

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

Estudo da função de macrófagos peritoneais de camundongos submetidos
à dieta hipoprotéica e dieta hiperlipídica

Ed Wilson Cavalcante Oliveira Santos

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Primavera Borelli

São Paulo
2013

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

Estudo da função de macrófagos peritoniais de camundongos submetidos
à dieta hipoprotéica e dieta hiperlipídica

Versão original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Ed Wilson Cavalcante Oliveira Santos

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Primavera Borelli

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S237e Santos, Ed Wilson Cavalcante Oliveira
Estudo da função de macrófagos peritoneais de camundongos submetidos à dieta hipoprotéica e dieta hiperlipídica / Ed Wilson Cavalcante Oliveira Santos. -- São Paulo, 2013.
103p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Borelli, Primavera

1. Hematologia 2. Obesidade : Nutrição : Doenças metabólicas
3. Desnutrição protéica : Medicina 4. Macrófago : Fagocitose :
Imunologia : Medicina I. T. II. Borelli, Primavera, orientador.

616.15 CDD

Ed Wilson Cavalcante Oliveira Santos

Estudo da função de macrófagos peritoniais de camundongos submetidos
à dieta hipoprotéica e dieta hiperlipídica

Comissão Julgadora da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Primavera Borelli

Orientadora/presidente

Prfa. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno
1° examinador

Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo
2 °examinador

São Paulo, Dezembro de 2013.

Dedico esse trabalho à minha família e minha noiva,
por acreditarem em mim e me apoiarem em todos os momentos,
acreditando na minha capacidade e na realização de mais essa etapa.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre guiando a minha vida e por tornar tudo possível.

A meus pais pelo constante apoio, por estarem sempre presentes em todos os momentos e sempre acreditando que tudo dará certo.

A minha noiva Jakeline Franco pelo amor, carinho, por estar sempre comigo, me apoiando e valorizando cada conquista.

À Prof^a. Dr^a Primavera Borelli, pela paciência, disposição e por acreditar em meu empenho, além do seu exemplo de dedicação e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock e Prof. Dr. Marcelo Rogero por todas as orientações que me ajudaram a desenvolver o modelo hiperlipídico.

A Dalila Cunha de Oliveira, Jackeline de Oliveira Beltran, Graziela Batista, Araceli Hastreiter, Alexandra Siqueira, Bruno de Sá e Maristela Tsujita do Laboratório de Hematologia Clínica, pelos momentos de descontração, amizade e auxílio sempre que precisei.

A Amanda Rabello Crisma, Karina Nakajima, Mariana Cristina Ferreira, Maria Carolina Borges, Luciana Simão do Carmo, Edson Mendes, Mayara Caldas, Ana Lígia, Stela Penalva e Edson Makiyama pelo apoio e auxílio profissional.

Aos professores Joilson Martins, Marco Aurélio Vinolo e Sandro Rogério pelas orientações durante minha qualificação.

A Renata Albuquerque por auxiliar com a citometria de fluxo.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica Marcela Frota e Martina Rudnicki pela utilização do leitor de ELISA e Walter Miguel Turato por me auxiliar na aquisição das radiografias.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa do mestrado e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal em Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro e concessão de financiamento ao meu projeto de mestrado.

“Aceitar novas teorias não proporciona nova vida.

*Mesmo a familiaridade com fatos e
teorias importantes é de pouco valor,
a menos que seja colocada em prática”*

Ellen G. White

Resumo

SANTOS, E. W. C. O. **Avaliação da função de macrófagos peritoniais de camundongos submetidos à dieta hipoprotéica e dieta hiperlipídica.** 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A desnutrição protéica e a obesidade são os maiores problemas alimentares na atualidade, afetando bilhões de pessoas em todo o mundo. A transição nutricional, que vem ocorrendo nas últimas décadas está mudando o perfil nutricional, diminuindo a desnutrição e aumentando a porcentagem de indivíduos obesos. A resposta imune inata é extremamente influenciada pela dieta, apresentando alterações significativas tanto em desnutrição quanto na obesidade. Portanto, nos propusemos a avaliar os efeitos da desnutrição protéica e da obesidade nos parâmetros nutricionais, bioquímicos e imunológicos em camundongos. Os animais desnutridos tiveram perda de peso, além de diminuição nas proteínas totais, albumina sérica, glicose, insulina, colesterol, triacilgliceróis e sensibilidade à insulina. Os animais desnutridos também apresentaram valores hematológicos (hemoglobina, hematócrito e hemácias) reduzidos, além de apresentarem pancitopenia e hipocelularidade medular. As funções de adesão, espreiamento, fagocitose, atividade fungicida, produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e citocinas inflamatórias, apresentaram-se diminuídas, evidenciando alterações na resposta imune inata. Os animais submetidos a dieta hiperlipídica apresentaram consumo reduzido de ração, no entanto não houve diferença nas taxas de glicose, insulina, proteínas totais, albumina, hemoglobina, hematócrito e número de hemácias. Os animais hiperlipídicos tiveram aumento de colesterol, diminuição do triacilglicerol e aumento da sensibilidade à insulina. A função macrofágica de adesão, espreiamento, fagocitose, atividade fungicida, produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e citocinas inflamatórias foi levemente aumentada.

Palavras-chave: Obesidade, desnutrição, resposta imune, citocinas

Abstract

SANTOS, E. W. C. O. **Evaluation of peritoneal macrophages function in mice submitted to low protein diet or high fat diet.** 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Protein malnutrition and obesity are major food problems nowadays, affecting billions of people around the world. The nutritional transition that has occurred in recent decades is changing the nutritional profile, reducing malnutrition and increasing the percentage of obese individuals. The innate immune response is highly influenced by diet, with significant changes in both malnutrition and in obesity. Therefore, we set out to evaluate the effects of malnutrition and obesity on nutritional parameters, biochemical and immunological in mice. The malnourished animals presented weight loss, and a decrease in total protein, albumin, glucose, insulin, cholesterol, triglycerides and insulin sensitivity. The malnourished animals also showed hematological (hemoglobin, hematocrit and red blood cells) reduced, besides having pancytopenia and hypocellular bone marrow. The functions of adhesion, spreading, phagocytosis, fungicidal activity, production of reactive oxygen species, nitrogen and inflammatory cytokines, showed up diminished, showing changes in the innate immune response. The animals subjected to high-fat diet showed reduced feed intake, however there was no difference in the rates of glucose, insulin, total protein, albumin, hemoglobin, hematocrit and erythrocyte counts. Hyperlipidaemic animals had increased cholesterol and triglyceride decreased and increased insulin sensitivity. The role of macrophage adhesion, spreading, phagocytosis, fungicidal activity, production of reactive oxygen species, nitrogen and inflammatory cytokines was slightly increased.

