocorrer em 19% a 80% dos pacientes hospitalizados, sendo que até 70% dos pacientes inicialmente desnutridos sofrem piora gradual em seu estado nutricional durante a hospitalização, afetando seu estado geral e sua resposta ao tratamento.

1.2. Desnutrição e sistema imunológico

As células e as moléculas responsáveis pela imunidade formam o sistema imunológico. A resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas é chamada de resposta imunológica (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Um sistema de proteção ao hospedeiro efetivo consiste de várias barreiras físicas, além de imunidades inata e adquirida (BROSTOFFID et al., 1991). Os mecanismos de resistência do hospedeiro podem ser divididos em dois grupos principais: inespecífico e específico.

As defesas inespecíficas incluem pele e membranas, células fagocitárias, mucos, cílios, complementos, lisozima, interferon e outros fatores humorais. Esses processos inatos estão naturalmente presentes e não são influenciados pelo primeiro contato com o agente de infecção, atuando como a primeira linha de proteção e retardando o estabelecimento da infecção (CHANDRA, 1997).

Os mecanismos antígeno-específicos incluem o sistema de produção de anticorpo por células B e o sistema de imunidade mediada por células T. Esses mecanismos são adaptativos e adquiridos, sendo reações específicas induzidas pela primeira exposição ao microrganismo ou a seus determinantes antigênicos. Eles são efetivos na avaliação da extensão da infecção e na erradicação do organismo invasor. No corpo, as defesas inespecíficas e específicas atuam em união (CHANDRA, 1997).

O sistema imune é capaz de reconhecer os organismos estranhos e invasores, impedir sua disseminação e eliminá-los do corpo humano. Este complexo sistema, responsável pela imunidade, é constituído por moléculas proteicas solúveis e células, que são principalmente os leucócitos e as células teciduais relacionadas a eles (LICHTMAN, 2005; PAUL, 2003).

Os componentes celulares envolvidos na defesa inata e adaptativa do sistema imune são vários. As células exterminadoras naturais (células NK), descritas como não T e não B, são envolvidas principalmente na defesa inata (KINDT et al., 2008). As células T *natural killers* (NKT) representam um raro subtipo de linfócitos T e são consideradas como parte do sistema imune inato; são caracterizadas por expressar rearranjo do TCR e também expressam marcadores de células NK, o que as coloca na interface entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa (SANDBERG, 2003; MATSUDA, 2008; DIANA, 2009). Também podem ser citadas as células apresentadoras de antígeno ou APCs (linfócitos B, células dendríticas, macrófagos), linfócitos T $CD4^+$, linfócitos T $CD8^+$, que agem promovendo respostas imunes celulares e/ou humorais a depender do tipo de antígeno (KINDT et al., 2008).

Os linfócitos T CD4+ tipo Th1 promovem a resposta imune do tipo celular, devido ao perfil de citocinas produzidas IFN-γ, TNF-β e IL-12, que agem basicamente contra bactérias intracelulares. Estas três citocinas também estimulam a síntese de óxido nítrico e outros mediadores inflamatórios. Os linfócitos T CD4+ tipo Th2 produzem perfil distinto de citocinas, como IL-10, IL-4, IL-13 e IL-5, que levam a um tipo de resposta denominada humoral, muito importante na proteção contra bactérias extracelulares e toxinas. Existe equilíbrio entre a produção dessas citocinas, sendo que as citocinas IL-12 e IFN-gama, perfil Th1, inibem a resposta Th2, assim como as citocinas IL-10 e IL-4, perfil Th2, inibem a resposta Th1. A dominância do tipo de resposta Th1/Th2 dependerá do microambiente de citocinas produzidas durante o ataque do patógeno ao hospedeiro (GUMY et al., 2004; KINDT et al., 2008).

A perda do equilíbrio desses mecanismos envolvidos na resposta imune pode levar à imunodeficiência e às suas sequelas; por exemplo: aumento na incidência e na gravidade de infecção, infecção por organismos atípicos, malignidade e doenças autoimunes (BROSTOFFID et al., 1991). A imunodeficiência pode ocorrer devido a fatores congênitos, como defeitos de desenvolvimento do sistema imune, ou pode ser adquirida secundariamente por uma variedade de desordens sistêmicas. No grupo das adquiridas, as desordens nutricionais são as causas mais frequentes de imunodeficiência (BROSTOFFID et al., 1991).

Entretanto, a literatura, relativamente às situações de desnutrição, apresenta dados muitas vezes conflitantes, o que pode ser devido à presença de quadro multicarencial e, frequentemente, associado a outros processos patológicos (ASCHKENASY, 1975; WATERLOW, 1996; CHANDRA, 1989, WHO, 2000).

A desnutrição proteica induz alterações estruturais em órgãos linfoides, especialmente em áreas timo-dependentes (GROSS & NEWBERNE, 1980; XAVIER et al., 1999; COTRAN et al., 2000), conduzindo à involução do timo, do baço e dos linfonodos e à linfopenia sanguínea (ASCHKENASY, 1975; CHANDRA, 1977, 1991;; GROSS & NEWBERNE, 1980; SCHRIMSCHAW, 2003).

As populações de linfócitos parecem ser atingidas de maneira distinta pela desnutrição: nas áreas timo-dependentes há redução no número de linfócitos T, particularmente da população $CD4^+$, estando normal o número de células B no baço, nos linfonodos e no sangue (CHANDRA, 1991).

Na literatura, temos grupos de pesquisadores relatando a ocorrência de depressão da resposta celular (BELL, 1976; RODRIGUES, 2005) e temos trabalhos cujos resultados são opostos, revelando que, na desnutrição proteica, a resposta celular encontra-se estimulada (COOPER et al., 1974; GOOD & LORENZ, 1988). A interação desnutrição-infecção em seus múltiplos aspectos tem sido alvo de estudo nas últimas décadas, sendo considerada a principal causa da imunodeficiência (CHANDRA, 1997; WOODWARD, 1998), enquanto a dieta pode ser considerada como moduladora do sistema imune (MARCOS, 2000).

1.3. STAT (signal transducers and activators of transcription)

O desenvolvimento da resposta imune efetiva envolve células linfoides, células inflamatórias e células hematopoiéticas. As complexas interações entre essas células são

mediadas por um grupo de proteínas coletivamente designadas citocinas, para denotar seu papel na comunicação célula-célula. Entre as inúmeras respostas fisiológicas que requerem o envolvimento de citocinas estão o desenvolvimento das respostas imunes celular e humoral, a indução de resposta inflamatória, a regulação da hematopoese, além do controle da proliferação e da diferenciação celular (KINDT et al., 2008).

As citocinas são proteínas regulatórias de baixo peso molecular ou glicoproteínas secretadas pelas células brancas e por várias outras células no corpo em resposta a inúmeros estímulos. Estas proteínas auxiliam na regulação do desenvolvimento de células efetoras do sistema imune, sendo que algumas citocinas possuem funções efetoras diretas por conta própria. Elas se ligam a receptores específicos de membranas nas células-alvo, desencadeando uma via de transdução de sinais que, em última análise, leva à alteração da expressão gênica em células-alvo. Muitas, se não a maioria, das citocinas usam o sinal transdutor Janus quinase (JAK) e a via de sinalização ativador de transcrição (STAT) para mediar a ativação do gene ou sua repressão (KINDT et al., 2008).

Os STATs (*signal transducers and activators of transcription*) são fatores de transcrição citoplasmáticos latentes que se tornam ativados após serem recrutados para um complexo receptor e fosforilados em resíduos de aminoácidos específicos. A família STAT é composta por sete membros (STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5a, STAT-5b), que, quando ativados por citocinas ou fatores de crescimento, se dimerizam, migram para o núcleo e induzem alterações no padrão de expressão gênica ao se ligarem aos promotores de genes-alvos específicos (DARNELL et al., 1997; ARONSO, 2002).

Dessa forma, a rota de sinalização JAK-STAT promove um caminho direto de sinalização. Quando as citocinas são secretadas pelas células, em resposta a estímulos gerados por outras citocinas do sistema imune, antígenos ou agentes inflamatórios, estas se ligam a superfície celular das células e induzem a oligomerização e a reorientação das cadeias do receptor em um oligômero. Quando ativadas, as JAKs fosforilam e ativam proteínas reguladoras do gene latente, STATs, as quais possuem domínio SH2, que reconhece apenas o sítio fosfotirosina-específico nos receptores e fazem a mediação da ligação da proteína STAT a um sítio de fosfotirosina em um receptor de citocina ativado. O domínio SH2 na STAT que foi liberada faz a mediação da sua ligação a uma fosfotirosina em outra molécula de STAT, formando um dímero. O dímero de STAT move-se em direção ao núcleo onde, em combinação com outros genes de proteínas reguladoras, ligam-se a DNA específico e estimulam sua transcrição (DARNELL et al., 1994; IHLE, 1996; ARONSO, 2002; ALBERTS et al., 2004).

O interferon gama (IFN-γ) é uma citocina pró-inflamatória importante para as imunidades inata e adaptativa, contra infecções virais e bacterianas intracelulares. O IFN-γ é sintetizado principalmente por células NK como parte da resposta imune inata, e por linfócitos T $CD4^+$ e citotóxicos $CD8^+$ efetores. Indivíduos que possuem mutações nos receptores dos genes de IFN-γ são mais susceptíveis a agentes infecciosos, inclusive cepas de salmonela e micobactéria (KADOWAKI, 2000). Dados da literatura indicam que STAT-1 desempenha papel obrigatório na mediação de respostas biológicas dependentes de interferon.

A STAT-1 pode ser ativada por IFN-γ e formar homodímeros que migram para o núcleo, onde se ligam a sequências de GAS – sequência ativadora de interferon gama –

e tem sido relacionada com grande número de outras citocinas e fatores de crescimento, incluindo hormônio de crescimento, interleucina 2 (IL-2), EGF e angiotensina (AKIRA, 1999; 2006).

Trabalhos demonstram que camundongos *knockout* para STAT-1 apresentam comprometimento da resposta imune, com diminuição da expressão de RNA mensageiro para IFN. O IFN-α e o IFN-γ possuem capacidade de modular a expressão de moléculas MHC de classes II e B7-2. Entretanto, animais *knockout* para STAT-1 não apresentaram modulação dessas moléculas, bem como diminuição na produção de óxido nítrico (NO), quando estimulados com LPS, mostrando que animais *knockout* para a STAT-1 são bastante sensíveis a infecções (DURBIN et al., 1996; MERAZ et al., 1996).

A proteína STAT-1 também participa do processo de angiogênese tumoral, inibindo a expressão de moléculas como o fator de crescimento do fibroblasto básico, o MMP-2 e o MMP9, o que lhe confere propriedade antiangiogênica (HAURA, 2005), ao inibir a expressão dos genes bcl-2 e bcl-Xl e promover a expressão das caspases 1, 2, 3 e 7, quando STAT-1 torna-se uma proteína pró-apoptótica (MICHEAU et al., 1999).

Com relação à STAT-3, dados da literatura têm demonstrado que animais deficientes para STAT-3 apresentam comprometimento nas funções de defesa (TAKEDA et al., 1999). Quando mostraram-se altamente suscetíveis ao choque endotóxico, com aumento na produção de citocinas inflamatórias, como TNF-α, IL-1 e IFN-γ, também se observou resposta imune polarizada do tipo Th1, com aumento da secreção de IFN-γ, bem como supressão da produção de IL-10. Esses resultados

indicam que a STAT-3 possui importante papel na sinalização da resposta anti-inflamatória (AKIRA, 2006).

Com relação à citocina IL-10, ela desempenha papel fundamental no controle das respostas imunes e na manutenção da tolerância *in vivo* (MOORE, et al., 2001) e a sinalização da IL-10 compreende principalmente a via STAT-3 (CAVAILLON, 2001). As atividades biológicas da IL-10 são variadas; a mais relevante é a de limitar a magnitude da resposta imune, comprovada em experimentos com ratos com deleção do gene para a produção de IL-10. Esses ratos não somente apresentaram aumento da resposta Th1 e, consequentemente, aumento da resposta às infecções contra bactérias, fungos e toxoplasma, como também mostraram exagerada resposta alérgica e asmática (PESTKA, 2004).

Todas as STATs apresentam topografia comum e são organizadas em três domínios funcionais distintos, que incluem: o domínio de ligação ao DNA, o domínio de dimerização e o domínio de ativação transcricional (TAD) (SCHINDLER, 1998). Dessa forma, a rota de sinalização JAK-STAT promove um caminho direto de sinalização, sendo crítica para diferentes funções celulares, incluindo o desenvolvimento embriogênico, a organogênese, as funções imunológicas, o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência celulares (BUETTNER et al., 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Sabendo-se que animais desnutridos apresentam hipoplasia severa de órgãos linfo-hemopoéticos, com comprometimento na resposta imune, alterações funcionais em macrófagos, com menor síntese de citocinas pró-inflamatórias, se propôs, neste trabalho, abordar alguns aspectos da complexa regulação imunológica e destacar as prováveis contribuições provenientes dos novos conhecimentos envolvidos na resposta imune em situações de desnutrição proteica.

2.2. Objetivos específicos

Baseados em um modelo de desnutrição proteico experimental, avaliamos:

- Perfil hematológico (avaliando hemograma, mielograma, esplenograma)
- Histologia esplênica
- Perfil imunofenotípico esplênico e tímico
- Capacidade proliferativa de células esplênicas
- Capacidade de células esplênicas em sintetizar as citocinas IL-2, IL-10 e IFNγ, quando estimuladas *in vitro* com LPS e CONA
- Expressão das STATs 1 e 3 em células esplênicas

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Para realização dos experimentos, foram utilizados camundongos BALB/C, de dois a três meses de idade, isogênicos, machos, provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Os animais foram submetidos, desde o nascimento, às mesmas condições ambientais (temperatura ambiente entre 22 e 25°C, ciclo de luz de 12 horas). Logo após o desmame, os animais passaram a ser alimentados com ração Purina® e água *ad libitum* até o início do experimento. Eles foram pesados e distribuídos em gaiolas metabólicas (ZUCAS et al., 1969), pesados a cada 48 horas, durante o período de adaptação (BORELLI et al., 1995), que foi definido pelo ganho e pela estabilidade do peso corpóreo.

3.2. Rações

A ração I controle, destinada aos animais nutridos, contém 12% de proteína (Tabela 1. Ração I controle), enquanto a ração II hipoproteica, destinada aos animais do grupo desnutrido, contém 2% de proteína (Tabela 1. Ração II hipoproteica). As rações são isocalóricas, sendo diferente apenas o conteúdo proteico. A caseína foi a fonte proteica das rações, sendo a concentração proteica da caseína e das rações determinadas pelo método micro-Kjeldahl (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). As misturas salínica e vitamínica utilizadas foram as recomendadas por Reeves et al. (1993)

(**Tabela 1**). As rações foram produzidas em nosso laboratório, na forma de granulado, e conservadas a -4°C até o momento de uso.

Tabela 1 - Composição percentual da ração

Composição	Ração normoproteica	Ração hipoproteica
	(g/kg ração)	
Proteína	120	20
Sacarose	100	100
Celulose	50	50
Óleo de soja	40	40
Mistura salínica	35	35
Mistura vitamínica	10	10
L-Cistina	1,8	0,257
Bitartarato de colina	2,5	2,5
Tert-butil-hidroquinona	0,008	0,008
Amido (q.s.p.)	1.000	1.000

Composição das dietas normoproteica e hipoproteica de acordo com o Instituto Americano de Nutrição (REEVES, 1993).

3.3. Indução à desnutrição

No período de adaptação de aproximadamente 3 semanas, os animais foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas e mantidos nas mesmas condições de ciclo de luz de 12h (claro/escuro), onde foram alimentados com ração Purina® e água *ad libitum* até adaptação ao gaioleiro, estabilidade do peso corporal e início do experimento.

Após o período de adaptação, os animais foram separados em dois grupos: controle e desnutrido. Ao grupo controle (nutrido) foi administrada ração contendo 12%

de proteína e ao grupo experimental (desnutrido) foi administrada dieta com 2% de proteína. Em ambos os grupos, foram determinados, a cada 48 horas, o consumo de ração e o peso corpóreo de cada animal. Ao final deste período, os animais dos grupos controle e desnutrido foram eutanasiados para obtenção das amostras biológicas.

3.4. Avaliação do estado nutricional dos animais

A avaliação do estado nutricional dos animais foi baseada no peso corpóreo, no consumo diário das rações, no consumo total de proteína, na dosagem de proteínas totais, albumina, pré-albumina sérica, hemograma, mielograma, esplenograma e no exame histológico do baço.

3.5. Obtenção de sangue total e soro

As amostras sanguíneas foram obtidas, a partir do plexo axilar, com auxílio de uma pipeta de transferência, em camundongos previamente anestesiados com cloridrato de quetamina (50 mg/Kg de massa corporal) associado ao cloridrato de xilazina (50 mg/Kg de massa corporal), por via intramuscular. Amostras sem anticoagulante foram utilizadas, para obtenção do soro, e amostras utilizando-se EDTA 10%, como anticoagulante, para obtenção do sangue total, o qual foi utilizado para a realização do hemograma. O soro foi separado por centrifugação (2.000Xg por 10 minutos), a 4°C, e foi utilizado para a dosagem das proteínas totais, albumina e pré-albumina.

3.6. Determinação de proteínas totais, albumina, pré-albumina e hemograma

A determinação de proteínas totais foi feita pelo método do Biureto (GORNALL et al., 1949) e a determinação de albumina e pré-albumina foi realizada pelo método do Verde de Bromo Cresol (DOUMAS et al., 1971). As amostras foram processadas em duplicata e as leituras realizadas em espectrofotômetro automatizado COBAS MIRA PLUS (ROCHE®).