Keywords: Obesity, Malnutrition, immune response, cytokines

LISTA DE SIGLAS

ALT: alanina aminotransferase

AST: aspartato aminotransferase

CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média

CO₂: Dióxido de carbono

DNA: Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

DMSO: Dimetil sulfóxido

DPE: Desnutrição protéico-energética

EDTA: Ethylene diamine triacetic acid (ácido etileno diamino tetracético)

ELISA: Enzyme-linked immune sorbent assay (ensaio imunoenzimático acoplado)

EROS: Espécies reativas de oxigênio

G-CFC: Granulocyte colony-forming cell (células formadoras de colônias grânulocíticas)

HCM: Hemoglobina corpuscular media

IFN- γ : Interferon gama

I κ B: Inhibitor kappa B (inibidor kappa B)

IKK α : I kappa B kinase alpha (I kappa B quinase alfa)

IKK β : I kappa B kinase beta (I kappa B quinase beta)

IKK γ : I kappa B kinase gama (I kappa B quinase gama)

IFNY: Interferon gamma

IL-1 β : Interleucina-1 beta

IL-4: Interleucina-4

IL-6: Interleucina-6

IL-8: Interleucina-8

IL-10: Interleucina-10

INOS: Óxido nítrico sintase indutível

IRAK1: IL-1 receptor associated kinase (quinase associada ao receptor de IL-1)

IRAK4: IL-4 receptor associated kinase (quinase associada ao receptor de IL-4)

LBP: LPS binding protein (proteína ligante do LPS)

LPS: Lipopolissacarídeo

MAPK: Mitogen activator protein kinase (quinase da proteína ativadora mitógena)

- MCP-1:** Proteína Quimiotóxica de Monócitos
- MyD88:** Myeloid differentiation 88 (fator de diferenciação mielóide 88)
- NADPH:** Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate dehydrogenase (Nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase)
- NF- κ B:** nuclear factor kappa B (fator de transcrição nuclear kappa B)
- NK:** Natural Killer (linfócito natural killer)
- PAI-1:** Plasminogen activator inhibitor (Inibidor do ativador do plasminogênio)
- PBS:** Phosphate buffer solution (solução tampão de fosfato)
- PMA:** Phorbol-miristate-acetate (Forbol miristato acetato)
- PRR:** Receptor de reconhecimento de padrões
- RNS:** Reactive nitrogen species (Espécies reativas de nitrogênio)
- ROS:** Reactive oxygen species (Espécies reativas de oxigênio)
- SDM:** Standard deviation of media (desvio padrão da média)
- SHN:** Soro homólogo normal
- TLR:** Toll-like receptor (Receptor do tipo Toll)
- TNF α :** Tumor necrosis factor alpha (fator de necrose tumoral alfa)
- TRAF-6:** TNF α receptor associated factor 6 (fator associado ao receptor de TNF α 6)
- VCM:** Volume corpuscular médio

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Via clássica de ativação e translocação de NF- κ B por LPS
- Figura 2** – Complexo NADPH oxidase. Fosforilação e ativação da NADPH oxidase
- Figura 3** – Variação do peso corporal
- Figura 4** – Consumo de ração, proteínas, lipídios e calorias
- Figura 5** – Peso dos coxins adiposos
- Figura 6** – Fotomicrografia de corte histológico de coxim adiposo
- Figura 7** – Índice de Lee
- Figura 8** – Radiografia
- Figura 9** – Concentração sérica de proteínas totais e albumina

- Figura 10** – Concentração sérica de glicose, insulina e índice de HOMA-IR
- Figura 11** – Concentração sérica de colesterol e triacilglicerol
- Figura 12** – Número de hemácias, hemoglobina e hematócrito
- Figura 13** – Índices hematimétricos
- Figura 14** – Contagem de leucócitos no sangue periférico
- Figura 15** – Contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico
- Figura 16** – Contagem de células nucleadas totais da medula óssea
- Figura 17** – Fotomicrografia de corte histológico de medula óssea
- Figura 18** – Contagem de células nucleadas totais do lavado peritoneal
- Figura 19** – Fotomicrografia da celularidade peritoneal
- Figura 20** – Contagem diferencial de células nucleadas do lavado peritoneal
- Figura 21** – Imunofenotipagem de celularidade peritoneal
- Figura 22** – Capacidade de apresentação de antígenos
- Figura 23** – Adesão de macrófagos em 2 horas e 24 horas
- Figura 24** – Capacidade de espraiamento de macrófagos em 2 horas
- Figura 25** – Fotomicrografia de macrófagos peritoneais residentes e ativados
- Figura 26** – Capacidade de espraiamento de macrófagos em 24 horas
- Figura 27** – Produção de óxido nítrico
- Figura 28** – Produção de Peróxido de Hidrogênio
- Figura 29** – Capacidade de fagocitose entre células opsonizadas e não opsonizadas
- Figura 30** – Capacidade de fagocitose de células opsonizadas
- Figura 31** – Atividade fungicida em 30, 60, 90 e 120 minutos
- Figura 32** – Fotomicrografia de fagocitose por macrófagos peritoneais
- Figura 33** – Produção de citocinas em sobrenadante de cultura de macrófagos
(TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10) em 24 horas
- Figura 34** – Produção de citocinas no tecido adiposo (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10) em 2h
- Figura 35** – Produção de citocinas no tecido adiposo (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10) em 24h
- Figura 36** – Produção de adipocinas
- Figura 37** – Produção de Proteína C reativa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das Rações (g/Kg ração)

Tabela 2 – Composição da Mistura Salínica

Tabela 3 – Composição da Mistura Vitamínica

Tabela 4 – Rações e grupos

Tabela 5 – Valores absolutos referente ao aminograma (mg/kg)

Tabela 6 – Valores relativos referente ao aminograma (%)

Tabela 7 – Distribuição relativa das populações medulares

Tabela 8 – Distribuição absoluta das populações medulares

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Desnutrição protéica.....	01
1.1.1 Alterações hemopoéticas na desnutrição	03
1.2 Dietas hiperlipídicas e Obesidade	04
1.2.1 Alterações hemopoéticas na obesidade	05
1.3 Transição nutricional	07
1.4 Macrófagos	09
1.5 Toll Like Receptor	10
1.6 Ativação de macrófagos peritoniais por LPS	11
1.7 <i>Burst</i> respiratório	12
1.7.1 Espécies reativas de oxigênio	13
1.8 Ativação do fator NF-kB alterada pela desnutrição e obesidade.....	13
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Animais	15
3.2 Rações	15
3.3 Indução às dietas hipoprotéica e hiperlipídica	17
3.4 Obtenção das amostras biológicas	18
3.4.1 Amostras sanguíneas.....	18
3.4.2 Adipócitos	18
3.5 Análises hematológicas	19
3.5.1 Hemograma e contagem de reticulócitos	19
3.6 Obtenção de macrófagos peritoniais	19
3.6.1 <i>Cultura de células mononucleares peritoniais</i>	20
3.7 Viabilidade celular	20
3.8 Análise morfológica e caracterização imunofenotípica das células do lavado peritoneal	20

3.9 Avaliação da capacidade de adesão de células da cav. peritoneal	21
3.10 Teste de espriamento de células da cavidade peritoneal	21
3.11 Avaliação da fagocitose e atividade fungicida, <i>in vitro</i> , de células da cavidade peritoneal	22
3.11.1 Obtenção de soro homólogo normal (SHN)	22
3.11.2 Preparo e opsonização da suspensão de <i>Candida albicans</i>	22
3.11.3 Obtenção da suspensão de células peritoneais	23
3.11.4 Ensaios de fagocitose e de atividade fungicida	23
3.12 Determinação de síntese de óxido nítrico	24
3.13 Determinação da liberação de peróxido de hidrogênio	24
3.14 Avaliação da capacidade de apresentação de antígenos.....	24
3.15 Determinação da concentração sérica de glicose, colesterol total e triacilgliceróis	24
3.16 Determinação das concentrações séricas de insulina, leptina, resistina, adiponectina e proteína C reativa	25
3.17 Avaliação da síntese de citocinas	25
3.18 Avaliação histológica	25
3.19 Avaliação do Índice de Massa Corporal murino	25
3.20 Aminograma	26
3.21 Avaliação radiográfica da proporção de tecido adiposo	26
3.22 Análise estatística	26
4. RESULTADOS	27
4.1 Avaliação do estado nutricional	27
4.1.1 Análise do peso corporal	27
4.1.2 Análise do consumo de ração, proteínas, lipídios e calorías.....	28
4.1.3 Avaliação dos coxins adiposos: periepididimal e retroperitoneal	29
4.1.4 Avaliação histológica do tecido adiposo periepididimal	30
4.1.5 Índice de Lee	31
4.1.6 Avaliação radiográfica da proporção de tecido adiposo	32
4.1.7 Avaliação da concentração sérica de proteínas totais e albumina	33

4.1.8 Aminograma	34
4.1.9 Avaliação da concentração de glicose, insulina e índice HOMA-IR	36
4.1.10 Avaliação da concentração sérica de Colesterol e Triacilgliceróis	38
4.2 Avaliação hematológica	39
4.2.1 Hemograma	39
4.2.1.1 Eritrograma	39
4.2.1.2 Leucograma	41
4.3 Mielograma	43
4.4 Avaliação de células nucleadas da cavidade peritoneal	47
4.4.1 Células nucleadas do lavado peritoneal	47
4.5 Função de macrófagos	49
4.5.1 Citometria de fluxo	49
4.5.1.1 Caracterização imunofenotípica	49
4.5.1.2 Apresentação de antígenos.....	49
4.5.2 Avaliação da capacidade de adesão de macrófagos peritoneais	51
4.5.3 Teste de espreiamento de macrófagos peritoneais	52
4.5.4 Avaliação Produção de óxido nítrico	55
4.5.5 Avaliação Produção de Peróxido de Hidrogênio	56
4.5.6 Avaliação da Fagocitose e Atividade fungicida	57
4.5.7 Produção de Citocinas em sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10)	61
4.5.7.1 Produção de Citocinas no tecido adiposo (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10)	63
4.6 Produção de Adipocinas (Leptina, Adiponectina e Resistina)	66
4.7 Produção de Proteína C reativa e MCP-1	68
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÃO	82
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	83
8. ANEXO (certificado do comite de ética)	103

1. INTRODUÇÃO

1.1 Desnutrição protéica

A desnutrição é definida pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura como uma condição fisiológica anormal causada por uma ingestão inadequada, desequilibrada ou consumo excessivo de macronutrientes que fornecem energia (carboidratos, proteínas e gorduras) e micronutrientes (vitaminas e minerais) que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento físico e cognitivo. (FAO, 2013). A gravidade da desnutrição depende de fatores como a causa, intensidade e duração da carência. Ela pode ser causada por dieta inadequada, deficiência de absorção, ingestão insuficiente, aumento da utilização dos nutrientes, ou ainda por excreção excessiva, podendo assim, encontrar diversas formas de desnutrição atuando no mesmo indivíduo simultaneamente (CHANDRA, 1992; FAO, 2011).

A desnutrição protéico-energética (DPE) é um dos principais problemas alimentares do mundo, sendo encontrada com maior frequência em crianças, idosos, pacientes portadores de neoplasias, doenças crônicas ou sob quimioterapia (MARCOS *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2009). Dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2009) demonstram que em 2008 havia cerca de 915 milhões de pessoas no mundo desnutridas e expectativa de chegar a um bilhão em 2010. No entanto, este número atingiu 925 milhões em 2010, chegando a 868 milhões em 2012 indicando tendência de declínio nos próximos anos (FAO, 2013). Apesar disso, o relatório de 2013 da FAO diz que ainda temos um longo caminho pela frente, inclusive no setor econômico, visto que o custo da desnutrição na economia global pode chegar a 3,5 trilhões de dólares (FAO, 2013).

No Brasil, segundo trabalho de MONTEIRO (2003), observamos que os índices de desnutrição infantil em 1996 estavam na faixa de 10% da população, sendo que há uma evidente diferença entre a região norte-nordeste (apresentando taxa de 25% de crianças desnutridas na zona rural) e a região centro-sul (com taxa de 4,6% na zona urbana). Os índices, no entanto, caíram pela metade nos 10 anos subsequentes, provavelmente graças a políticas sociais, aumento da escolaridade das mães, aumento do poder aquisitivo e acesso à informação (BATISTA FILHO & RASSIN, 2011;

MONTEIRO *et al.*, 2009), mas continuam elevados no Brasil (cerca de 3,7% em crianças e 2,4% em adultos) segundo a Organização mundial de Saúde (WHO, 2010).