Para a realização do hemograma, as amostras foram coletadas como descrito no item 3.5 e, com esse material, realizamos o hemograma (DACIE & LEWIS, 1995). O número de eritrócitos e de leucócitos foi determinado pelo analisador automático de células sanguíneas ABC Vet (ABX DIAGNOSTICS). Os valores relativos do número de leucócitos foram determinados em extensões sanguíneas realizadas após a coleta do sangue e coradas pela coloração de May Grunwald-Giensa, modificada (ROSENFELD, 1947).

3.7. Dosagem de IgG e IgM

As amostras sanguíneas foram obtidas como descrito no item 3.5. Foram coletados soros de animais dos grupos controle e desnutrido. Dos animais estimulados *in vivo* com 1,25µg de LPS de *Eschericia coli*, sorotipo 055:B5 (Sigma Chemical Company, USA®), também foram coletados o soro, após 1 hora, para dosagem de imunoglobulinas. As dosagens de IgG e IgM foram realizadas por *kits* comerciais,

seguindo-se a recomendação do fabricante (Abcam, IgG Mouse ELISA Kit ab157719 e IgM Mouse ELISA kit ab133047).

3.8. Obtenção de células da medula óssea e realização do mielograma

Animais anestesiados, de acordo com o descrito no item 3.5, foram exsanguinados por venossecção e eutanasiados. Procedeu-se à retirada do fêmur esquerdo, seguida do corte das epífises. As células da MO foram obtidas por lavagem da cavidade femural com 0,5 mL de meio de cultura McCOY´S 5A®, modificado (SIGMA®, CHEMICAL COMPANY, USA). A suspensão celular obtida foi utilizada para a contagem do número total de células nucleadas em câmara de Neubauer (utilizando-se, como diluente, o líquido de Turk) e para a confecção de lâminas obtidas por citocentrifugação e coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947), que foram analisadas em microscópio óptico, a fim de se realizar a identificação e a quantificação das populações celulares (contando-se, no mínimo, 300 células por lâmina).

3.9. Obtenção de células do baço

Para obtenção de células do baço, após a perda de 20% do peso corpóreo inicial, os animais do grupo desnutrido e os respectivos controles foram anestesiados, exsanguinados e eutanasiados. O baço foi retirado e transferido para uma placa de Petri de plástico, contendo meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab®, Campinas, Brasil), pH 7,4, estéril, contendo 10% de soro bovino fetal (Cultilab® Campinas, Brasil) contendo glutamina. Na placa de Petri, a cápsula do órgão foi rompida e as células foram

delicadamente retiradas da cápsula pelo método de dissociação mecânica. A suspensão foi homogeneizada na placa com pipeta tipo Pasteur, para completa dissociação celular, e transferida para o tubo cônico de plástico, que foi mantido em banho de gelo.

As células obtidas do baço foram quantificadas em hemocitômetro de Neubauer, enquanto a viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão com o azul de tripano.

3.10. Obtenção de células do timo

Para obtenção de células do timo, após a perda de 20% do peso corpóreo inicial, os animais do grupo desnutrido e os respectivos controles foram anestesiados, exsanguinados e eutanasiados. O timo foi retirado e transferido para uma placa de Petri de plástico, contendo meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab®, Campinas, Brasil), pH 7,4, estéril, contendo 10% de soro bovino fetal (Cultilab® Campinas, Brasil) contendo glutamina. Na placa de Petri, o timo foi macerado com bulbo de seringa e uma peneira de malha fina (BD Biosciences). Após a maceração, a suspensão foi transferida para o tubo cônico de plástico, que foi mantido em banho de gelo.

As células obtidas do timo foram quantificadas em hemocitômetro de Neubauer, enquanto a viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão com o azul de tripano.

3.11. Esplenograma

A partir das amostras da suspensão total de células do baço e imediatamente após a coleta, foram preparadas lâminas por citocentrifugação (Incibrás®, Brasil). As

lâminas foram coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947), e, para a análise diferencial, foram contadas, no mínimo, 300 células ao microscópio óptico. A contagem total de células foi realizada em hemocitômetro de Neubauer, após diluição das amostras da suspensão celular com líquido de Turk.

3.12. Fenotipagem celular por citometria de fluxo

Células do baço e do timo dos camundongos BALB/C foram preparadas de acordo com o protocolo descrito nos itens 3.9 e 3.10. Suspensões contendo 10^6 células/mL foram preparadas e distribuídas em tubos de polipropileno de 12 x 75 mm (BD Biosciences). A seguir, foram adicionados anticorpos conjugados com fluorocromos e em diluições apropriadas para os marcadores CD3 Pacific blue, CD4 APC, CD8a PerCP, CD19 PE e CD49b FITC (para esplenócitos) e CD4 APC, CD8a PerCP (para células do timo), seguido de incubação por 30 minutos a 4º C, protegida da luz. Após lavagem, as amostras foram ressuspendidas em tampão de FACS (PBS contendo 1% de soro fetal bovino) e adquiridas nos citômetros FACSCalibur ou FACSCanto II, do Serviço de Citometria do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Os anticorpos utilizados foram tanto da empresa BD Biosciences quando da empresa Biolegend.

A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o *software* FlowJo, versão 7.5.5 (Tree Star, Ashland, OR, USA).

3.13. Avaliação do perfil proliferativo das células esplênicas utilizando iodeto de propídeo e RNAse, por citometria de fluxo

As suspensões de células do baço foram obtidas como descrito no item 3.9. Foram utilizadas $1x10^6$ células do baço, que foram centrifugadas por 10 minutos, 300 g, a 4^oC. O sobrenadante foi retirado e o sedimento celular lavado com PBS (solução de tampão fosfato, pH 7,4). Em seguida, foram adicionados 200 μL de solução de iodeto de propídeo (PI) (BD Biosciences Pharmigem) em $1x10^6$ células.

Após este período, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 300 g, o sobrenadante foi retirado e o sedimento celular foi lavado duas vezes com PBS, sendo que, após a última lavagem, o sedimento foi ressuspenso em 200 μL de PBS. Foram adicionados 200 μL de solução de iodeto de propídeo para marcação (5 μL de Triton–X100, 20 μL de RNAse a 20 mg/mL, 50 μL de uma solução estoque de PI a 50 μg/mL), sendo submetida à análise por citometria de fluxo.

3.14. Avaliação histopatológica do baço

Para a avaliação histológica do baço, os órgãos retirados dos camundongos, tanto do grupo controle quanto do grupo desnutrido, foram fixados em formalina tamponada 10% e incluídos em parafina, seguindo o processamento histológico convencional. A avaliação histológica foi realizada em lâminas contendo cortes de aproximadamente 5μm, obtidos a partir de fragmentos de tecido emblocados em parafina e corados pelos métodos hematoxilina e eosina, seguindo-se os procedimentos histológicos rotineiros.

3.15. Cultura de células totais do baço

As células foram coletadas como descrito no item 3.9, sendo que as células mononucleares foram separadas utilizando-se Fycoll-Hypaque. Foram plaqueadas, em quadriplicata, $1x10^5$ células mononucleares do baço em placas de 96 *wells* em meio RIPA suplementado com 10% de soro bovino fetal e mitógenos (LPS ou ConA), em volume final de 150 µL/poço. As placas de cultura foram mantidas por 5 dias a 37^oC e em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e as células foram lisadas por meio da adição em cada poço de tampão RIPA (0,1 % SDS, 1 % Igepal CA-630, 1 % deoxicolato de sódio, 10 mM Tris.HCL, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 µg/mL aprotinina, 1 µg/mL leupeptina, 100 µg/mL PMSF, 0,5 mM EDTA). A partir desse lisado celular, foram realizados os ensaios de determinação das proteínas STAT-1 e STAT-3 por *Western Blot*.

O sobrenadante da cultura celular removido foi congelado (-80 °C), para posterior dosagem de IFN-γ, IL-2 e IL-10. A determinação das concentrações de IFN-γ, IL-2 e IL-10, presentes no sobrenadante das culturas celulares, foi realizada pelo método de ELISA (*Enzyme Linked ImmnunoSorbent Assay*) – *kits* R&D Systems.

3.16. Avaliação da síntese de citocinas

A análise de citocinas foi realizada em amostras do sobrenadante de cultura de células do baço obtido após 24 horas e 72 horas de cultivo, de acordo item anterior. A concentração de IL-2, IL-10 e IFN-γ foi determinada por meio de imunoensaio do tipo

ELISA, utilizando-se *kit* Quantikine (R&D System, USA), segundo metodologia descrita pelo fabricante.

3.17. Proliferação de linfócitos

Após eutanásia, camundongos BALB/c machos, grupos controle e desnutrido, tiveram o baço retirado em condições assépticas e colocado em 5 mL de RPMI 1640. O órgão foi macerado em peneiras com poros de 40 µm, com a ajuda de um êmbolo de seringa estéril. As células foram centrifugadas a 300 *g* (5 min/4º C) e, após descarte do meio, os eritrócitos foram lisados. As células foram lavadas novamente e ressuspendidas em meio completo, para contagem em câmara de Neubauer. Suspensões celulares contendo 10^6 células/mL foram preparadas e distribuídas em alíquotas de 100 µL por poço, em placas de 96 poços. A seguir, foram adicionados nos poços da cultura 100 µL de Con A, nas concentrações finais de 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL e 1 µg/mL ou LPS nas concentrações finais de 1 µg/mL, 5 µg/mL , 10 µg/mL e 20 µg/mL. As culturas foram incubadas por 72 h, a 37º C e 5% CO_2. Após 48 h de incubação, 25 µL de resazurina 0,01% (preparada em meio completo) foram adicionados em todos os poços.

A resazurina é um composto de cor azul, não tóxico, permeável e não fluorescente, que utiliza as reações de redução provenientes de células metabolicamente ativas para converter-se em uma molécula vermelha fluorescente chamada resofurina. A quantidade de fluorescência e também a variação na coloração produzida durante o ensaio são proporcionais ao número de células vivas. Entre 18 e 24 horas após a adição da resazurina, a densidade óptica (D.O.) de cada poço foi medida, a 570 e 600 nm, e a

proliferação foi avaliada pela subtração dos valores obtidos entre a D.O. das duas leituras.

A proliferação celular também foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT, utilizando-se as concentrações de LPS de 1,25µg/mL ou ConA de 5µg/mL. As células do baço dos camundongos BALB/C foram preparadas de acordo com o protocolo descrito acima.

Tanto nas amostras previamente incubadas quanto a curva padrão foram adicionados 10µL da solução de MTT (azul de tiazol) em cada poço (Sigma® Chemical Company, USA) na concentração de 5mg/mL, sendo as placas novamente incubadas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2, por 4 horas. Após esse período de incubação, foram adicionados 100µL de solução de SDS 10% em HCl 0,01M em cada poço, seguido de nova incubação por 12-72 horas, a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2. Após esse período, a proliferação celular foi avaliada pelo método de MTT.

O ensaio colorimétrico do MTT tem como princípio a redução do sal MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromo tetrazólio, Sigma®) pela desidrogenase mitocondrial das células vivas, para o produto de reação MTT-formazana de cor azul escuro, assim avaliando a proliferação celular expressa em termos de absorbância. Através de um leitor de placas (EL800 Universal Microplate Reader – Bio-Tek Instrumentals, Inc), foram obtidas as absorbâncias a 550nm. Os testes foram realizados em triplicata.

3.18. Determinação da expressão de STAT-1 e STAT-3

A expressão das STAT-1 e STAT- 3 em células do baço, mantidos sob cultura como descrito no item 3.15, foi determinada pela técnica de *Western Blotting*.

3.19. SDS-PAGE e *Western Blotting*

3.19.1. Preparo do gel de poliacrilamida

O procedimento foi realizado conforme protocolo de Sambrook et al. (1989) e Harlow & Lane (1988), descrito sucintamente a seguir.

Foram preparados géis em bicamada, sendo a camada superior (gel de empacotamento) constituída de acrilamida a 5%, 125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,1 % TEMED. O gel inferior (resolutivo) foi preparado com 6 a 10 % de poliacrilamida, 380 mM Tris.HCl, pH 8,8, 0,1 % persulfato de amônio e 0,077 % TEMED.

3.19.2. Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE e *Western Blotting*

Os lisados foram preparados a partir de $1x10^6$ células em tampão RIPA (0,1 % SDS, 1 % Igepal CA-630, 1 % deoxicolato de sódio, 10 mM Tris.HCL, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 µg/mL aprotinina, 1 µg/mL leupeptina, 100 µg/mL PMSF, 0,5 mM EDTA). O material foi sonicado (30 segundos), centrifugado por 10 minutos, a 20.000 rpm, e a 4 °C. O sobrenadante foi quantificado e o volume correspondente a 200 µg foi misturado ao tampão de amostra (3 x concentrado, 100 mM Tris.HCL, pH 6,8, 5 % 2-

mercaptoetanol (v/v), 2 % SDS, 20 % glicerol, 0,01 % azul de bromofenol), fervido por 10 minutos e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida. Foi utilizada a mistura pré-corada BenchMark (GIBCO BRL, MD, USA) (5-10 µg de proteína).

3.19.3. Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose)

O gel contendo as proteínas fracionadas por eletroforese foi incubado por 10 min em tampão de transferência (3 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037 % SDS, 20 % metanol, pH 8,3). Paralelamente, a membrana de nitrocelulose foi hidratada e então também incubada em tampão de transferência. Um "sanduíche" foi então montado, na seguinte ordem: 3 folhas de papel filtro, gel, membrana, 3 folhas de papel filtro. A transferência foi realizada em cuba de eletroforese, na presença de tampão de transferência, sob corrente de 200-400 mA, por 30-90 min.

A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana por 5-10 min com corante Ponceau (1% Ponceau, 1 % ácido acético), seguida de lavagem com água destilada ou TBS (Tris, pH 7,5, 20 mM, NaCI 0,9 %).

3.19.4. Sondagens das proteínas com anticorpos

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com proteínas de leite desnatado Molico, a 5 %, em tampão TBS, por 12 horas, sob agitação. Os anticorpos primários específicos Stat1 (E-23): sc-346, p-Stat1 (Tyr 701): sc-135648, Stat3 (C-20): sc-482 e p-Stat3 (Ser 727)-R: sc-8001-R , ambos da marca Santa Cruz Biotechnology, Inc., foram diluídos 1:500 em TBS com 0,05% Tween

20 (TBST) e utilizados para a incubação com as membranas, por 12 horas, sob agitação, à temperatura ambiente. A membrana foi lavada 3 vezes, por 10 min, com TBST. As proteínas foram então sondadas com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:5.000 em TBST, por 2 horas, com agitação. A membrana foi lavada 3 vezes, por 10 min, com agitação.

3.19.5. Revelação com sistema quimioluminescente

A revelação foi realizada utilizando-se o *kit* ECL Plus (luminol, fenol e peróxido de hidrogênio), com exposição das membranas em filmes de raio X. Para análise, foi utilizado o digitalizador de imagem ImageQuant 400 (GE Helthcare).

4.0. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada conjunto de dados, foi realizado o teste de normalidade. Após a verificação de que os dados seguiam uma distribuição normal, todos os resultados foram analisados por teste “t”, sendo considerado estatisticamente significativo quando $p<0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prisma versão 4.0.

5. RESULTADOS

5.1. Consumo de proteína, variação do peso e da ração

Verificamos que não houve diferença na quantidade de consumo de ração dos animais do grupo desnutrido em relação aos animais do grupo controle, mas houve significativa redução no consumo de proteínas, já que a dieta hipoproteica contém apenas 2% de proteína. Os animais do grupo desnutrido apresentaram perda de peso significativa em relação ao peso inicial, quando comparados com os do grupo controle.

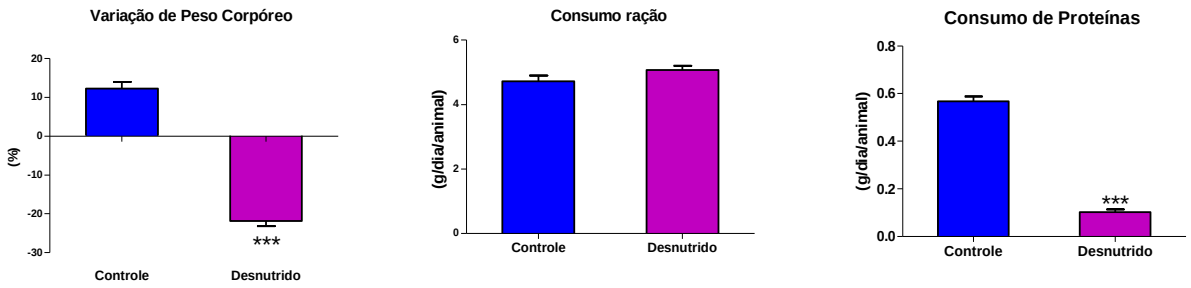


Gráfico 1. Resultado, em valores médios ± o desvio padrão, do consumo de ração e de proteínas dos animais dos grupos controle (n=20) e desnutrido (n=20). Os animais dos grupos **controle** e **desnutrido** receberam, respectivamente, a ração I e a ração II. * Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

5.2. Análise das concentrações séricas de proteínas totais e albumina

Verificamos redução significativa nas concentrações de proteínas totais, albumina e pré-albumina nos animais desnutridos em relação ao grupo controle, caracterizando o quadro de desnutrição.