Comparando-se as regiões brasileiras entre os anos de 1975-96, notamos que a região norte teve uma queda de 39% para 16,6%, a região centro-sul caiu de 20,5% para 4,6% (BATISTA FILHO & RISSIN, 2003). Dados mais atuais ainda mostram que a tendência é de queda ainda maior, pois a região nordeste brasileira apresentou queda de 22,2% para 5,9% entre 1996 a 2006 (LIMA *et al.*, 2010).

A DPE origina manifestações clínicas diferentes, dependendo do grau, duração e causa da deficiência protéico-energética. As manifestações mais graves são *Kwashiorkor* e *Marasmus*, sendo que o *Kwashiorkor* decorre de uma carência protéica com ingestão normal de carboidratos, enquanto o *Marasmus* está relacionado com a deficiência prolongada de proteínas e carboidratos (WATERLOW *et al.*, 1971).

A desnutrição protéica (*kwashiorkor*) pode levar a uma série de alterações, como pele seca, fina, descamativa, com áreas confluentes de hiperpigmentação e hiperqueratose, cabelo seco, hipopigmentado, de queda fácil; hepatomegalia (por esteatose hepática); abdome distendido, com alças intestinais dilatadas. A ingesta adequada de proteínas tende a restaurar a cor dos cabelos, resultando em um cabelo com partes hipopigmentadas intercaladas com áreas normopigmentadas (MANN *et al.*, 2011).

Já a deficiência proteico-energética (*Marasmus*) leva a redução de peso e altura, irritabilidade, aparência de fraqueza, bradicardia, hipotensão, hipotermia, pele seca e fina, dobras cutâneas redundantes por perda do panículo adiposo, cabelo fino e esparso, de queda fácil, pelo de aspecto senil por perda de gordura corporal.

Normalmente há uma interposição dos quadros, levando ao *Kwashiorkor-marasmático*, neste caso a pessoa pode desenvolver doenças infecciosas por baixa imunidade, o que pode levar a quadros de hipoalbuminemia e edema, devido à associação da perda aguda de nutrientes com a resposta inflamatória imposta à depleção crônica de massa lipídica e muscular. (BADALOO *et al.*, 2006; MANN *et al.*, 2011).

1.1.1 Alterações hematopoéticas na desnutrição

Dados do nosso laboratório e de outros autores evidenciam que entre as alterações presentes na DPE, está a alteração do tecido hematopoético, com modificações em componentes da matriz extracelular (BORELLI *et al.*, 1995; 2007), alterações no ciclo celular da célula tronco/progenitora hematopoética (BORELLI *et al.*, 2009; NAKAJIMA, 2010), redução da produção de células e precursores hematopoéticos (BORELLI *et al.*, 2007), tanto na série eritrocitária (BORELLI *et al.*, 2007), como na série leucocitária (BORELLI *et al.*, 1995; 1998; 2001; 2004; CRISMA, 2010; FOCK *et al.*, 2003; 2007; 2010), levando a anemia e leucopenia (BORELLI *et al.*, 2004; FOCK *et al.*, 2010).

As leucopenias podem levar a quadros frequentes de infecção. Indivíduos desnutridos apresentam aumento da suscetibilidade a infecções, o que evidencia a relação desnutrição-infecção (BRUNDTLAND, 2000). A desnutrição protéica modifica tanto a resposta imune específica como a inespecífica do indivíduo, frente a agentes infecciosos (CHANDRA, 1991; CRISMA, 2010; SOUZA *et al.*, 2001).

A literatura e dados de nosso grupo demonstram que a resposta imune inata mediada por macrófagos, torna-se prejudicada no indivíduo desnutrido. Em macrófagos, ocorre a redução da ativação macrofágica (ANSTEAD *et al.*, 2003), deficiência na apresentação do antígeno (PAPADIMETRIOU & VAN BRUGGEN, 1988; REDMOND *et al.*, 1995), diminuição no espriamento e fagocitose (SOUZA *et al.*, 2001; TESHIMA *et al.*, 1995), além de diminuição de espécies reativas de oxigênio (BORELLI & NARDINELLI, 2001; FERNANDEZ *et al.*, 1999; PAIXAO SILVA *et al.*, 2011; TESHIMA *et al.*, 1995) e de nitrogênio (ANSTEAD *et al.*, 2003; FOCK *et al.*, 2003; REDMOND *et al.*, 1995; STAPLETON *et al.*, 2001). Há também redução da produção de citocinas pró-inflamatórias (FOCK *et al.*, 2007; REDMOND *et al.*, 1991; STAPLETON *et al.*, 2001), tais como IL-1, IL-6 e TNF α e aumento de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, observados tanto em camundongos Swiss webster como C57bl/6J (CRISMA, 2010).

1.2 Dietas hiperlipídicas e Obesidade

A obesidade pode ser definida, simplificada, como uma doença caracterizada pelo aumento excessivo de gordura corporal, em consequência de um balanço energético positivo, que repercute na saúde do indivíduo, com perda considerável da qualidade de vida e redução da expectativa de vida (FAO, 2013; TARDIDO & FALCÃO, 2006).

A obesidade tem assumido características de uma pandemia mundial, representando um dos principais desafios que sociedades enfrentam no mundo todo (SAAMAN, 2011; WHO, 2000). Identificar os mecanismos envolvidos no seu desenvolvimento e propagação irá ajudar a criar medidas preventivas e estratégias terapêuticas que possam auxiliar no controle de seus índices crescentes. Estudos epidemiológicos indicam que aproximadamente 65% da população dos Estados Unidos apresentam excesso de peso, sendo que 35% desses indivíduos são classificados como tendo risco de obesidade e 30% são considerados obesos (HEDLEY *et al.*, 2004; OGDEN *et al.*, 2006).

A obesidade está associada com inflamação crônica de baixo grau, e acredita-se ser um dos principais contribuintes para o desenvolvimento de resistência à insulina, que é um evento precoce na obesidade e pode levar a diabetes tipo 2, quando o pâncreas para de acompanhar o aumento da demanda por insulina (SAAMAN, 2011).

Dados de 2003-2004 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2004), mostram que a prevalência de excesso de peso na população adulta brasileira é de 40%, sendo que a obesidade, entre adultos, acomete 8,9% dos homens e 13,1% das mulheres. Esses valores vêm aumentando continuamente ano a ano, como demonstram os dados comparativos do IBGE, 1975; 2004.