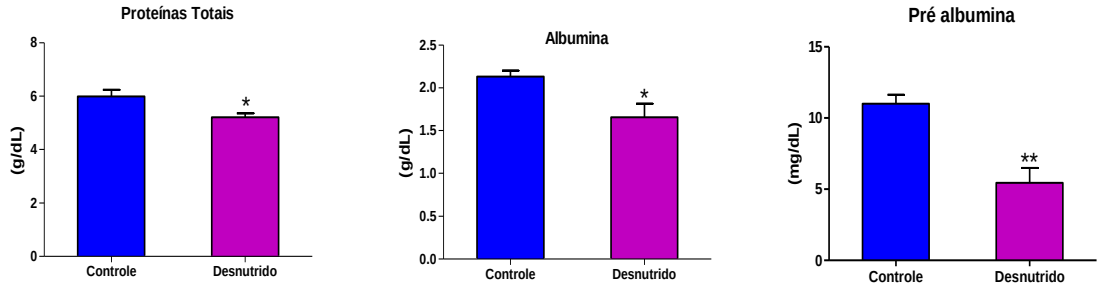


Gráfico 2. Resultado, em valores médios ± o desvio padrão, de proteínas totais, albumina e pré-albumina dos animais dos grupos controle e desnutrido. Os animais dos grupos **controle** (n=11) e **desnutrido** (n=11) receberam, respectivamente, a ração I e a ração II. * Valores significativos para p≤ 0,05. ** Valores significativos para p≤ 0,01. **n** representa o número de animais avaliados.

5.3. Avaliação das concentrações séricas de imunoglobulinas

A quantificação de imunoglobulina M não mostrou diferença entre animais dos grupos controle e desnutrido. Entretanto, animais estimulados com LPS apresentaram menor produção de IgM em relação aos animais controles. Em relação à produção de IgG, não observamos diferenças estatísticas entre os grupos.

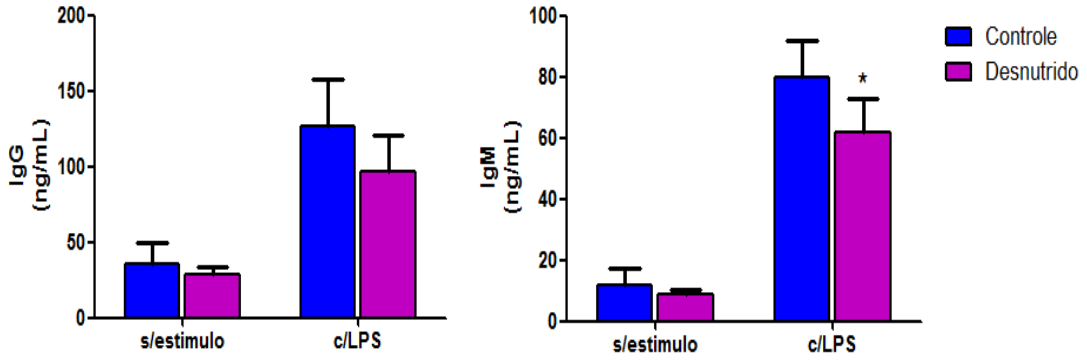


Gráfico 3. Resultado, em valores médios ± o desvio padrão, das concentrações de imunoglobulinas IgG e IgM dos animais dos grupos controle e desnutrido. Os animais dos grupos **controle** (n= 5) e **desnutrido** (n= 5). * Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

5.4. Avaliação hematológica

5.4.1. Eritrograma

Os animais do grupo desnutrido apresentaram anemia, com valores significativamente menores (p ≤0,05) para número de eritrócitos, volume hematócrito e concentração de hemoglobina, em relação aos respectivos controles.

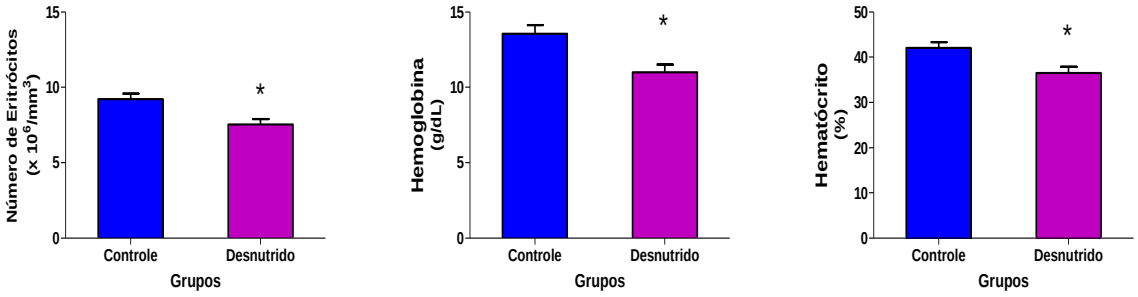


Gráfico 4. Resultado, em valores médios ± o desvio padrão, da concentração de hemoglobina, do número de hemácias e do volume do hematócrito de camundongos Balb/C dos grupos **controle** (n =10) **e desnutrido** (n =10). **n** representa número de animais avaliados. * Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

5.4.2. Leucograma

Os animais do grupo desnutrido apresentaram redução estatisticamente significativa do número de leucócitos, em relação ao grupo controle; sendo que os animais do grupo desnutrido apresentaram leucopenia com acentuadas neutropenia e linfocitose, em relação aos respectivos controles.

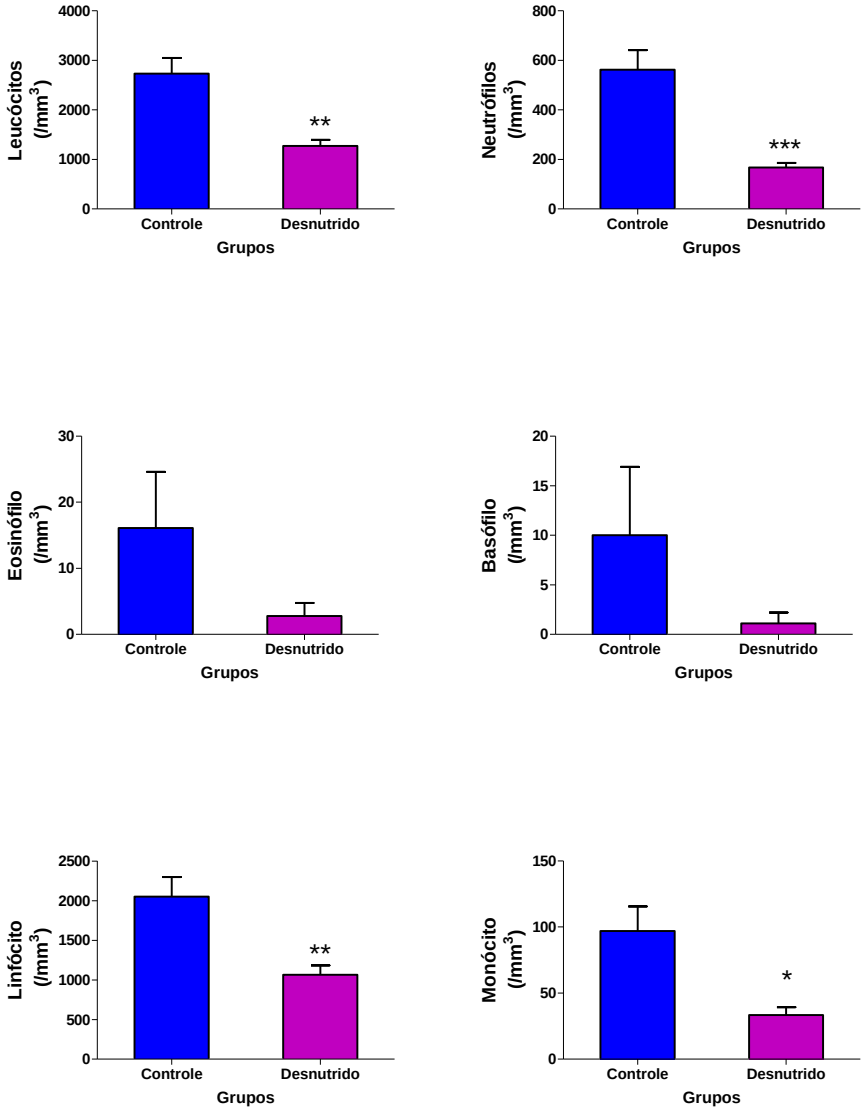


Gráfico 5. Resultados em valores médios ± o desvio padrão do número de leucócitos, do numero de bastonetes, segmentados, linfócitos, monócitos e eosinófilos presentes no sangue dos animais dos grupos controle (n=10) e desnutrido (n=10).).* Valores significativos para p≤ 0,05. ** Valores significativos para p≤ 0,01. *** Valores significativos para p≤ 0,001. **n** representa o número de animais avaliados.

5.5. Avaliação morfológica da medula óssea

A análise do quadro hematológico medular dos animais desnutridos evidenciou hipoplasia, com significativa redução no número de células nucleadas blásticas e na série granulocítica, além de significativa redução na série eritrocitária plasmocitária e monocítica, porém não observamos diferenças significativas nas contagens de

linfócitos.

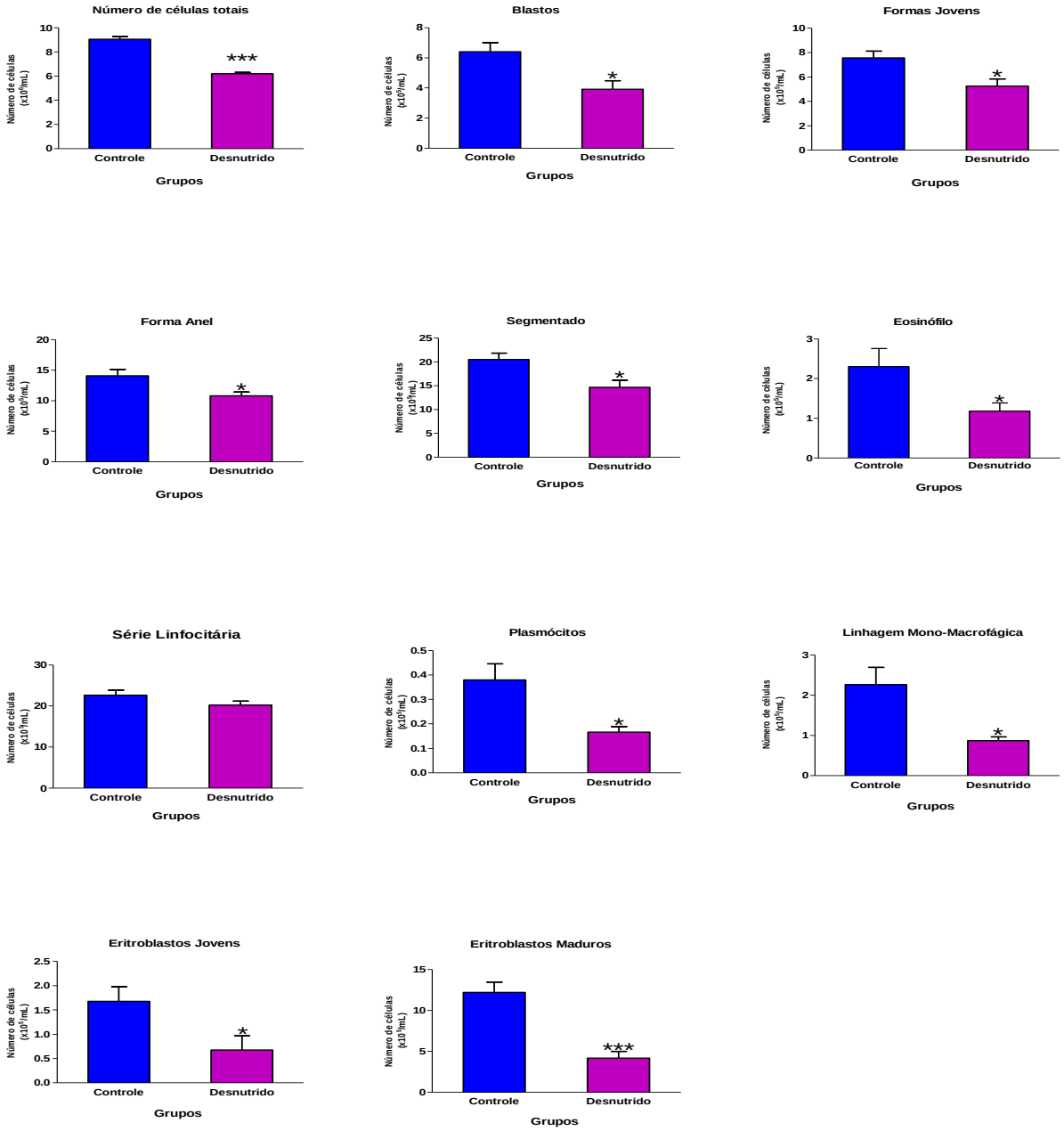


Gráfico 6. Resultado, em valores médios ± o desvio padrão, do mielograma do número total de células nucleadas e dos diferentes tipos celulares presentes na medula óssea de camundongos dos grupos **controle** (n =6) **e desnutrido** (n =6).* Valores significativos para p≤ 0,05. ** Valores significativos para p≤ 0,01. **n** representa o número de animais avaliados.

5.6. Esplenograma

A avaliação da celularidade do baço indicou diferença significativa entre os animais dos grupos controle e desnutrido. Podemos observar que os animais do grupo desnutrido apresentaram valores menores em relação ao grupo controle, caracterizada por diminuição de células da linhagem granulocítica, principalmente células maduras segmentadas, bem como diminuição do número total de linfócitos esplênicos (**Gráfico 8**). Da mesma forma, o peso do baço dos animais desnutridos apresentou diferença significativa, quando comparado com o baço dos animais do grupo controle (**Gráfico 7**).

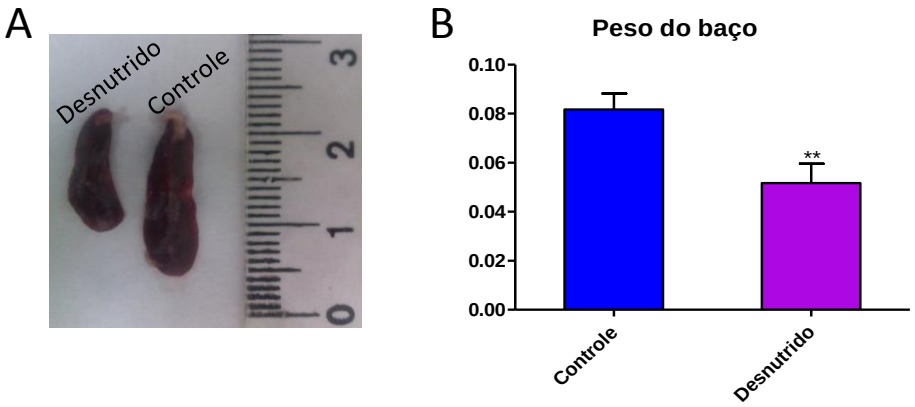


Figura 1. A) Foto representativa do baço de animal do grupo controle e do grupo desnutrido, evidenciando atrofia no baço dos animais do grupo desnutrido.

Gráfico 7. B) Resultado, em valores médios ± o desvio padrão, do número de células nucleadas do baço de camundongos dos grupos **controle** (n=8) e **desnutrido** (n=8).** Valores significativos para p<0,01. **n** representa número de animais analisados.

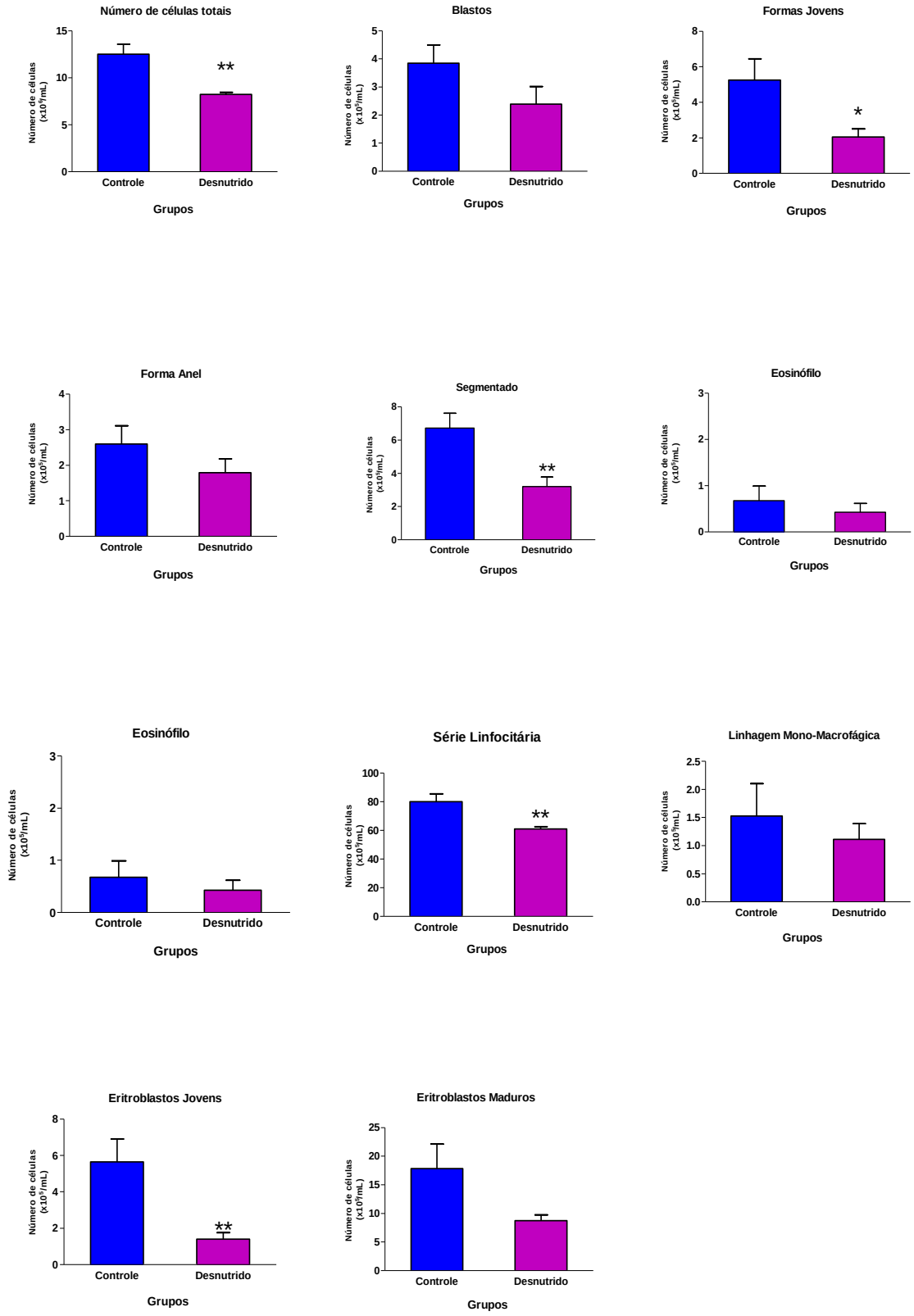


Gráfico 8. Resultado, em valores médios ± o desvio padrão, do esplenograma dos grupos **controle** (n =6) e **desnutrido** (n =6). * Valores significativos para p≤ 0,05. ** Valores significativos para p≤ 0,01. **n** representa o número de animais avaliados.