O sobrepeso e a obesidade resultam da interação de diversos fatores, incluindo fatores genéticos, metabólicos, comportamentais e ambientais. Dessa forma, o rápido aumento da prevalência de excesso de peso sugere que os componentes comportamentais e ambientais sejam os principais responsáveis pela epidemia (STEIN *et al.*, 2006). Dentre os fatores ambientais e comportamentais envolvidos, destacam-se a dieta, a prática de atividade física e o tabagismo (ROBERTS & BARNARD, 2005).

As sociedades modernas parecem estar convergindo para um padrão alimentar denominado “dieta ocidental”, caracterizado pelo consumo de alimentos com elevada densidade energética, o que é parcialmente resultante do elevado conteúdo de gordura desses alimentos (DU *et al.*, 2000; ROBERTS & BARNARD, 2005; WHO, 2003). A alta quantidade de gordura na dieta está associada ao elevado consumo de ácidos graxos saturados, *trans* e poliinsaturados ômega-6 (IBGE, 2004; WHO, 2003).

A presença de excesso de peso, desnutrição e outras doenças crônicas não transmissíveis coexistindo nas mesmas comunidades caracteriza a transição nutricional. Diversos estudos têm demonstrado que o Brasil, assim como outros países em desenvolvimento passam por este quadro (BATISTA FILHO & RASSIN, 2003; COUTINHO *et al.*, 2008; IBGE, 2004).

1.2.1 Alterações hematopoéticas na obesidade

O tecido sanguíneo caracteriza-se por sua alta taxa de renovação celular por sua flexibilidade e adaptação frente a diferentes situações fisiopatológicas (OGAWA, 1993; QUESENBERRY, 1995).

Sabe-se que a proliferação e diferenciação de progenitores hematopoéticos assim como a sobrevivência destas células pode ser induzida pela combinação de diversas citocinas (RANE & REDDY, 2002) que podem ser produzidas por diversos componentes do microambiente hematopoético e ou de outros tecidos (ARAI *et al.*, 1990; CUTLER *et al.*, 1985; HAYLOCK *et al.*, 1994; OGAWA, 1993; SMITH, 2003).

A obesidade está associada ao aumento dos níveis de leptina e de adipócitos, este último sendo o principal produtor de leptina, bem como de outros mediadores, principalmente inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), $IL-1\beta$ e $IL-6$ que podem atuar direta ou indiretamente nas células hematopoéticas (AHIMA & FLIER, 2000; OZCAN *et al.*, 2006; SCHAFFLER *et al.*, 2007).

A leptina atua também no sistema imune (PATEL *et al.*, 2013), estimulando a produção de leucócitos na medula óssea, bem como sua migração. Também aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias como $TNF\alpha$, $IL-6$ e $IL-12$, adesão e fagocitose de macrófagos, além de estimular a proliferação das células T, levando ao aumento da competência imunológica (SILVEIRA *et al.*, 2009).

A adiponectina também tem função imune, atuando na regulação da expressão de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10. No entanto, a produção da adiponectina pode ser inibida pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF α (ALVEZ, 2006; TILG & MOSCHEN, 2006).

Trabalhos recentes vêm mostrando que a obesidade leva a uma diminuição do fluxo sanguíneo no tecido adiposo, originando uma hipóxia, que inicia um processo pró-inflamatório (RAMALHO & GUIMARAES, 2008; SAAMAN, 2011), com aumento da produção de citocinas, como TNF α e IL-6, e proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa (ZEYDA & STULNIG, 2007).

A produção de citocinas pró-inflamatórias, comumente, observada em situações de obesidade, pode ter efeitos sobre a hematopoese, induzindo ou inibindo a proliferação e diferenciação das células presentes na medula óssea. Mediadores inflamatórios também possuem a capacidade de ativar outros tipos celulares a produzirem diferentes mediadores que por ventura possam influenciar o complexo mecanismo hematopoético (GHANIN *et al.*, 2004; RAMALHO & GUIMARAES, 2008). Algumas exercem efeito ativador ou de proliferação (como por exemplo, o GM-CSF), enquanto outras aparentemente apresentam efeito inibitório sobre a proliferação hematopoética (TNF α e IFN- γ , por exemplo) (ARAI *et al.*, 1990; CUTLER *et al.*, 1985; HAYLOCK *et al.*, 1994; OGAWA, 1993; SMITH, 2003).

A leptina aumenta a produção de IL-2 e de interferon gama (INF- γ) enquanto diminui os níveis de IL-4. Portanto, a leptina pode desempenhar um papel importante na regulação do equilíbrio T helper Th₁ e Th₂. A leptina modula também a produção de citocinas de monócitos/macrófagos. Um aumento de lipopolissacarídeo (LPS) induz a produção de TNF α , IL-6 e IL-12 em macrófagos peritoneais (LOFFREDA *et al.*, 1998; SANTOS-ALVAREZ *et al.*, 1999). A leptina é um hormônio pleiotrópico derivado do tecido adiposo e atua em nível de células imaturas, aumentando proliferação e diferenciação da linhagem mielóide (HARIRI & THIBAUT, 2010; LAHARRAGUE *et al.*, 2000).

A leptina pode ainda diminuir a taxa de infecção causada por uma desnutrição, promovendo a recuperação da imunocompetência. Portanto a leptina é um forte fator mediador do estado nutricional sobre a função imune (FLIER, 1998).

Estudos com ratos *Wistar* submetidos à dieta hiperlipídica, encontraram um aumento das concentrações de leptina e proteína C reativa (CARMO, 2012). No entanto, a glicemia e concentração de insulina, bem como as concentrações de ALT, AST, IL-6, TNF α e adiponectina não apresentaram diferenças significativas em relação a grupo controle (BORGES, 2011; CARMO *et al.*, 2013). A idade também é fator fundamental, sendo que ao induzir a obesidade com dietas hiperlipídicas, camundongos de idades diferentes apresentaram respostas distintas (WU *et al.*, 2013).

Trabalhos de nosso grupo mostraram algumas semelhanças entre o quadro metabólico de animais submetidos à desnutrição protéica e hiperlipidêmica, pois encontramos diminuição da celularidade leucocitária peritoneal, medular e sérica, além da diminuição da produção de TNF α e da ativação do fator de transcrição NF-kB tanto na dieta hipoprotéica (CRISMA, 2010; FOCK *et al.*, 2007) quanto na hiperlipídica (BORGES, 2011).

1.3 Transição nutricional

Há algumas décadas era considerada improvável uma pandemia de obesidade. No entanto, a partir da década de 70 o número de obesos foi aumentando até tornar-se preocupante na década de 90 (MONTEIRO, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2011). Dados da FAO & WHO (2012) indicam, ainda, que a desnutrição protéica era um dos maiores problemas nutricionais em todo o mundo. No entanto, na maioria dos países da América Latina, Ásia e no norte da África vem ocorrendo uma acelerada mudança de perfil nutricional na população (WHO, 2010). A este quadro damos o nome de transição nutricional (BATISTA FILHO & RASSIN, 2003; CUPPARI, 2009; POPKIN *et al.*, 2012).

O nosso bem estar físico e mental está intimamente ligado com a alimentação. A dieta é fundamental na manutenção da saúde. Alterações na dieta podem ocasionar alterações importantes no metabolismo, como o desenvolvimento de doenças diversas devido à queda de qualidade na resposta imune. Muitos estudos têm sido focados neste tema, como os registros da *World Health Organization* (WHO, 2010) e *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2010), mostrando que a distribuição de alimentos e a sua ingestão é extremamente heterogênea dependendo da região geográfica (BATISTA FILHO & RASSIN, 2011).

Entende-se como transição nutricional às mudanças dos padrões nutricionais, modificando a dieta e se correlacionando com mudanças sociais, econômicas, demográficas e relacionadas à saúde, o que geralmente está associado à obesidade (COUTINHO *et al.*, 2008; POPKIN *et al.*, 2012). Uma das características marcantes do processo de transição nutricional no Brasil é o antagonismo de tendências temporais entre desnutrição e obesidade. Ao mesmo tempo em que declina a ocorrência da desnutrição em crianças e adultos num ritmo bem acelerado, aumenta a prevalência de excesso de peso e obesidade na população brasileira em determinadas regiões (BATISTA FILHO & RISSIN, 2003).

O aumento da população obesa ou com sobrepeso, se deve, muito ao aumento crescente da ingestão de alimentos processados, óleos comestíveis, bebidas adoçadas com açúcar, associados à diminuição do consumo de fibras, frutas, verduras e legumes. As refeições rápidas aumentaram o consumo de refrigerantes, “salgadinhos”, biscoitos, sanduíches e sorvetes, que substituíram o arroz, feijão, carne, verduras e frutas. Outros fatores não alimentares, como o aumento da distância entre o trabalho e a casa do indivíduo, aumento do sedentarismo e diminuição da atividade física também contribuem para este aumento (POPKIN, 2001; TARDIDO & FALCÃO, 2006).

No Brasil, o consumo de frutas, legumes e verduras é estimado em 2,3% do total de calorias diárias, o que está abaixo do nível ideal de consumo em todas as regiões e níveis sócio-econômicos (IBGE, 2004). A OMS estima que aproximadamente 2,7 milhões de mortes por ano em todo mundo estão relacionadas ao consumo inadequado de frutas, legumes e verduras, sendo este um dos dez fatores centrais na determinação de doenças (WHO, 2002).

Em uma tentativa para diminuir os danos causados pela má conduta alimentar, a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002) estabeleceu limites máximos para o consumo de gorduras (30% do consumo calórico total), ácidos graxos saturados (10% do consumo calórico total), açúcar (10% do consumo calórico total), colesterol (300 mg por dia ou 100 mg/1.000 kcal) e sal (6 grama por dia), de modo a estimular o consumo de carboidratos complexos (mínimo de 50% do consumo calórico total), de fibras, de legumes, de verduras e de frutas (400 grama por dia ou cerca de 7% do consumo calórico total) (JAMES *et al.*, 1988; WHO, 2002).

1.4 Macrófagos

Os macrófagos (fagócitos mononucleares) desempenham papel essencial no organismo, devido à grande variedade de processos fisiológicos e patológicos nos quais atuam. É fundamental na resposta imune, agindo na fagocitose, secreção de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, apresentação de antígenos, formação de células gigantes multinucleadas, além da produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (OLEFSKY & GLASS, 2009; QUINN & SCHEPETKIN, 2009; SHIBATA & GLASS, 2009; STAPLETON *et al.*, 2001).

Os macrófagos são distribuídos por todo o corpo, podendo ser encontrado nos órgãos linfóides, fígado, pulmão, trato gastrointestinal, sistema nervoso central, cavidades serosas, osso, sinóvia e pele. Eles podem ser macrófagos residentes ou ativados.

Os macrófagos possuem sensibilidade a vários tipos de substâncias, tais como lipoproteínas, imunoglobulinas, fatores de crescimento, partículas virais, componentes bacterianos, fúngicos, interferon (IFN γ), citocinas, outros organismos patogênicos, entre outras (GORDON, 2007; ODEGAARD & CHAWLA, 2011; ZEYDA & STULNIG, 2007). Após o contato, ocorre uma sinalização onde os macrófagos residentes são ativados, isto é, passam a produzir substâncias como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, aumentam a capacidade de adesão, espraiamento, fagocitose, além da produção de citocinas pró-inflamatórias (AKIRA *et al.*, 2013; BOU GHOSN *et al.*, 2010).

A morte de fungos e bactérias é realizada, principalmente, pela fagocitose e geração de espécies reativas de oxigênio (também abreviadas como ROS ou EROS) e de nitrogênio (ERN ou RNS), como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico ($\bullet NO$), peroxinitrito ($ONOO^-$), entre outros (GWINN & VALLYATHAN, 2006).

Os macrófagos podem ser classificados em M1 e M2, sendo que M1 tem características pró-inflamatórias, produzindo citocinas como TNF α e IL-1, em contrapartida os macrófagos M2 apresentam uma característica imunomoduladora, com produção de citocinas como IL-4 e IL-10 (BOU GHOSN *et al.*, 2010).

Em casos de obesidade ocorre um aumento do diâmetro dos adipócitos, estimulando a produção de MCP-1, promovendo uma maior migração de macrófagos

para o tecido adiposo, o que estaria ligado ao aumento da inflamação neste tecido (KANDA *et al.*, 2006; SAAMAN, 2011). Essa maior infiltração aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo (BEHAN, 2013; RAMALHO & GUIMARAES, 2008). Essa infiltração de macrófagos pode estar ligada à resistência à insulina (AKIRA *et al.*, 2013; BEHAN *et al.*, 2013; PATEL *et al.*, 2013).