5.7. Análise histológica do baço

O baço de animais do grupo desnutrido apresentou menor celularidade (Figura D), se comparado ao baço dos animais do grupo controle (Figura B), no qual observamos a progressiva depleção celular, em particular de linfócitos, além do espessamento de cápsulas e trabéculas esplênicas. O baço de animais dos grupos controle e desnutrido apresentou-se histologicamente preservado (Figuras A e C).

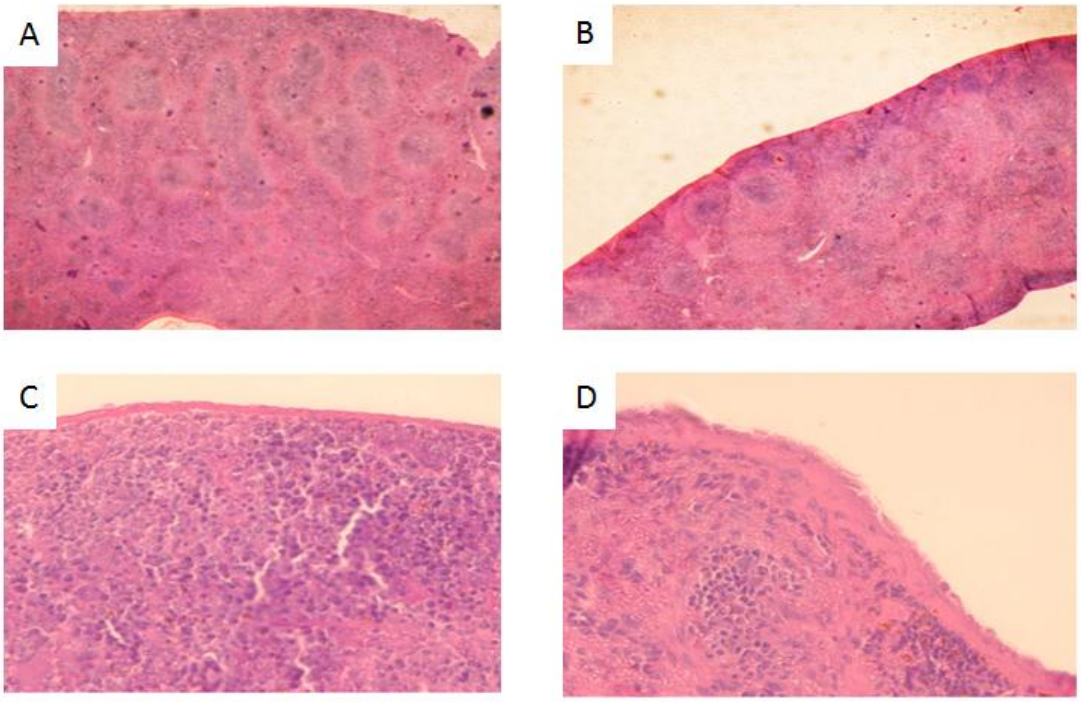


Figura 2. A: Corte histológico de baço de animal do grupo controle, apresentando imagem panorâmica do tecido (4X). **B:** Corte histológico de baço de animal do grupo controle, evidenciando cápsula delimitando parênquima tecidual (40X). **C:** Corte histológico de baço de animal do grupo desnutrido, apresentando imagem panorâmica do tecido (4X). **D:** Corte histológico de baço de animal do grupo desnutrido, mostrando espessamento capsular e rarefação linfocitária (40X).

5.8. Ensaio de proliferação de linfócitos

A linfoproliferação das células do baço, pelo ensaio de resazurina, mostra que as células do grupo controle, quando estimuladas com diferentes concentrações de concanavalina (ConA) e lipopolissacarídeo (LPS), apresentaram maior capacidade de proliferação quando comparada com células de animais do grupo desnutrido. Destaca-se que células estimuladas com ConA apresentaram maior capacidade proliferativa.

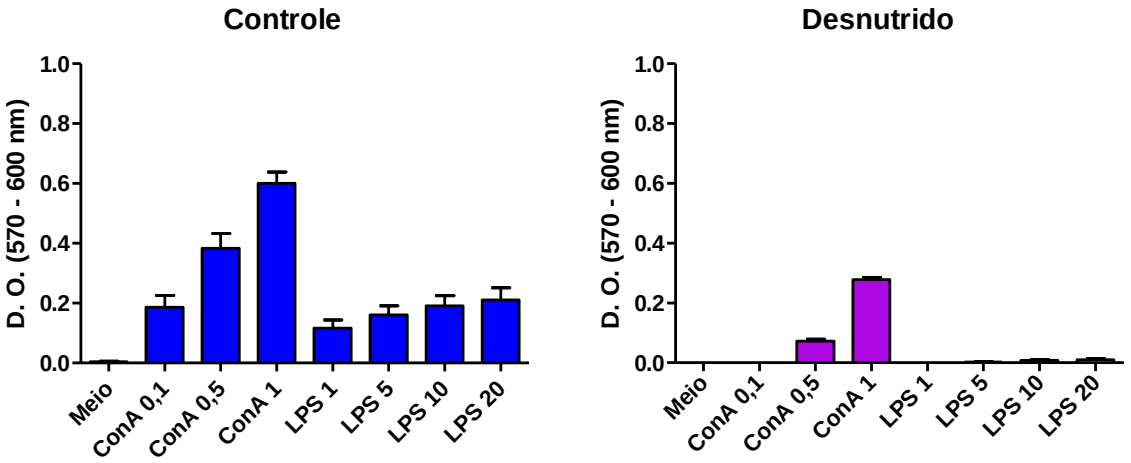


Gráfico 9. Resultados, em valores médios ± o desvio padrão, do número total de células mononucleares viáveis do baço, avaliadas após 72 horas de cultivo, após estimuladas com LPS ou ConA. Animais dos grupos **controle** (n=6 animais) e **desnutrido** (n=6 animais). **n** representa o número de animais avaliados.

A linfoproliferação das células do baço, pelo ensaio de MTT, mostra que as células de ambos os grupos não apresentaram aumento de proliferação. Porém, quando essas células foram estimuladas com ConA e LPS, observamos aumento da proliferação, sendo que células de animais do grupo desnutrido apresentaram menor capacidade proliferativa quando comparadas com células de animais do grupo controle.

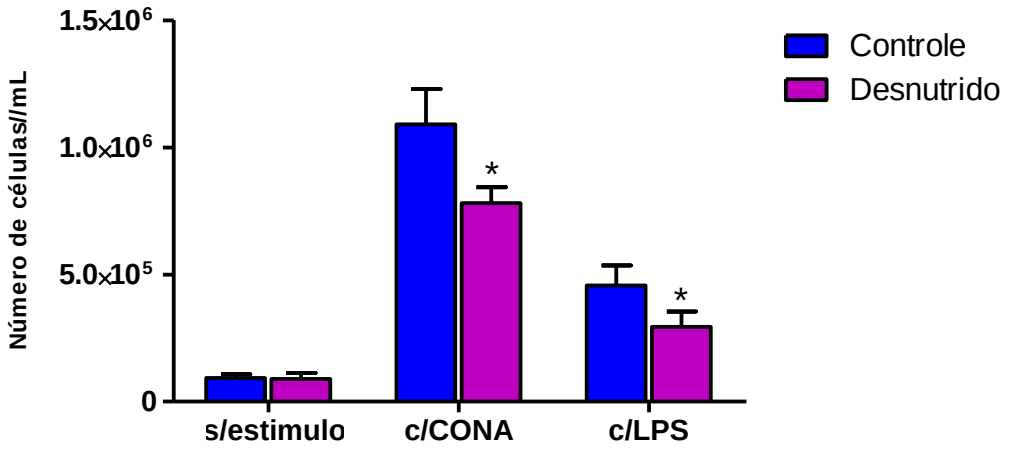


Gráfico 10. Resultados, em valores médios ± o desvio padrão, do número total de células mononucleares viáveis do baço avaliadas após 72 horas de cultivo. Os animais dos grupos **controle** (n=6) e **desnutrido** (n=6).* Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

5.9. Ciclo celular

A análise do ciclo celular em células esplênicas, avaliada pelo iodeto de propídio, revelou que os animais do grupo desnutrido, estimulados com ConA, apresentaram menor porcentagem de células nas fases S/G2/M, quando comparadas com células esplênicas de animais do grupo controle (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Ciclo celular de células esplênicas dos animais dos grupos controle e desnutrido estimuladas ou não com ConA

	Controle (n=6)	**Desnutrido (n=6)**	**Controle (n=6)**	**Desnutrido (n=6)**
Parâmetros	**Sem estímulo**		**CONA**	
G0/G1	94.57 ± 1.36	95.45 ± 2.77	85.57 ± 3.59	90.18 ± 5.67
S/G2/M	5.43 ± 1.36	4.55 ± 2.77	14.44 ± 3.59	9.81 ± 3.55*

Resultados em valores médios ± desvio padrão das fases do ciclo celular G0/G1 e das S/G2/M de células do baço, estimuladas ou não com ConA, utilizando a técnica de iodeto de propídio. Os animais dos grupos **controle** (n=6) e **desnutrido** (n=6). * Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

5.10. Caracterização imunofenotípica de células do baço

Todas as representações gráficas da imunofenotipagem de células do baço de camundongos nutridos e desnutridos foram realizadas pela aquisição de 10^6 células, realizada citômetros FACSCalibur ou FACSCanto II e analisadas e compensadas pelo *software* Flow Jo versão 7.5.5 (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Estratégia de análise

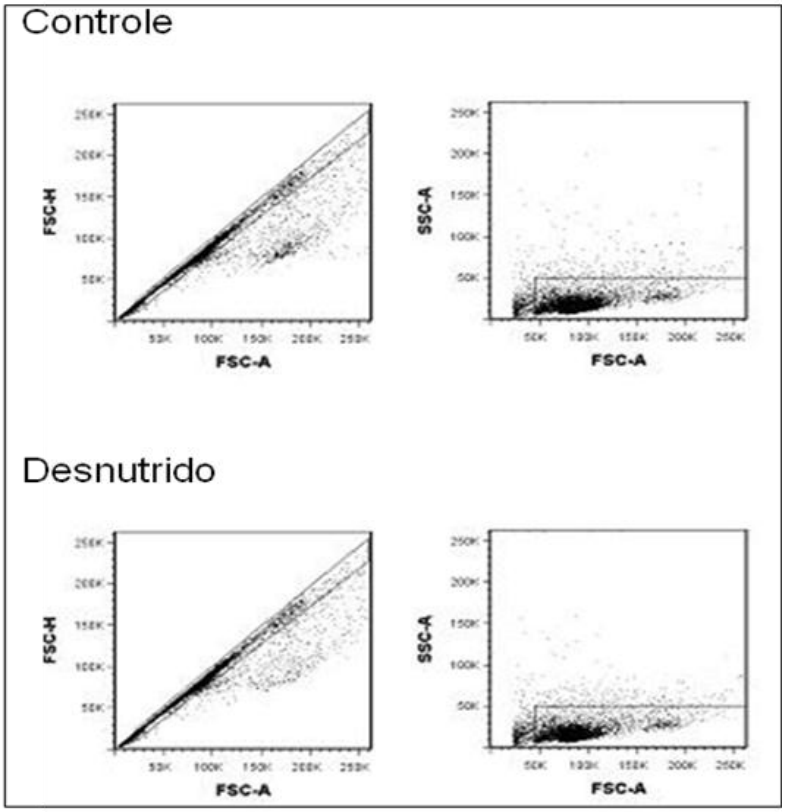


Figura 3. Análise da dispersão dos eventos celulares adquiridos por citometria de fluxo: todas as células adquiridas de animais (controle e desnutrido) foram analisada em uma única janela eletrônica. Citograma bidimensional em "dot plot" formado por FSC na abscissa e SSC na ordenada. O tamanho celular é representado pelo canal de dispersão a 0° (FSC) e a complexidade interna é representada pelo canal de dispersão a 90° (SSC).

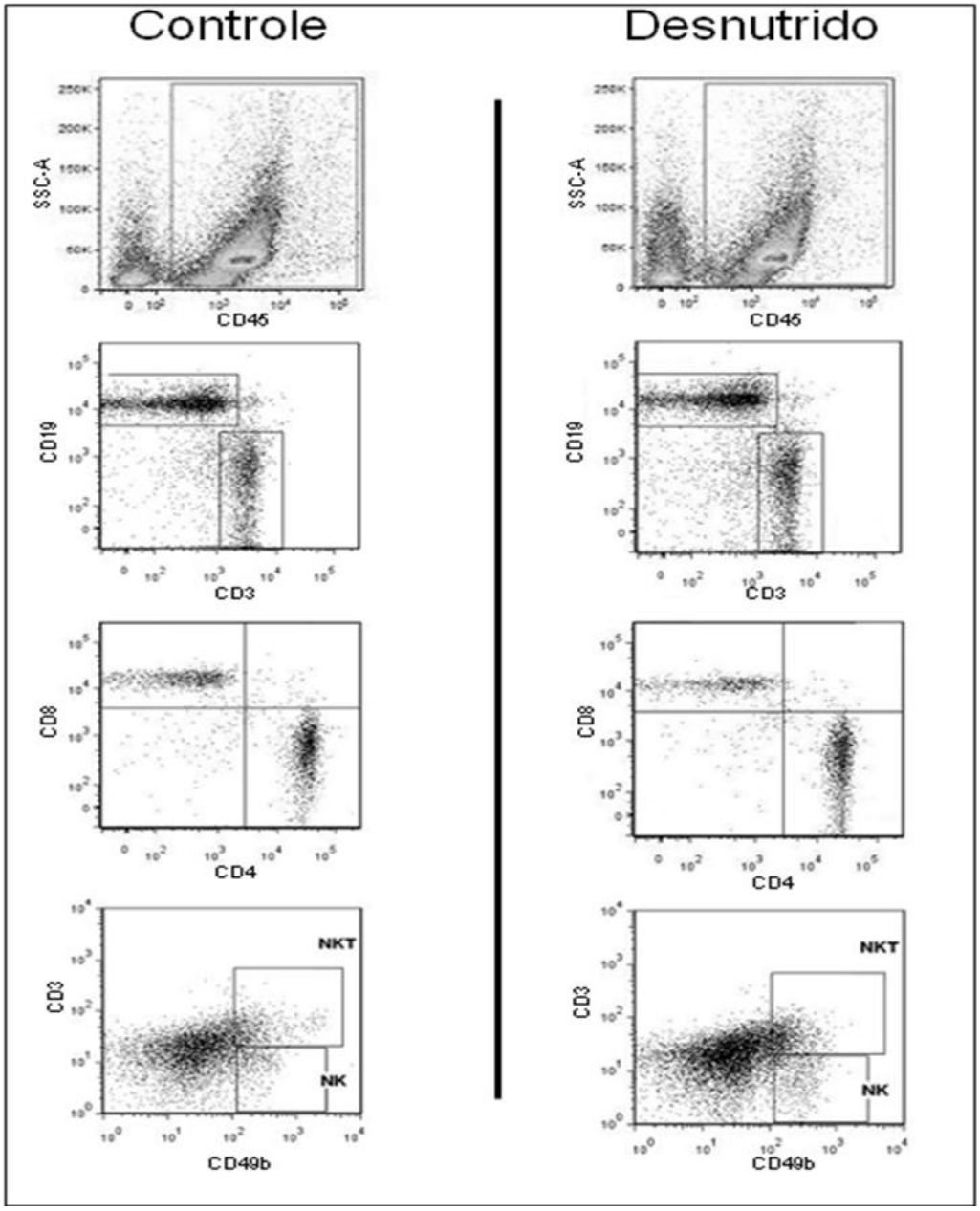


Figura 4. Estratégia de definição da janela de identificação para mensuração da quantificação de linfócitos T CD3/CD4/CD8, CD19 e NK/NKT de células do baço. Inicialmente, foi feita uma janela de aquisição na região de leucócitos marcada com anti-$CD45^+$. Na sequência, foi feita outra janela de aquisição na região denominada $CD3^+$ e $CD19^+$ e, por fim, foi delimitada uma janela de aquisição de quadrantes para identificar as subpopulações de linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^-$, $CD8^-$, $CD4^+CD8^+$ e $CD4^-CD8^-$, respectivamente. Após, foi feita outra janela de aquisição na região denominada $CD3^+$ e CD49b e, finalmente, foi delimitada uma janela de aquisição de quadrantes para identificar as subpopulações de linfócitos NK e NKT.

A representação gráfica da imunofenotipagem de células do baço de camundongos (controle e desnutrido) apresentou diferença estatística significativa na porcentagem de células CD45, de células $CD4^+$ e de células $CD3^+$ no baço, quando comparados aos animais do grupo controle. Quando comparamos a porcentagem de células $CD19^+$ e de células NK e NKT de animais desnutridos, verificamos que não houve diferença estatística – quando comparados com animais do grupo controle.

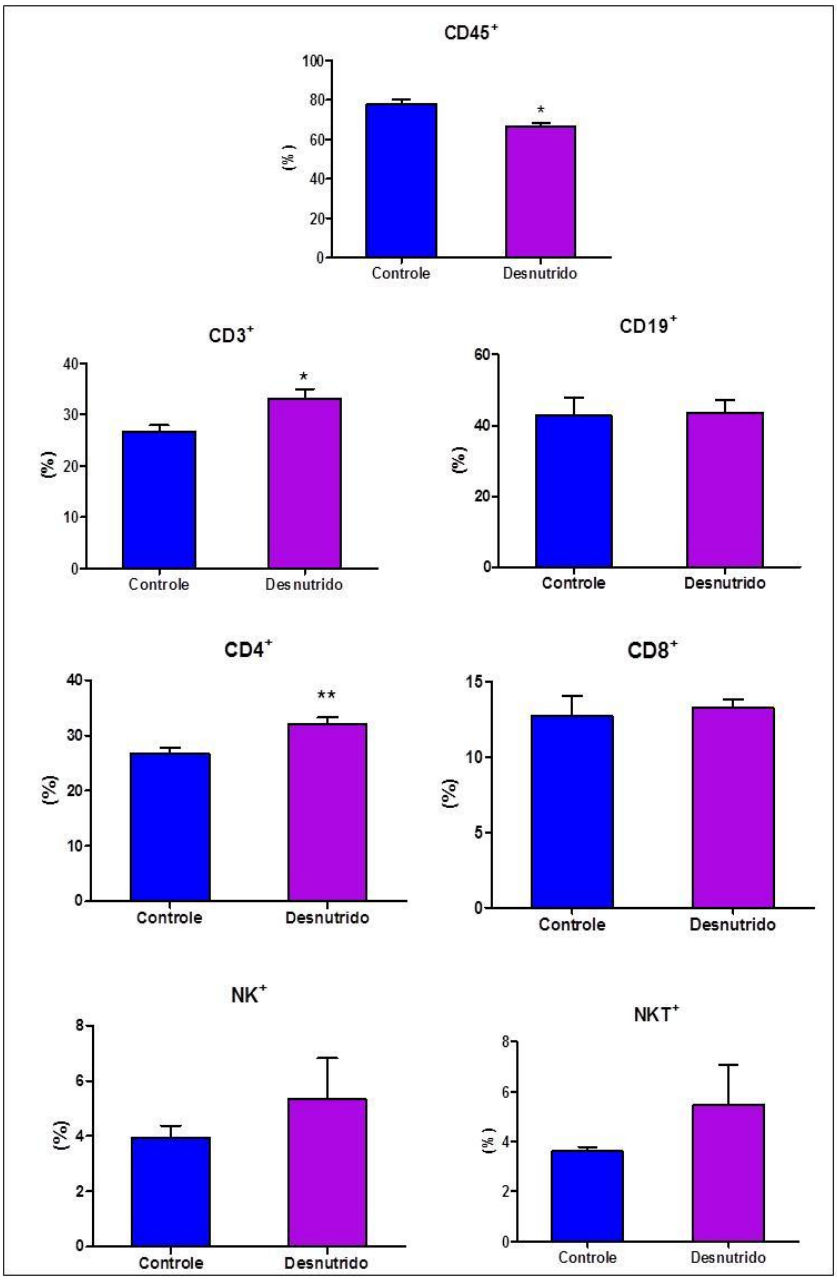
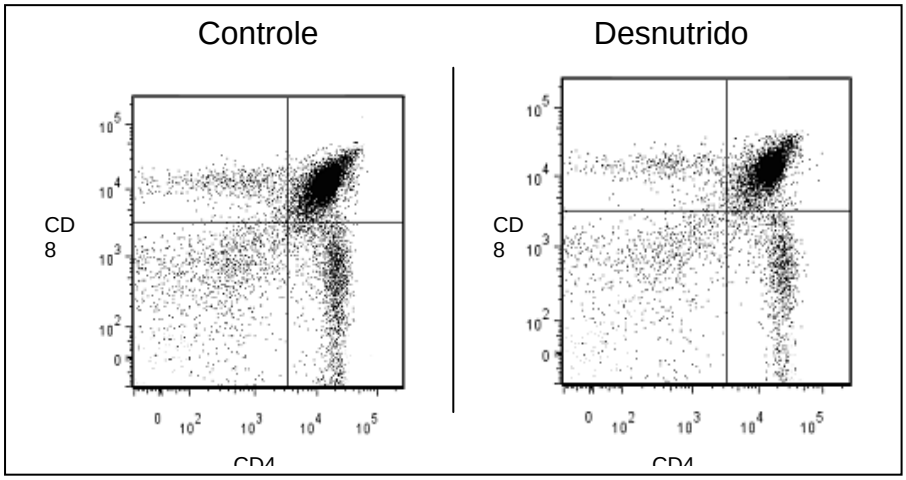


Gráfico 11. Resultado, em valores médios ± o desvio padrão, das subpopulações de linfócitos CD45/CD3/CD4/CD8/CD19 e NK/NKT do baço de animais dos grupos **controle** (n=6) e **desnutrido** (n=6). * Valores significativos para p≤ 0,05. ** Valores significativos para p≤ 0,01. **n** representa o número de animais avaliados.

5.11. Caracterização imunofenotípica de células do timo

Todas as representações gráficas da imunofenotipagem de células do baço de camundongos nutridos e desnutridos foram realizadas pela aquisição de 10^6 células realizada em citômetros FACSCalibur ou FACSCanto II e analisadas e compensadas

pelo *software* Flow Jo versão 7.5.5 (Tree Star, Ashland, OR, EUA). Os animais desnutridos não apresentaram diferença na porcentagem de células $CD4^+$ e $CD8^+$, bem como na relação porcentual $CD4^+/CD8^+$ no timo, quando comparados aos animais do grupo controle.



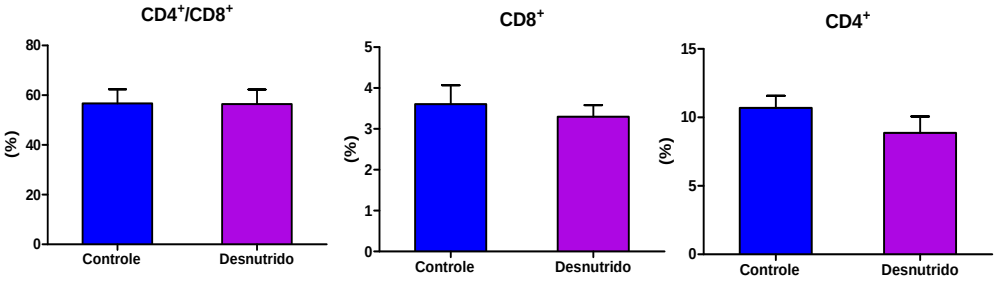


Figura 5. Estratégia de definição da janela de identificação para mensuração da quantificação de linfócitos T CD3/CD4/CD8 do células Timo. Inicialmente, foi feita uma janela de aquisição na região denominada $CD3^+$ e, por fim, foi delimitada uma janela de aquisição de quadrantes para identificar as subpopulações de linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+CD8^+$ e $CD4^-CD8^-$, respectivamente.

Gráfico 12. Resultado, em valores médios ± desvio padrão, das subpopulações de linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+CD8^+$ e $CD4^-CD8^-$ do baço de animais dos grupos **controle** (n=6) e **desnutrido** (n=6). O **n** representa o número de animais avaliados.

5.12. Avaliação da síntese *in vitro* de citocinas por células esplênicas

Nos resultados apresentados no gráfico 13, podemos observar que animais de ambos os grupos não apresentaram diferença na capacidade de produção de INF-γ.

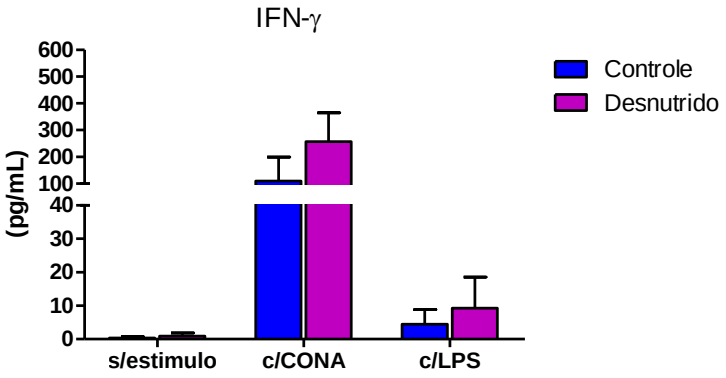
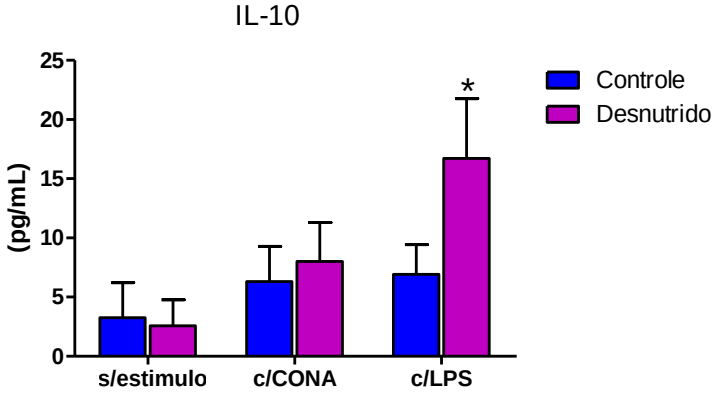


Gráfico 13. Resultado, em valores médios ± desvio padrão, da concentração de IFN-y produzidas por células esplênicas dos grupos **controle** (n=8) e **desnutrido** (n=8) * Valores significativos para p<0,05. **n** representa número de animais analisados.

Nos resultados apresentados no gráfico 14, podemos observar que animais do grupo desnutrido, quando estimulados com LPS, apresentaram maior capacidade de produção de IL-10, quando comparado com os respectivos animais do grupo controle.



Gráficos 14. Resultado, em valores médios ± desvio padrão, da concentração de IL-10 produzidas por células esplênicas dos grupos **controle** (n=8) e **desnutrido** (n=8) * Valores significativos para p<0,05. **n** representa número de animais analisados.

Nos resultados apresentados no gráfico 15, podemos observar que animais do grupo desnutrido, quando estimulados com ConA e LPS, apresentaram menor capacidade de produção de IL-2, quando comparados com os respectivos animais do grupo controle.

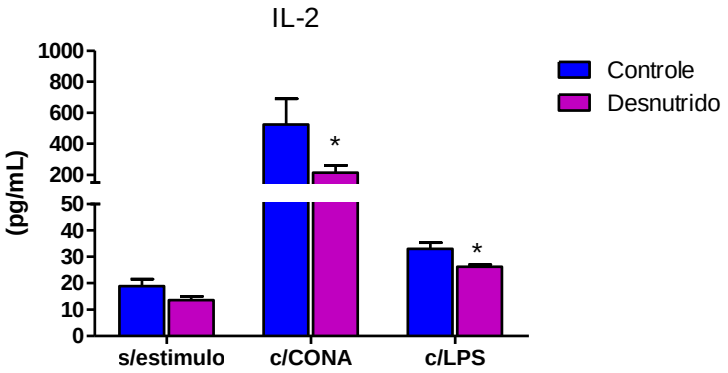


Gráfico 15. Resultado, em valores médios ± desvio padrão, da concentração de IL-2 produzidas por células esplênicas dos grupos **controle** (n=8) e **desnutrido** (n=8) * Valores significativos para p<0,05. **n** representa número de animais analisados.

5.13. Avaliação da expressão das STAT-1 e STAT-3

A avaliação da expressão STAT-1 total evidenciou que células esplênicas dos animais de ambos os grupos, mesmo estimuladas *in vitro*, durante 24 horas com 1,25 µg de LPS e 5µg/mL de ConA, não apresentaram diferença estatística.

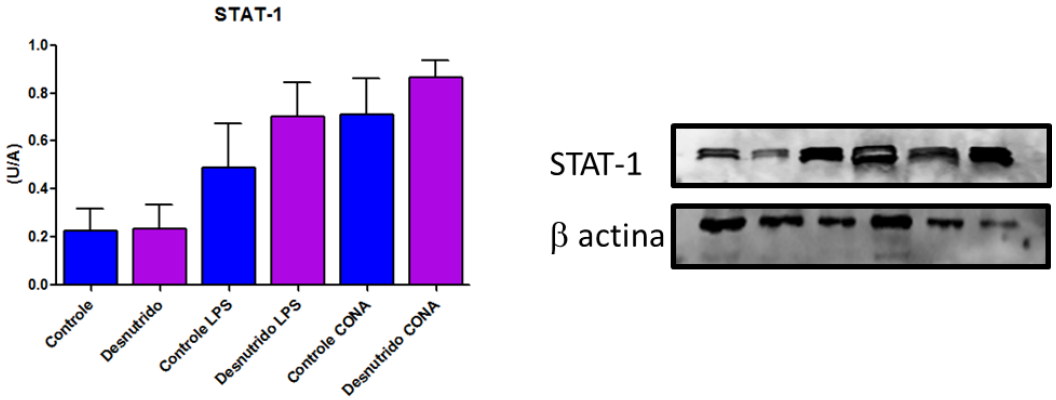


Gráfico 16. Resultado, em valores médio ± desvio padrão, da quantificação STAT-1 em células esplênicas de camundongos dos grupos **controle** (n=6) e **desnutrido** (n= 6) estimuladas, *in vitro*, durante 24 horas com 1,25 µg de LPS e 5µg/mL de ConA. **n** representa número de animais analisados.

A avaliação da expressão STAT- 1 fosforilada evidenciou que células esplênicas dos animais do grupo desnutrido, quando cultivadas e estimuladas *in vitro* durante 24 horas com 5µg/mL de ConA, apresentaram menor expressão de STAT-1p, quando comparado com o respectivo controle.

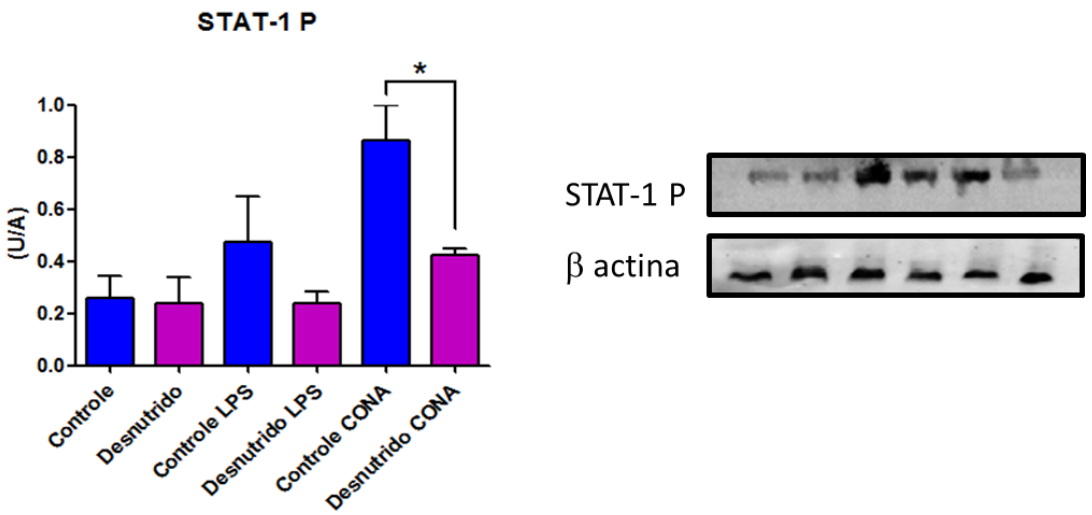


Gráfico 17. Resultado, em valores médios ± desvio padrão, da quantificação STAT-1 P em células esplênicas de camundongos dos grupos **controle** (n= 6) e **desnutrido** (n= 6) estimuladas, *in vitro*, durante 24 horas com 1,25 µg de LPS e 5µg/mL de ConA. * Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

A avaliação da expressão STAT-3 total evidenciou que células esplênicas dos animais do grupo desnutrido, quando cultivadas e estimuladas *in vitro* durante 24 horas com 1,25 µg de LPS, apresentaram maior expressão de STAT-3 total, quando comparado com o respectivo controle.

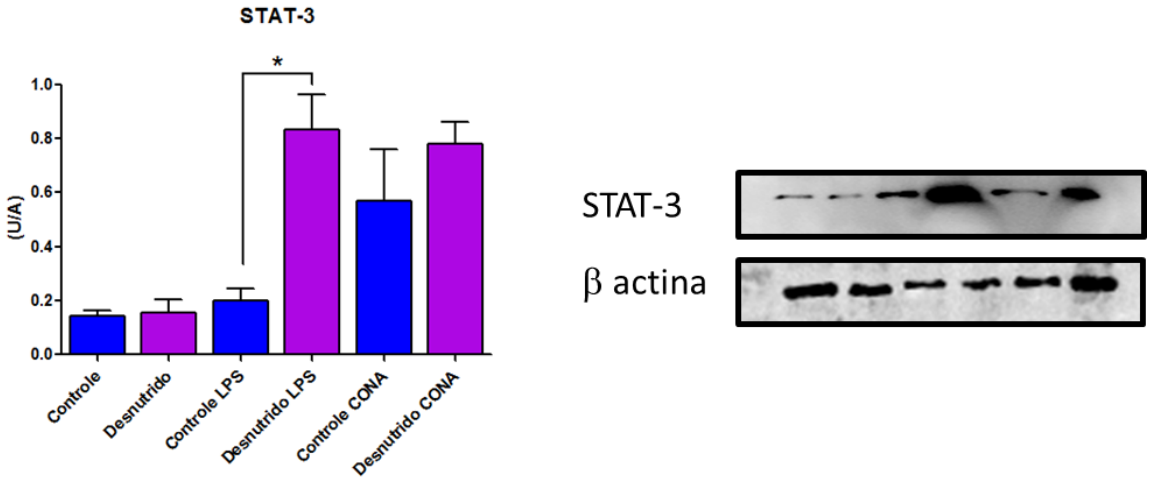


Gráfico 18. Resultado, em valores médios ± desvio padrão, da quantificação STAT-3 em células esplênicas de camundongos dos grupos **controle** (n= 6) e **desnutrido** (n= 6) estimuladas, *in vitro*, durante 24 horas com 1,25 µg de LPS e 5µg/mL de ConA. * Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

A avaliação da expressão STAT-3 fosforilada evidenciou que células esplênicas dos animais do grupo desnutrido, quando cultivadas e estimuladas *in vitro* durante 24 horas com 1,25 µg de LPS e 5µg/mL de ConA, apresentaram maior expressão de STAT-3p, quando comparado com o respectivo controle.