1.5 Toll Like Receptor

A ativação da imunidade inata é um passo importante para desenvolver a imunidade adquirida antígeno específica. A resposta principal à patógenos na imunidade inata é acionada pelos *Receptores de Reconhecimento de Padrões* (PRR) que são receptores de substâncias oriundas de microorganismos chamadas de *Padrões Moleculares Associados a Patógenos* (PAMPs). Entre as famílias mais importantes de PRRs estão os Receptores Semelhantes a Toll, conhecidos como *Toll like receptors* (TLR) que são glicoproteínas integrais de membrana e reconhecem um grande número de PAMPs (ABBAS *et al.*, 2012).

Os primeiros TLRs foram descobertos em moscas *Drosophila* sp. há 20 anos. Estudos de 2007 (ARANCIBIA *et al.*, 2007) mostram que temos 11 TLRs descritos em mamíferos. No entanto, há trabalhos mais atuais que mostram até 13 diferentes tipos de TLR (SHI *et al.*, 2011). Há TLRs expressos na superfície celular (TLR 1, 2, 4, 5, 6) que podem se ligar às PAMPs extracelulares e outros expressos em membranas endossômicas (TLR 3, 7, 8, 9) que reconhecem os ácidos nucleicos dos patógenos fagocitados (ARANCIBIA *et al.*, 2007).

Os TLRs são encontrados em monócitos/macrófagos (TLR 1, 2, 4 a 9), neutrófilos (TLR 1, 2 e 4), células dendríticas (TLR 2 a 9), células B e NK (TLR 1) e endoteliais (TLR 4) (AKIRA & TAKEDA, 2004; CARRILLO-ESPER, 2003). Os TLRs podem reconhecer diversos tipos de PAMPs, como peptídeoglicanos de bactérias gram positivas (TLR 1 e 2), vírus (TLR 3), lipopolissacarídeo bacteriano (TLR 4), flagelina bacteriana (TLR 5), lipopeptídeos e peptídeoglicanos derivados de micoplasma (TLR 6), componentes antivirais (TLR 7), DNA bacteriano (TLR 9), entre outros (CARRILLO-ESPER, 2003).

1.6 Ativação de macrófagos peritoniais por LPS

O LPS (lipopolissacarídeo) é uma molécula altamente tóxica presente na membrana celular externa de bactérias gram-negativas e algumas gram positivas. Essa endotoxina pode desencadear vias de sinalização intracelular por intermédio de receptores próprios na membrana celular, conhecidos com TLR4. O seu reconhecimento se dá por intermédio da proteína ligante LBP (*Lipopolysaccharide Binding Protein*), da proteína CD14 (*determinante de diferenciação*) e da MD2 (*proteína diferenciadora mielóide*). Portanto, o LBP, CD14 e MD2 atuam como proteínas auxiliares, responsáveis pelo reconhecimento do LPS pelo receptor TLR4, ativando a via (CRUZ-MACHADO, 2010; MIYAKE, 2003). A ativação do TLR4 (figura 1) pode acionar diversas vias de sinalização, como a MAPK (*mitogen activated protein kinase*), AP-1 (*activator protein 1*), STAT (*signal transducer and activator of transcription*) e IRF3 (*interferon regulatory factor 3*).

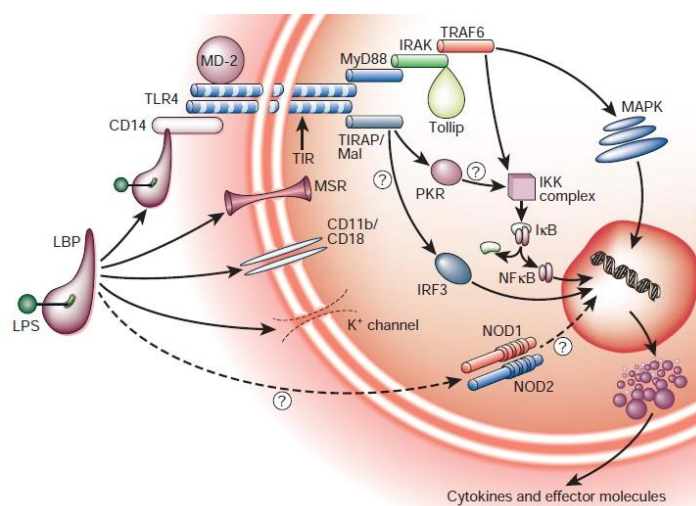


Figura 1 – Via clássica de ativação e translocação de NF-κB por LPS (COHEN, 2002)

Uma das principais vias que será ativada pelo LPS, é a via do fator de transcrição NF-κB (*nuclear factor kappa B*). Descoberto em 1986 (SEN & BALTIMORE, 1986) o NF-κB promove a transcrição de diversos genes (COHEN, 2002; RAETZ & WHITFIELD, 2002), tais como para as citocinas TNFα, IL-1, IL-6, G-CSF, GM-CSF e M-CSF; enzimas iNOS e COX2; quimiocinas IL-8 e MCP-1; fatores de transcrição p50, c-Rel e IRF-1, moléculas de adesão ICAM e PECAM (GUHA & MACKMAN, 2001).

Com a ativação do TLR4 (figura 1) inicia-se a série de eventos intracelulares, onde ocorre a associação com MyD88 (*fator de determinação mielóide 88*) que recruta membros da família das quinases associadas ao receptor de Interleucina 1 (IRAK4 e IRAK1) que serão fosforilados, associando-se à proteína TRAF6. O TRAF6 ativa quinases da MAPK, que pode promover a ativação do ativador da proteína-1 (AP-1) (BEUTLER, 2004).

Ainda no citoplasma, encontramos o fator de transcrição NF- κ B em sua forma inativa, devido à associação com inibidores, como as I κ B (inibidor de κ B). A TRAF6 promove a ativação de IKK (I κ B quinases). Esse complexo é composto de duas subunidades catalíticas IKK α e IKK β e uma subunidade regulatória IKK γ , conhecida como NEMO (*NF- κ B essential modulator*) e induz a fosforilação do I κ B (VERMA *et al.*, 2004). A fosforilação dos I κ B resulta na sua poliubiquitinação, que acarreta na sua degradação mediada pelo proteossoma 26S, permitindo, desse modo, que o fator de transcrição- κ B (NF- κ B) transloque para o interior do núcleo celular e ative a transcrição de diversos genes dependentes do κ B, como genes de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF α , IL-1 β e IL-6. O NF- κ B também promove a estimulação da síntese do I κ B, uma vez que a região promotora do gene que codifica para o I κ B contém sítios funcionais para o NF- κ B. Desse modo, o I κ B recém-sintetizado liga-se ao NF- κ B e suprime a sua atividade (BEUTLER, 2004; KAWAI e AKIRA, 2010).