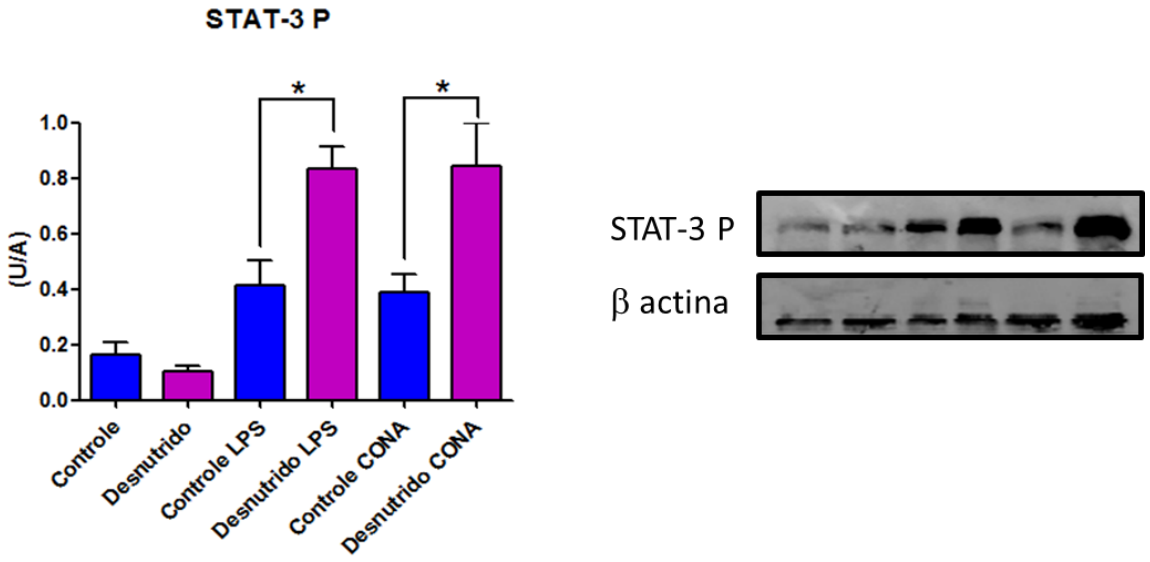


Gráfico 19. Resultado, em valores médio ± desvio padrão, da quantificação STAT-3 P em células esplênicas de camundongos dos grupos **controle** (n= 6) e **desnutrido** (n= 6) estimuladas, *in vitro*, durante 24 horas com 1,25 µg de LPS e 5µg/mL de ConA. * Valores significativos para p≤ 0,05. **n** representa o número de animais avaliados.

6. DISCUSSÃO

A desnutrição está presente em todo o mundo, com alta prevalência nos países em desenvolvimento (ORTIZ et al., 2001) e ainda constitui sério problema de saúde pública (MONTEIRO, 2003). Observações de caráter epidemiológico e experimental evidenciam que indivíduos desnutridos, especialmente crianças, apresentam maior susceptibilidade frente a processos infecciosos e índices mais elevados de morbidade e mortalidade (LESOURD, 1997).

A desnutrição proteica e a proteico-energética são as formas mais frequentes de desnutrição em pacientes hospitalizados, pacientes portadores de neoplasias ou de doenças crônicas, pacientes sob quimioterapia ou, ainda, indivíduos que fazem dietas radicais e indivíduos com distúrbios alimentares, como anorexia nervosa e bulimia (KEUSCH, 2003; GADDUCCI et al., 2001; WAITZBERG et al., 1999; MARCOS, 2000; BRUNDTLAND, 2000; AKNER et al., 2001; NOVA et al., 2002).

A interação desnutrição-infecção em seus múltiplos aspectos tem sido alvo de estudo nas últimas décadas, sendo considerada a principal causa da imunodeficiência (CHANDRA, 1997; KEUSH, 2003; KATONA, 2008). A literatura relata que, na desnutrição, ocorrem alterações significativas na imunidade, comprometendo principalmente a resposta T-dependente, a fagocitose, o sistema do complemento e a síntese de citocinas (PEDERSEN & BRUNSGARD, 1997; CHANDRA, 1980, CHANDRA & KUMARI, 1994).

Neste trabalho optamos pela indução de uma desnutrição proteica devido a sua elevada endemicidade em países em desenvolvimento. De fato, nas últimas décadas, muitos trabalhos foram realizados tentando compreender a inter-relação doença-desnutrição e, embora muito conhecimento tenha sido obtido, os mecanismos envolvidos em seu todo ainda estão por serem esclarecidos.

No modelo experimental utilizado em nosso laboratório, as rações foram elaboradas considerando os teores de vitaminas, ácidos graxos e sais minerais necessários para fornecer uma dieta adequada, restringindo-se apenas a quantidade de proteína da ração ofertada (ração hipoproteica – 2% de proteína) (REEVES et al., 1993). Na elaboração das rações, utilizamos caseína que é uma proteína de alto valor biológico. Em nosso estudo, os camundongos que receberam a dieta, *ad libitum*, deficiente em proteínas (ração hipoproteica, contendo 2% de proteínas), consumiram quantidade semelhante de ração em relação aos animais controles, porém apresentaram significativa perda de peso corpóreo, de aproximadamente 20% do peso inicial; esta perda, associada aos valores do hemograma e da concentração de proteínas totais, albumina e pré-albumina séricas, mostraram-se como bons indicadores na avaliação da desnutrição proteica.

Os órgãos hematopoiéticos têm capacidade de aumentar produção e acelerar a maturação de uma ou várias populações de células, como mecanismo de adaptação a condições fisiológicas ou patológicas. O tecido hematopoiético tem alta taxa de proliferação e renovação celular e, consequentemente, tem elevado consumo, o que o torna susceptível a alterações em condições de desnutrição.

Estudos realizados por Fried et al. (1978), sobre os efeitos da privação proteica em contagens sanguíneas periféricas, mostraram a redução do hematócrito e de plaquetas após 3 semanas de desnutrição, sendo que as contagens celulares totais diminuíam rapidamente logo após o início da desnutrição, indicando que os granulócitos e os linfócitos são afetados em camundongos com restrição proteica, dados esses também observados em nossos experimentos.

Dados da literatura, em relação à anemia e às alterações dos níveis de ferro, são contraditórios: em situações nas quais a falta de ferro tem sido considerada como a principal causa da anemia na desnutrição (RAMDATH, 1989), outros autores encontraram valores normais para concentração de ferro sérico, aumento da saturação de transferrina e concentrações de ferritina sérica não reduzidos – e a medula óssea apresentando depósitos de ferro normais ou elevados. Da mesma forma, biópsias de fígado, obtidas *post-mortem* de indivíduos com *marasmus*, apresentam valores elevados de ferro (WATERLOW, 1996).

Fondu et al. (1978), trabalhando com crianças do Zaire que apresentavam DPE, concluíram que a anemia era decorrente da redução na vida média dos eritrócitos, cuja população avaliada foi de 18 dias, sugerindo que o aumento da fragilidade dos eritrócitos era devido à redução de selênio e de vitamina E. Adicionalmente, os mesmos autores sugerem também como causas da anemia, na DPE, a adaptação do organismo à redução da necessidade de oxigênio e às infecções crônicas, frequentemente presentes. Dados de nosso laboratório evidenciam que a anemia encontrada em camundongos adultos experimentalmente desnutridos não é ferropriva e sim devido à diminuição nos

progenitores eritroides na medula óssea e que os mesmos são hiporresponsivos ao estímulo com eritropoetina (BORELLI et al., 2007).

Os primeiros relatos sobre leucopenia em desnutrição proteica devem-se a Aschkenasy (1957). Embora a resposta leucocitária seja variável, as evidências indicam que, em situações nas quais a desnutrição não esteja associada a outras doenças, a leucopenia é a regra (BORELLI et al., 2007; FOCK et al., 2007; 2010).

Dietas hipoproteicas ou com composição inadequada de aminoácidos têm efeito neutropênico (ASCHKENASY, 1966). A aparente dificuldade da resposta leucocitária em infecções bacterianas em DPE seria, segundo Suda et al. (1976), devido à redução no compartimento de reserva da medula óssea e não à dificuldade primária no processo de mobilização dos leucócitos do sangue para os tecidos (CHANDRA et al., 1975). Alterações hematológicas, como pancitopenia e hipoplasia medular, são justificadas por deficiência proteica no processo de renovação celular.

A linfopenia e a atrofia de tecidos linfoides são encontradas em desnutrição proteica e proteica-energética (CHANDRA, 1972; BORELLI et al., 1995). Bhuyan e Ramalingaswami (1974) mostraram que animais alimentados com dieta hipoproteica tiveram linfopenia e neutropenia, intensa atrofia no timo, moderada no baço e nos nódulos linfoides mesentéricos.

Hoje, sabemos que a nutrição é um determinante crítico da resposta imune, de maneira que a desnutrição é a causa mais comum da imunodeficiência em todo o mundo, estando associadas com o comprometimento significativo da imunidade

mediada por células, função fagocítica, sistema do complemento, concentração de imunoglobulina A e produção de citocinas (CHANDRA, 1997). Os mecanismos de defesa do organismo são dependentes de compostos proteicos e o estado nutricional é importante para uma ótima resposta imune, que requer a cooperação entre o sistema imune inespecífico e o específico (CHANDRA, 1991).

Nesse estudo, utilizou-se a citometria de fluxo para investigar o perfil fenotípico de células do baço de animais desnutridos, pois a literatura relata que, na desnutrição, tem-se atrofia de órgãos linfoides, diminuição de células *natural killer* (NK), além de alterações em subconjuntos de linfócitos T, principalmente nas células CD3+, CD4+ e CD8+ (NAJERA et al., 2004).

Ao compararmos a expressão das células NKT em nosso estudo, ficou demonstrado que, no grupo animais desnutridos, não há diferença estatística quando comparado com o grupo de animais controle. Porém, em um estudo realizado por Shen, et al. (2009), baseado em restrição alimentar e após um dia dessa privação, tanto as células NK como as NKT e sua citotoxicidade foram aumentados em comparação com a condição de camundongos normais. Estes resultados sugerem que o estresse induzido pela privação alimentar também tem potencial para aumentar as atividades funcionais da imunidade inata, especialmente pelas células NKT. As células T *natural killer* (NKT) representam um raro subtipo de linfócitos T e são consideradas como parte do sistema imune inato; são caracterizadas por expressar rearranjo do TCR e também expressam marcadores de células NK, o que as coloca na interface entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa (SANDBERG, 2003; MATSUDA, 2008; DIANA, 2009).

Todavia, não observamos diferenças entre os grupos experimentais para a expressão da célula NK, enquanto que Najera et al. (2004) observaram diminuição em células NK. Devemos considerar, contudo, que em nosso estudo houve apenas restrição de proteínas na ração ofertada. As células NK são conhecidas como as principais efetoras na imunidade inata, cuja função é combater células neoplásicas e infectadas por patógenos intracelulares. Elas também desempenham importante papel na modulação da resposta imune celular adaptativa, através da liberação de INF-y (MARTIN-FONTECHA et al., 2004). Atualmente, as funções conhecidas das células NK incluem regulação da inflamação e das respostas imunes adaptativas (VIVIER et al., 2008).

Estudo realizado por Barbess (1993) mostra que, em crianças com *marasmus*, a distribuição de linfócito B é normal, não apresentando alterações no número e na distribuição. No atual trabalho, também demonstramos que a população de células B esplênicas, em ambos os grupos experimentais, apresentava a mesma porcentagem de células expressando CD19.

Os estudos existentes na literatura sobre a resposta humoral em desnutrição são conflitantes, não permitindo conclusões definitivas (WATERLOW, 1996). Estudos realizados por Rikimaru et al. (1998) mostram que os níveis de imunoglobulinas não estão afetados em crianças com desnutrição moderada. Porém, outro estudo relata que o nível de IgM e IgG no soro de crianças desnutridas foi menor quando comparado com crianças bem nutridas (CRIPPS et al., 2008).

A partir desses dados, avaliamos os níveis de imunoglobulinas séricos G e M e não observamos diferenças estatísticas entre animais dos grupos controle e desnutrido.

Entretanto, quando os animais foram estimulados *in vivo* com LPS, observamos que animais do grupo desnutrido apresentaram menor capacidade de síntese de IgM, quando comparados com animais controles, também estimulados com LPS. Em relação à dosagem de IgG, não observamos diferenças estatísticas. Dados descritos por McMurray et al. (1981) mostram que os níveis de IgM estão diminuídos, enquanto os de Neumann et al. (1975) e Sirisinha et al. (1976) mostraram que os níveis IgG no soro não foram afetados pela desnutrição .

De acordo com Bith et al. (1996), em camundongos, nos quais as linhagens T e B se apresentavam alteradas, mostravam-se deficientes em CD45, apresentando bloqueio no desenvolvimento e na função de células dessas linhagens. Estudos de Tchilian et al. (2001), com camundongos, mostraram que mutações em CD45 modificam a função imune, sugerindo que anormalidades na sua expressão sejam a possível causa da síndrome de imunodeficiência adquirida. O antígeno CD45 é uma proteína transmembrana com função de tirosina fosfatase, expresso em todas as células nucleadas hematopoiéticas e requerido para vias de sinalização e mecanismos transducionais. Dados apresentados por esse trabalho mostram que, em camundongos desnutridos, há diminuição na expressão de CD45 quando comparado com o grupo controle.

Em estudos anteriores (BORELLI et al., 2007; FOCK et al., 2007; 2010), nosso grupo constatou hipoplasia medular e esplênica especialmente importante no setor mieloide. Nesse trabalho, verificamos hipoplasia esplênica, com diminuição no número total de linfócitos no baço de animais desnutridos, porém, com porcentagem aumentada para $CD3^+$ e $CD4^+$, mantendo-se normal para $CD8^+$. Em decorrência da atrofia do baço,

tanto a estrutura quanto a função deste órgão são prejudicadas e, consequentemente, a resposta de células T é reduzida. O grupo de pesquisa de González (1997) observou que os linfócitos obtidos de crianças desnutridas eram incapazes de secretar quantidades normais de citocinas e propuseram que a fisiologia alterada de linfócitos pode ser a causa predominante da disfunção imune observada nessas crianças.

Para alguns autores, a diminuição no tamanho do timo e dos órgãos linfoides periféricos, verificada no *kwashiorkor*, interferiria na imunidade celular, mediada pelos linfócitos T (derivados do timo). Assim, ocorreria diminuição no número destes linfócitos e desproporção entre os linfócitos T auxiliares, os T supressores e os citotóxicos, alterando suas funções (KEUSH, 2003). Em nossos resultados, verificamos que animais desnutridos apresentaram diminuição na celularidade tímica; porém, sem diferença na porcentagem de subtipos de linfócito, quando comparado com animais controle. A alteração ocorrida no timo está associada à sua atrofia, situação na qual temos redução no número de células presentes neste órgão, que, em parte, é causada pela depleção por apoptose (SAVINO et al., 2002; RODRIGUES et al, 2011)). Além disso, vários estudos indicam que a desnutrição diminui a função das células T, a síntese de citocinas e a capacidade dos linfócitos de responder adequadamente às citocinas (RODRÍGUES et al., 2005). Tanto a resposta imune celular quanto a resposta imune humoral são diretamente afetadas em situações de desnutrição proteica (McMURRAY, 1981; NAJERA et al., 2004), sendo um importante fator relacionado ao aumento de susceptibilidade às infecções (CHANDRA, 1991; RODRÍGUES et al., 2005).

Em estudos anteriores (FOCK et al., 2007; LIMA et al., 2012), nosso grupo demonstrou alteração na capacidade de síntese de citocinas em modelo de desnutrição.

Nesse trabalho, avaliamos a capacidade de proliferação de células obtidas do baço, quando estimuladas com LPS e ConA, e constatamos que em células esplênica a síntese de IFN-y foi similar em ambos os grupos. Porém, a produção de IL-2 está diminuída no grupo desnutrido e a de IL-10 está aumentada quando estimulada por LPS. Segundo Rodrígues (2005), crianças desnutridas apresentam diminuição da produção de citocinas tipo I (INF-y e IL-2) e aumento na produção de citocinas tipo 2 (IL-4 e IL-10).

A diminuição na produção de IL-2, pelas células $CD4^+$ e $CD8^+$ em crianças desnutridas, pode ser um importante fator relacionado ao aumento de susceptibilidade a infecções (CHANDRA, 1991; RODRÍGUES et al., 2005). Essa redução pode ser devida à diminuição do número das células de memória CD45RO+ e/ou à capacidade reduzida dessas células em produzir essa citocina (NAJERA et al., 2001; RODRÍGUES et al., 2005). Além disso, o aumento de IL-10 é evidente em crianças desnutridas, o que tem efeito direto sobre as células T CD4+ (RODRIGUES et al, 2011). Portanto, a IL-10 pode ser um importante fator de imunossupressão relacionada com a diminuição da resposta imune em crianças desnutridas (RODRÍGUES et al., 2005; 2007). Essas alterações podem contribuir para a redução da capacidade imunológica e para o aumento da sensibilidade a infecções associadas à desnutrição.

Dados publicados por Ortiz (1984) demonstraram existir relação entre a carência proteica e a redução da proliferação. No presente estudo, verificamos diminuição na proliferação celular esplênica quando estimuladas com concanavalina (Cona) ou lipopolissacarídeo (LPS) em animais desnutridos; também observamos, nas células esplênicas de animais desnutridos, maior porcentagem de células nas fases G0/G1 do ciclo celular. Os resultados obtidos evidenciam o efeito imunoestimulador, dos

mitógenos presentes, sobre a proliferação de células esplênica de animais grupo controle, porém diminuído em animais desnutridos. Observando cortes histológicos do baço de animais desnutridos, verificamos hipoplasia esplênica significativa, quando comparado com os animais do grupo controle, e atrofia do baço desses animais, mostrando, assim, o efeito da desnutrição em órgãos linfoides secundários.

A decisão crucial entre a sobrevivência das células ou a apoptose é a base fundamental dos processos fisiológicos e patológicos – e é frequentemente o resultado de um delicado equilíbrio entre as citocinas e os fatores de crescimento com funções opostas. Na maioria dos tipos celulares, fatores transcricionais, como STAT-1 e STAT-3, desempenham papéis opostos na direção celular para a proliferação ou a morte celular por apoptose. As STATs são fatores de transcrição envolvidos em vias de sinalização e têm sido implicadas numa variedade de funções imunes, como síntese de diferentes citocinas e fatores de crescimento (REGIS et al., 2008).

Nossos resultados demonstraram que células esplênicas de camundongos desnutridos não apresentaram alteração na expressão de STATs dos tipos 1 e 3 quando comparadas com células dos animais controles. Entretanto, em células esplênicas de animais desnutridos estimulados com LPS, observamos aumento da expressão de STAT-3. Possivelmente, o aumento da expressão de STAT-3 está correlacionado com o aumento de produção de IL-10, o que pode contribuir para os quadros de imunodeficiência, comumente observado em situações de desnutrição (FOCK et al., 2008). A IL-10 é uma citocina com efeito pleiotrófico na imunorregulação e na inflamação, produzido primariamente por monócitos e, posteriormente, por linfócitos. Ela inibe a regulação da expressão de citocinas do tipo Th1, antígenos do MHC classe II

e moléculas co-estimulatórias em macrófagos e em linfócitos B; além disso, a IL-10 eleva a sobrevida, a proliferação e a produção de anticorpos (GRIMBALDESTON et al., 2007; KINDT et al., 2008). A STAT-3 é um fator de transcrição essencial na via de sinalização de IL-10 e possui importante papel na sinalização da resposta anti-inflamatória (AKIRA, 1999; 2003).

Porém, quando estimulamos as células esplênicas com ConA, observamos diminuição de p-STAT-1 e aumento de p-STAT-3. Esse fato pode ser explicado, em parte, porque a ativação de STAT-1 e STAT-3 na desnutrição está reciprocamente regulada. Estudos têm demonstrado que receptores de citocinas e fatores de crescimento para STAT-3 neutralizam a inflamação e promovem a sobrevivência celular e a tolerância imunológica, enquanto que STAT-1 favorece as respostas imunes inatas e adaptativas, também podendo apresentar perfil apoptótico e anti-inflamatório (REGIS et al., 2008). O mecanismo, contudo, pelo qual os níveis de alteração da STAT-1 ou da STAT-3 podem influenciar reciprocamente a sua ativação, ainda deverá ser uma questão de estudos em estado de desnutrição.

Trabalhos realizados nos últimos 25 anos têm confirmado que a imunodeficiência é um fator crítico em desnutrição associada com infecções. Esse conceito aplica-se não apenas a crianças jovens em países desenvolvidos, mas também em todas as faixas etárias de toda a população mundial, incluindo idosos, pessoas com transtorno alimentar ou aquelas com uma variedade de doenças primárias debilitantes (CHANDRA, 1997). Os estudos também confirmam que a desnutrição modifica os mecanismos de defesa do organismo, alterando a hematopoese e prejudicando a homeostase, modificando a resposta imune específica e não específica, incluindo a

resposta inflamatória (BORELLI et al., 2004). É aceito atualmente que a nutrição é um determinante importante da resposta imune. Dados clínicos e epidemiológicos sugerem que deficiências nutricionais alteram a imunocompetência e aumentam o risco de infecção (CHANDRA, 1997).

7. CONCLUSÃO

No presente trabalho, observamos que animais desnutridos apresentam comprometimento da hemopoese, evidenciada pela hipocelulariedade medular e esplênica, bem como comprometimento imunológico, com redução da capacidade proliferativa de linfócitos, aumento da produção de IL-10 e diminuição de IL-2, com alteração da expressão de fatores transcricionais, como STAT-1 e STAT-3.

Pensamos que o desequilíbrio global dos componentes adaptativo e humoral apresentado pelos indivíduos com desnutrição possa levar ao comprometimento desses múltiplos mecanismos imunorreguladores, contribuindo para o estado clínico de perda da função imune. Contudo, estudos estruturais mais detalhados em relação às alterações decorrente da desnutrição em células imunocompetentes e suas respectivas vias de sinalizações são necessários para a confirmação dos dados aqui apresentados.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Revinter; 2005. p. 235-67.

AUGUSTO, A.P. Terapia Nutricional. São Paulo: Atheneu. P. 28-35, 1995.

AKIRA, S.; UEMATSU, S. & TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. Cambridge**,** v.124, p.783.801, feb. 2006.

AKIRA, S. Functional Roles of STAT Family Proteins: Lessons from Knockout Mice. STEM CELLS 1999; 17:138-146.

AKNER, G. Treatment of protein-energy malnutrition in chronic nonmalignant disorders. Am. J. Clin. Nutr., 74:6-24, 2001.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; ROBERTS, K.; WALTER, A. Biologia Molecular da Célula, 4o ed, Brasil: São Paulo; 2004.

ALVES, D.C. Desnutrição: Terapia nutricional. Ed. Atheneu, p. 220-229. 1995.

ARONSO, D. S.; HORVATH, C. M. A road map for those who don`t know JAK-STAT. Science, Nova York, v. 296, p.1653-1655. 2002.

ASCHKENASY, A. Effect of a protein-free diet on lumph node and spleen cell response in vitro to blastogenic stimulantes. Nature, London, v. 254, p. 63-5, 1975.

ASCHKENASY, A. Effects of different amino acid mixtures on the regeneration of leukocytes in protein deficient rats. I. Neutrophils and eosinophils C R Seances Soc. Biol. Fil. v. 160, p. 933-7, 1966b.

ASCHKENASY, A. On the pathogenesis of anemia and leukopenias induced by dietary protein deficiency. Am. J. Clin. Nutr. v.5, p.14-25, 1957.

ASHRAF, M. T.; KHAN, R. Mitogenic lectins. Medical Science Monitor. 2003; 265-269.

BARON, R. B. Desnutrição protéico-calórica. In: BENNETT, J. C. & PLUM, F. CECIL tratado de medicina interna, 20ª ed, Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, v. 1, p. 1273-1277, 1997.

BELL, R.G.; HAZELL, L.A.; SHERIDAN, J.W. The influence of dietary protein deficiency on hemopoietic cells in the mouse. Cell tissue Kinet. V.9, p.305-12, 1976.

BENDICH, A. & CHANDRA, R. K. (eds.) Micronutrients and Immune Functions, New York Academy of Sciences, New York, NY. 1990.

BITH, K. F.; CONROY, L. A.; HOWLETT, S.; SMITH, A. J.; MAY, J.; ALEXANDER, D. R.; HOLMER, N. CD45- null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD 45 in early thymocyte development, in the selection of $CD4^+$ $CD8^+$ thymocytes, and B cell maturation. J. Exp. Med., New York, v. 183, p. 1707-18, 1996.

BORELLI, P.; BARROS, F.E.V.; NAKAJIMA, K.; BLATT, S. L.; BEUTLER, B.; PEREIRA, J.; TSUJITA, M.; FAVERO, G. M.; FOCK, R. A. Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. Braz. J. Med. Biol. Res., vol. 42, p. 523-530, 2009.

BORELLI, P.; BLATT, S.; PEREIRA, J.; MAURINO, B. B.; TSUJITA, M.; SOUZA, A. C.; XAVIER, J. G.; FOCK, R. A. Reduction of erythroid progenitors in protein energy malnutrition. Brit. J. Nutr. 97: 307-314, 2007.

BORELLI, P.; MARIANO, M.; BOROJEVIC, R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. Nutrition Research, N.Y. v15 10:1477-85, 1995.

BRIASSOULIS, G.; ZAVRAS, N.; HATZIS, T. Malnutrition, Nutrition índices, and early enteral feeding in critically III children. Nutrition 17:548-57, 2001.

BROTOFFID, J.; SEADDING, G. K.; MALE, D.; ROITT, I. M. Clinical Immunology. Gower Medical Publishing, London, 1991.

BRUNDTLAND, G. H. Nutrition and infection: malnutrition and mortality in public health. Nutr. Rev., 58: S1-S4, 2000.

CAVAILLON, J. M. Pro-versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), v. 47, n. 4, p. 695-702. 2001.

CHANDRA, R. K.; NU WATSON, R. R. (ed.). Nutrition, Disease Resistance, and Immune Function. Marcel Dekker, New York, NY. 1984.

CHANDRA, R. K. & Newberne, P. M. Nutrition, Immunity and Infection; Mechanisms of Interactions. Plenum Press, New York, NY. 1977.

CHANDRA, R. K. Immunocompetence in undernutrition. J. Pediatr. 81: 1194-1200. This week's citation classic. Current Contents 30: 15. 1972.

CHANDRA, R. K. Reduced secretory antibody response to live attenuated measles and poliovirus vaccines in malnourished children. Br. Med. J. 2: 583-585. 1975.

CHANDRA, R. K. Serum complement and immunoconglutinin in malnutrition. Arch. Dis. Child. 50: 225-228. 1975.

CHANDRA, R. K. Nutrition, immunity and infection. Present knowledge and future directions. Lancet I: 688-691. 1983.

CHANDRA, R. K. Heath Clarke Lecture. Immune responses in undernutrition and overnutrition. Basic considerations and applied significance. Nutrition 5: 297-302. 1989.

CHANDRA, R. K. Nutritional regulation of immunity and risk of infection in old age. Immunology 67: 141-147. 1989.

CHANDRA, R. K. Nutrition and Immunology. Lessons from the past and visions of the future. Am. J. Clin. Nutr. 53: 1087-1101. 1991.

CHANDRA, R. K. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. Am. J. Clin. Nutr., 54:1087–104, 1991.

CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system: an introduction. Am. J. Clin. Nutr. [S.l.] v. 66, n. 2, p. 460S-463S, 1997.

CHANDRA, R. K.; Baker, M.; Whang, S. & AU, B. (1991). Effect of two feeding formulas on immune responses and mortality in mice challenged with Listeiia monocytogenes. Immunol. Lett. 27: 45-48.

CHANDRA, R. K. Golan memorial lecture. Nutritional regulation of immunity and infection: from epidemiology to phenomenology to clinical practice (1986). J. Pediatr Gastroenterol. Nutr 5:844-52.

CHANDRA, R. K. Immunocompetence in undernutrition and overnutrition. Nutr Rev New York) 1991; 39(6): 225.

CHANDRA, R. K. Nutrional regulation of immunity: an introduction. Nutrition and immunology. Alan R Liss, Inc, 1988. p. 1-8.

CHOW, J. W.; FINE, M. J.; SHALES, D. M.; QUINN, J. P.; HOOPER, D. C.; JOHNSON, M. P. Enterobacter bacteremia: Clinical features and emergence of antibiotic resistence during theraphy. Ann.Interm.Med., v.115, p. 585-90, 1991.

COLOMBO, J. P; CERVANTES, H.; KOKOROVIC, M.; PFIATER, U.; PERRITAZ, R. Effects of dietary protein on the distribuition of amino acid in plasma, liver and brain in the rat. Ann Nutr Metabol 1992; 36: 23-33.

CRIPPS, A. W.; OTCZYK, D. C.; BARKER, J.; LEHMANN, D.; ALPERS, M. P. The relationship between undernutrition and humoral immune status in children with pneumonia in Papua New Guinea. PNG Med. J. , 51, 120-130. 2008.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; McNEELEY, D. F.; MOON, A. Mechanism of nutrient modulation of the immune response. Journal Allergy Clinical Immunology. v. 115, p. 1119-1128, 2005.

DA SILVA LIMA, F.; ROGERO, M. M.; RAMOS, M. C.; BORELLI, P.; FOCK, R. A. Modulation of the nuclear factor-kappa B (NF-κB) signalling pathway by glutamine in peritoneal macrophages of a murine model of protein malnutrition. Eur J Nutr. Aug 26. 2012.

DACIE, J. V.; LEWIS, S.M. Practical haematology. 8ºed., Churchill livingstone. P.57-8, 1995.

DARNELL, J. E. Jr; KERR, I. M.; STARK, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science 1994; 264:1415-1421.

DARNELL, J. E. STATs and gene regulation. Science, 1997; 277:1630-1635.

DARNELL, J. E.; KERR, I. M.; STARK, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science 1994; 264:1415-1421.

DE ANGELIS, R. C. Fisiologia da nutrição. 3ª ed., Editora Nobel, v. 2, p.38-56, 1986.

DIANA, J.; LEHUEN, A. NKT cells: friend or foe during viral infections ?.Eur J Immunol. 39(12). 3283-91, 2009

DOUMAS, B. T.; WATSON, W. A.; BIGGS, H. G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green. Clin Chim Acta 1971; 31(1): 87-96.

DURBIN, J. E.; HACKENMILLER, R.; SIMON, M. C. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. Cell 1996; 84:443-450.

FLETCHER, M. A. et al. Lymphocyte Proliferation. In: Rose, N. R. et al. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 5.ed. Cidade, ASM Press, 1997, p.313-319.

FOCK, R. A.; SILVA, O. P. P. S.; BORELLI, P. Desnutrição protéica modifica a síntese de óxido nítrico em macrófagos, Rev. Bras. Ciên. Farm. v. 39, supl. 3, p.115, 2003.

FOCK R. A.; ROGERO M. M.; VINOLO, M. A. R.; CURI, V. R.; BORGES, M. C.; BORELLI, P. Effects of Protein-Energy Malnutrition on NF-KappaB Signalling in Murine Peritoneal Macrophages; Inflammation, Vol. 33, No. 2, April 2010.

FOCK R. A.; VINOLO M. A. R.; CRISMA, A. R.; NAKAJIMA, K.; ROGERO, M. M.; BORELLI, P. Prorein-energy malnutrition modifies the production of interleukin 10 in response to lipopolysaccharide (LPS) in a murine model. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 54(5):371-7. 2008.

FOCK, R. A.; VINOLO, M. A. R.; SÁ ROCHA, V. M.; 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-α in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. Cytokine, Cytokine. 40 :105-14, 2007.

FOCK, R. A.; ROGERO, M. M.; VINOLO, M. A. R.; CURI, R.; BORGES; M. C.; BORELLI, P. Effects of Protein-energy malnutrition on NF-KappaB signaling in murine peritoneal macrophages. Inflamation. vol. 33, n.2, April, 2010.

FONDU, P.; HARIGA-MULLER, C.; MOZES, N.; NEVE, J.; VAN STEIRTEGHEM, A.; MANDELBOWN, I. M. Protein-energy malnutrition and anemia in kivi. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v.31, p.46-56, 1978.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Global hunger declining, but still unacceptably high. International hunger targets difficult to reach. Economic and social development department. September, 2010. accessed : 25/02/2012.

FRIED, E; SHAPIRO, S; BARONI, J; ANAGNASTOU, A. Effect of protein deprivation on hematopoetic stem cells and on a peripheral blood counts. J Lab Clin Med 1978; 92(2): 303-10.

GADDUCCI, A.; COSIO, S.; FANUCCHI, A. & GENAZZANI, A. R. Malnutrition and caquexia in ovarian cancer patients: pathophysiology and management. Anticancer Res., 21: 2941-7, 2001.

Garcia, P. B. Inflamação em camundongos submetidos à desnutrição protéica: análise da mobilização celular e da hematopoese. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1992.

GRIMBLE, R. F. Interaction between nutrients, pro-inflamatory cytokines and inflammation. Clin.Sci. v.91, p. 121-30, 1996.

GRIMBLE, R. F. Nutritional modulation of cytokine biology. Nutrition. v.14, p. 634-40, 1998.

GROSS, R. L.; NEWBERNE, M. P. Role of nutrition in immunologic function. Physiol. Rev. [S.l.] n.60, p.188–302, 1980.

GROSS, R. L.; NEWBERNE, M. P. Role of nutrition in immunologic function. Physiol Rev 1980; 60: 188-202.

GUMY, A.; LOUIS, J.A.; LAUNOIS, P. The murine model of infection with Leishmania major and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. Int. J. Parasitol ; 34:433-44. 2004.

HA, C-L.; WONG, S. S. L.; GRAY, M. M.; WATT, J.; HILLYER, L. M.; WOODWARD, B. D. Overabundance of CD45RA+ (quiescent-phenotype) cells within the involuted CD4+ T-cell population follows initiation of immune depression in energydeficient weanling mice and reflects involution exclusive to the CD45RA- subset. J Nutr 2001; 131:1812-1818.

HAURA, EB.; TURKSON, J.; JOVE, R. Mechanisms of disease: insights into the emerging role of the signal transducers and activators of transcription in cancer. Nature 2005;2 (6): 315-24.

HARLOW, M. B.; LANE, D. In: Antibody. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 726 p, 1988.

HASEGAWA, M.; FUJIMOTO, M. C.; POL, J.; STEEBER, D. A.; LOWELL, C. A.; TEDDER, T. F. A CD19- dependent signaling pathway regulates autoimmunity in lyn-deficient mice. J.Immunol., Bethesda, v.7, p. 2469-78, 2001.

HILTON, D. J, RICHARDSON, R. T.; ALEXANDER, W. S.; VINEY, E. M; WILLSON, T. A.; SPRING, N. S. et al. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 114-9.

HISHIHARA, K.; PENNINGER, J.; WALLACE, V. A.; KUNDIG, T. M.; WAKEHAM, A.; TIMMS, E.; PFEFFER, K.; OHASHI, P. S.; THOMAS, M. L. Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45 – exon 6 protein tyrosine phosphatase deficient mice. Cell, New York, v.74, n.1, p. 143-56, 1993.

HOFFMAN-GOETZ, L.; MCFARLANE, D. M.; BISTRIAN, B. R.; BLACKBURN, G. L. Febrile and plasma iron response of rabbits infected with endogenous pyrogen from malnourished patients. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v.34, p. 1109-15, 1981.

HUANG, L. Z.; FRAKER, P. J. Chonical consumption of a moderately low protein diet does not alter hematopoietic processes in young adult mices. J. Nutr. 133:1403-1408. 2003.

IHLE, J. N. STATs: signal transducers and activators of transcription. Cell, 84:331-334, 1996.

IICA – Instituto Interamericano de Cooperação para Agricultura. Cai desnutrição infantil no semi-árido do país. Notícias, 28/04/2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ed. São Paulo: 1985. 332p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa de orçamento familiar 2008-2009 (POF). Desnutrição cai e peso das crianças brasileiras ultrapassa padrão internacional. Comunicação social 27/08/2010.

JIAO, H.; BERRADA, K.; YANG, W.; TABRIZI, M.; PLATANIAS, L. C.; YI, T. Direct association with and dephosphorylation of Jack2 Kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. Mol Cell Biol 1996; 16: 6985-92.

JOOSTEN, K.F.; HULST, J.M. Malnutrition in pediatric hospital patients: Current issues Nutrition, v.2, p. 133-137, 2010.

KADOWAKI, N.; ANTONENKO, S.; LAU, J. Y. N.; LIU, Y. J. Natural interferon α/β producing cells link innate and adaptive immunity. Journal Experimental Medical 2000; 192:219-225.

KATONA, P.; KATONA-APTE, J. The interaction between nutrition and infection. Clinical Practice, v. 46, p. 1582-1588, 2008.

KEUSCH, G. T.; FARTHING, M. J. G. Nutrition and infection. Ann. Ver. Nutr., Palo Alto, 6:131-54, 1986.

KEUSCH, G. T. History of nutrition: malnutrition, infection and immunity. J Nutr 2003; 133: 336S-40S.

KINDT, T. J.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNEA, B. A. Imunologia de Kuby. 6ª ed.: Bookman, 2008.

KREBS, D. L.; UREN, R. T.; METCALF, D.; RAKAR, S.; ZHANG, J. G.; STARR, R. et al. SOCS-6 binds to insulin receptor substrate 4, and mice lacking the SOCS-6 gene exhibit mild growth retardation. Mol Cell Biol 2002; 22: 4567-78.

LAMUS, E. R. Desnutrition e infecciones. Importancia en la salud publica. Arch. Venez. Pueric. Ped., 41: 75-93, Caracas, 1975.

LANDGRAF, M. A.; TOSTES, R. D. E. C.; BORELLI, P.; ZORN, T. M.; NIGRO, D.; CARVALHO, M. H.; FORTES, Z. B. Mechanisms involved in the reduced leukocyte migration in intrauterine undernourishment. Nutrition. Feb; 23(2):145-56. Epub 2006 Dec 5, 2007.

LEE, G. R. & HERBERT, V. Nutritional factors in the production and function of erythrocytes. In: LEE, G. R. Wintrobe's clinical hematology; 10ª. ed; Williams & Wilkins; v.1, p. 228-266, 1999.

LEE, S.; CHAI, M.; KIM, Y.; SHIN, C. Nosocomial infection of malnourished patients in an intensive lavre unit. Yonsei. Medical Journals, v. 44, p. 203-209, 2003.

LEE, W. H.; WOODWARD, B. D. The CD4/CD8 ratio in the blood does not reflect the response of this index in secondary lymphoid organs of wealing mice in models of protein-energy malnutrition known to depress thymus-dependent immunity. J Nutr 1996; 126:849.

LESOURD, B. M. Nutriton and immunity in the elderly: modification of immune responses with nutritional treatments. Am. J. Clin. Nutr., v.66, suppl. 2, p. 478-84, 1997.

LIU, B.; LIAO, J.; RAO, X.; KUSHNER, S. A; CHUNG, C. D.; CHANG, D. D. et al. Inhibition of Stat-1-mediated gene activation by PIAS 1. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 10626-31.

LOPEZ, M.; ROUX, M. Impaired differentiation of IgA-B cell precursor in the Peyer's patches in protein depleted rats. Dev Comp Immunol 1989; 13:253

MAJETI, R.; XU, Z.; PARSLOW, T. G.; OLSON, J. L.; DAIKH, D. L.; KILEEN, N.; WEISS, A. An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lumphoproliferation and autoimmunity. Cell, New York, v.103, p.1059-70, 2000.

MALMGAARD, L. Induction and regulation of IFNs during viral infections. J. Interferon Cytokine Res., 24, 439.454. 2004.

MANHART, N. Influence of short-term protein malnutrition of mice on the phenotype and costimulatory signals of lymphocytes from spleen and Peyer's patches. Nutrition. 2000 Mar; 16(3):197-201.

MARCOS, A. Eating disorders: a situation of malnutrition with peculiar changes in the immune system. Eur. J. Clin. Nutr., 54: S61-S64, 2000.

MARCOS, A. Eating disorders: a situation of malnutrition with peculiar changes in the immune system. Eur. J. Clin. Nutr., 54: S61-S64, 2000.

MARTIN-FONTECHA, A.; THOMSEN, L. L.; BRETT, S.; GERARD, C. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. Nat. Immunol 5, 1260-1265. 2004.

MARTINS, G. L. et al., Padrões hematológicos em grupos de população da zona da mata de Pernambuco. Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.; São Paulo; v. 4 n. 4; 1971

MATSUDA, J. L.; NAIDENKO, V.O. Tracking the response of natural killer cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. Exp.Med. 192 (5) 741-54. 2000.

MCMURRAY, D. N.; LOOMIS, S. A.; CASAZZA, L. J.; REY, H.; MIRANDA, R. Development of impaired cell-mediate dimmunity in mild and moderate malnutrition. Am JClin Nutr 1981; 34:68-77.

MCMURRAY, D. N.; WATSON, R. R.; REYES, M. A. Effect of renutrition on humoral and cell-mediated immunity in severely malnourished children. Am J Clin Nutr 1981; 34:2117-2126.

MERAZ, M. A.; WHITE, J. M.; SHEEHAN, K. C. F. Targeted disruption of Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK STAT signaling pathway. Cell 1996; 84:431-442.

MONTEIRO, C. A. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. Estudos Avançados. 48, p. 7-20, 2003.

MONTEIRO, C.A.; BENICIO, M.H.; KONNO, S.C.; SILVA, A.C.F.; CONDE, W.L. Causas do declínio da desnutrição infantil no Brasil 1996-2007. Revista de Saúde Pública, v. 43, p. 35-43, 2009.

MICHEU, O; HAMMANN, A; SOLARY, E. STAT-1 independent upregulation of FADD and procaspase-3 and 8 in câncer cells treated with cytotoxic drugs. Biochem Biophys Res Commun; 256(3): 603-7. 1999

NAAJERA, O. CD45RA and CD45RO isoforms in infected malnourished and infected well-nourished children. Clin Exp Immunol 2001; 126:461±465

NAHANI, J.; NIK-AEEN, A.; RAFII, M.; MOHAGHEGHPOUR, N. Effect of malnutrition on several parameters of the immune system of children. Nutr Metab 1976;20:302-306

NAJERA, G.C., TOLEDO, G.; LOPEZ, L. CD45RA and CD45RO isoforms in infected malnourished and infected children and nutridas.Exp Clin Immunol 126:. 461-465. 2001.

NAJERA, G. C.; TOLEDO, G.; LOPEZ, L.; ORTIZ, R. Flow Cytometry Study of Lymphocyte Well-Nourished Children with Bacterial Subsets in Malnourished and Infections, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004, 11(3):577. DOI: 10.1128/CDLI.11.3.577-580.2004.

NEUMANN, C. G.; LAWLOR, G. J.; STIEHM, E. R.; SWENSEID, M. E.; NEWTON, C.; HEBERT, J.; AMMANN, A. J.; JACOB, M. Immunologic responses in malnourished children. Am J Clin Nutr 1975; 28:89-104.

NOVA, E.; SAMARTÍN, S.; GÓMEZ, S.; MORANDÉ, G. & MARCOS, A. The adaptive response of the immune system to the particular malnutrition of eating disorders. Eur. J. Clin. Nutr., 56: S34-S37, 2002.nutrition. Lancet II: 939-944.

ONIS, M.; MONTEIRO, C.; AKRE, J.; CLUGSTON, G. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO Global Database on Child Growth (1993) Bulletin of the World Health Organization;71:703-12.

OPAL, S. M.; ESMON, C. T. Bench-to-beside review: Functional relationships between coagulation and the immune response and their respective roles in the pathogenesis os sepsis. Critical Care. v.7, p.23-38, 2003.

ORTIZ, R.; BETANCOURT, M. Cell proliferation in bone marrow cells of severely malnourished animals. J.Nutr., Bethesda, v.114, p.472-6, 1984.

OZKAN, H.; OLGUN, N.; SASMAZ, E.; ABACIOGLU, H.; OKUYAN, M.; CEVIK, N. Nutrition, immunity and infections: T lymphocyte subpopulations in protein energy malnutrition. J Trop Pediatr 1993;39:257-260.

PEDERSEN, B.K.; BRUNSGARD, H. Nutrition age and immunity in exercise. New York, Landres, p. 150-69, 1997.

PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; SARKAR, D.; WALTER, M. R.; SHI, Y.; FISHER, P. B. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. Annual Reviews Immunology 2004; 22: 929-979.

POWANDA, M. C. & BEISEL, W. R. Metabolic effects of infection on protein and energy status. J. Nutr., 133:322S-327S, 2003.

RAMDATH, D. D.; GOLDEN, M. H. N. Non-hematological aspects of iron nutrition. Nutr.Res.Rev., Basel, v.2, p. 29-50, 1989.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institue of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the Ain-76a Rodent. Diet. J. Nutr. v.123, p.1939-51, 1993.

REGIS, G.; PENSA, S.; BOSELLI, D.; NOVELLI, F.; POLI, V. Ups and downs: The STAT1 : STAT3 seesaw of interferon and gp130 receptor signalling. Semin Cell Dev Biol 19:351-359. 2008.

RIKIMARU, T.; TANIGUCHI, K.; YARTEY, J. E.; KENNEDY, D. O.; NKRUMAH, F. K. Humoral and cell-mediated immunity in malnourished children in Ghana. Eur. J. Clin. Nutr. 52(5): 344-50. 1998.

ROBBINS, S. L.; CONTRAN, R. S.; KUMAR, V. Patologia estrutural e funcional 4.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 2, p. 33-72., 2003.

Rodríguez L, Graniel J, Ortiz R. Effect of leptin on activation and cytokine synthesis in peripheral blood lymphocytes of malnourished infected children. Clin. Exp. Immunol.;148:478–485. 2007

RODRIGUES, L.; CERVANTES, E.; ORTIZ, R. Malnutrition and gastrointestinal and respiratory infections in children: A health problem pública.J Rev Neurosci 31:. 8373-8380. 2011.

RODRIGUEZ, L.; GONZÁLES, C.; JIMÉNEZ-ZAMUDIO.; GRANIEL, J. Assement flow cytometric cytokine production in children desnutridas.Clin Diag Lab Immunol 12 (4). 502-507. 2005.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. Mem. Inst. Butantan. v.20, p.315-28, 1947.

ROSS, R. L.; NEWBERNE, M. P. Role of nutrition in immunologic function. Physiol. Rev. 60:188–302, 1980.

SAKA, B.; OZTURK, G.B.; UZUN, S.; KARAN, M.A.; Nutrition risk in hospitalized patients: impact of nutrition status on serum prealbumin; Rev. Nutr., Campinas, 24 (1): 89-98, jan./fev., 2011

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory. Manual. 2 ed. *Cold Spring Harbor*, p. 174-184, 1989.

SAUNDERS, J.; SMITH, T. Malnutrition: causes and consequences. Clin Med. 10 (6):624-7. 2010.

SAWAYA, A. L., Desnutrição: consequência em longo prazo e efeitos da recuperação, nutricional, estudos avançados, (S.I.), v.20, p. 58, 2006.

SANDBERG, J. K.; BHARDWAJ, N.; NIXON, D. Dominant effector memory characteristics, capacity for dynamic adaptive expansion, and sex bias in the innate NKT cell compartment. J.Immunol. 33:588.96. 2003.

SHEN, J.; REN, H.; WATANABE, M. Resistance and augmentation of innate immunity in mice exposed to starvation. Cell Immunology; 259; 66-73. 2009.

SCRIMSHAW, N. S. Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection. J. Nutr., 133: 316S-321S, 2003.

STINNETT, J.D. Nutrition and the immune response, CRC PRESS, 150p, 1983.

SHETY, P. Malnutrition and undernutrition. Medicine, v.34, p. 524-529, 2006.

SUDA, K. A.; MATHUR, M.; DEO, K.; DEO, M. G. Kinetics of mobilization of neutrophils and their marrow pool in protein – calorie deficiency. Blood. v.48, p.864–75, 1976.

SUSKIND, R.; SIRISINHA, S.; VITHAYASAI, V.; EDELMAN, R.; DAMRONGSAK, D.; CHARUPATANA, C.; OLSON, R. E. Immunoglobulins and antibody response in children with protein-calorie malnutrition. Am J Clin Nutr 1976;29:836-841.

TAYLOR, C.; POTTER, A.; RABINOVITCH, P. Splenocyte glutathione and CD3-mediated cell proliferation are reduced in mice fed a protein-deficient diet. J Nutr 1997; 127:44

TCHILIAN, E. Z.; WALLACE, D. L.; WELLS, R. S.; FLOWER, D. R.; MORGAN, G.; BEVERLEY, P. C. L. A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID. J.Immunol., Bethesda, v. 166, n.2, p. 1308-13, 2001.

TOMKINS, A. M. Protein-energy malnutrition and risk of infection. Proc. Nutr. Soc., v.45, p.289-304, 1986.

VITURI, C. L.; BORELLI, P.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRETIN, A. Z. Alteration of the bone marrow in extracellular matrix in mice undernourished. Baz. J. Med. Biol. Res. v.33, p.889-95, 2001.

VIVIER, E.; TOMASELLO, E.; BARATIN, M.; WALZER, T.; UGOLINI, S. Functions of natural killer cells. Nat Immunol, 503-10, 9, PMID: 18425107. 2008.

WAGNER, R.; MORGAN, G.; STROBEL, S. A prospective study of CD45 isoform expression in haemophagocytic lymphohistiocytosis: an abnormal inherited

immunophenotype in one family. Clin. Exp. Immunol., Oxford, v.99, n.2, p. 216-20, 1995.

WAITZBERG, D. L.; PLOPPER, C. & TERRA, R. M. Postoperative total parenteral nutrition. World J. Surg., 23: 560-564, 1999.

WATERLOW, J. C. Malnutricions proteico-energetica. Washington: Organizacion Panamericana de la Salud., 501p. (Publicação científica, n.555), 1996.

WATSON, R. R.; MCMURRAY, D. N.; MARTIN, P.; REYES, M. A. Effect of age, malnutrition and renutrition on free secretory component and IgA in secretions. Am J Clin Nutr 1985; 42:281-288.

WESTERMANN, J. & PABST, R. Distribution of lymphocytes and natural killer cells in the human body. Clin. Invest. (1992) 70: 539-544.

WHITE, B. D.; DEAN, R. G.; MARTIN, R. J. An association between low levels of dietary protein, elevated NPY gene expression in the basomedial hypothalamus and increase food intake, Nutr Neurosc 1998; 1: 173-82.

WOODWARD, B. D. Protein, calories, and immune defenses. Nutr. Rev. 56, 84S-92S, 1998.

WOODWARD, B. D.; WOODS, J. W.; CROUCH, D. A. Direct evidence that primary acquired cell mediated immunity is less resistant than is primary thymus-dependent humoral immunity to the depressive influence of wasting protein-energy malnutrition in weanling mice. Am J Clin Nutr 1992; 55:1180-1185.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Dept of Nutrition for Health and Development: Nutrition for health and development: a global agenda for combating malnutrition. *Geneva World Health wwwDCOrganization, 2011*.

ZHONG, Z.; WEN, Z.; DARNELL, J. E. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. Science 1994; 264:95-98.

ZIEGLER, E. E.; FILER, L. J., Jr. Present knowledge in nutrition. 7ed. Washington DC; Ilse Press: 1996.

ZUCAS, S. M.; LAJOLO, F. M.; BARBÉRIO, J. C. Gaiola metabólica para ratos, testada por meio de zinco radiativo. Rev. Fac. Farm. Bioquim., São Paulo, v.7, p.353-9, 1969.

ANEXO A: Certificado de aprovação da Comissão de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Oficio CEUA/FCF/25/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **"Efeitos da desnutrição protéico-energética na linfoproliferação e na produção 'in vitro' de IFN-γ e IL-10 em células do baço. Quantificação da STAT1, STAT3 e STAT5"** (Protocolo CEUA/FCF/305), de responsabilidade da pesquisadora **Alexandra Siqueira Mello** sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 14 de março de 2011.

São Paulo, 15 de março de 2011.

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br