Além do LPS, há outros fatores que podem ativar a via do NF- κ B, tais como TNF α , IL-1 e por espécies reativas de oxigênio, como veremos a seguir (ILES & FORMAN, 2002; KAUL & FORMAN, 1996; KAWAI e AKIRA, 2005; OLIVEIRA-MARQUES *et al.*, 2009).

1.7 *Burst* respiratório

O *burst* respiratório, também chamado de “explosão respiratória” ou estresse oxidativo, é um processo fisiológico que ocorre em fagocitos ativados após a fagocitose de microorganismos. Caracteriza-se pela conversão do oxigênio molecular (O₂) em espécies reativas de oxigênio na mitocôndria ou mesmo no citosol e meio extracelular (FISHER, 2009).

1.7.1 Espécies reativas de oxigênio

Durante a infecção/inflamação, os macrófagos produzem substâncias chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO) tais como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio. Estas podem atuar diretamente na morte do patógeno ou como mensageiros secundários na sinalização celular, como na via do NF-kB (FISHER, 2009).

Os macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio a partir de enzimas. Uma delas é composta pelo complexo enzimático da NADPH oxidase, este pode ser ativado quanto ocorre fagocitose. A ativação pode ocorrer por várias vias, como pelo reconhecimento do LPS, PMA (*phorbol miristato acetato*), IFN γ (*interferon gama*), entre outros, que aumentam a disponibilidade de oxigênio (hiperóxia) ou liberação de angiotensina II (FORMAN & TORRES, 2001) desencadeando o processo de fosforilação e ativação da NADPH oxidase.

1.8 Ativação do fator NF-kB alterada pela desnutrição e obesidade

Estudos evidenciam que a ativação do fator de transcrição NF-kB é reduzida em camundongos submetidos a desnutrição protéica. Fatores como a queda na produção de peróxido de hidrogênio (BORELLI & NARDINELLI, 2001; CRISMA, 2010; FERNANDEZ *et al.*, 1999; TESHIMA *et al.*, 1995) e também a queda na produção de citocinas, como o TNF α (FOCK *et al.*, 2007; REDMOND *et al.*, 1991; STAPLETON *et al.*, 2001) estão envolvidos nessa redução da ativação, pois são comprovadamente importantes para a ativação do fator nuclear NF-kB (BOWIE & O'NEILL, 2000; FLOHÉ, 1997; OLIVEIRA-MARQUES *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2001). Em animais submetidos a dietas hiperlipídicas, foi encontrado uma maior expressão do fator NF-kB e consequente produção de citocinas pró-inflamatórias (CARLSEN *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

Considerando que a desnutrição e a obesidade podem gerar alterações semelhantes em determinados parâmetros da imunidade inata, propusemo-nos, em um modelo animal comparativo entre desnutrição e obesidade, investigar os efeitos da ingestão de uma dieta hipoprotéica e de uma dieta hiperlipídica sobre a atividade de macrófagos peritoniais. Para tanto:

- Desenvolvemos um modelo experimental de dieta hiperlipídica em camundongos;
- Analisamos o quadro nutricional: consumo de ração, proteínas, lipídios, calorias, bem como a variação de peso corporal dos camundongos;
- Avaliamos a concentração sérica de leptina, adiponectina, resistina, glicose, insulina, colesterol total, triacilgliceróis, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, proteína C reativa e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1);
- Avaliamos a função dos macrófagos peritoniais, através da análise de adesão, espriamento, fagocitose, *killing*, produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio, bem como a produção de citocinas;
- Avaliamos o tecido adiposo periepididimal quanto à variação no tamanho do tecido, infiltração de macrófagos e produção de citocinas (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Utilizamos camundongos *Swiss webster*, machos, com 2 a 3 meses de idade, não isogênicos, adultos, provenientes do Biotério de Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram separados em: animais controle (C), animais submetidos à dieta hipoprotéica (D) e submetidos à dieta hiperlipídica (HL). O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso em Animais da FCF/USP (Protocolo: CEUA/FCF/366).

3.2 Rações

As rações controle, hipoprotéica e hiperlipídica foram preparadas em nosso laboratório e conservadas a -4°C até o momento do uso. As rações foram preparadas para camundongos adultos, de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN – 93M) (REEVES *et al.*,1993). A quantidade de tert-butilhidroquinona foi aumentada em razão da maior susceptibilidade da ração hiperlipídica à oxidação (PANG *et al.*, 2008) (Tabela 1).

Tabela 1: Composição das Rações (g/Kg ração)

Constituintes	Controle	Hipoprotéica	Hiperlipídica
Amido	640	740	193,38
Sacarose	100	100	133,56
Caseína	120	20	186,98
Óleo de Milho	80	80	53,42
Banha de porco	--	--	300
Celulose	50	50	66,78
Mistura salínica¹	35	35	46,74
Mistura vitamínica¹	10	10	13,36
Metionina	1,8	1,8	2,4
Bitartarato de Colina	2,5	2,5	3,34
Tert-butilhidroquinona	0,01	0,01	0,04

¹As misturas salínica e vitamínica foram preparadas sob encomenda de acordo com as recomendações de 1993 do Instituto Americano de Nutrição para camundongos adultos (REEVES *et al.*,1993).

Tabela 2 - Composição da Mistura Salínica (MIX)

Componentes	Ração	Ração	Ração
	Normoprotéica (g/Kg de Mix)	Hipoprotéica (g/Kg de Mix)	Hiperlipídica (g/Kg de Mix)
Carbonato de cálcio anidro	357,0	357,0	357,0
Fosfato de potássio monobásico	236,2	353,2	250,0
Cloreto de sódio	74,0	74,0	74,0
Citrato de potássio	39,0	0	28,0
Sulfato de potássio	46,6	46,6	46,6
Óxido de magnésio	24,0	24,0	24,0
Citrato férrico	6,06	6,06	6,06
Carbonato de zinco	1,65	1,65	1,65
Carbonato de manganês	0,63	0,63	0,63
Carbonato cúprico	0,30	0,30	0,30
Iodato de potássio	0,01	0,01	0,01
Selenito de sódio anidro	0,01025	0,01025	0,01025
Paramobilidato de amônio tetrahidratado	0,00795	0,00795	0,00795
Meta-silicato de sódio 9- hidratado	1,45	1,45	1,45
Sulfato de potássio e crômo	0,275	0,275	0,275
Cloreto de lítio	0,0174	0,0174	0,0174
Ácido bórico	0,0815	0,0815	0,0815
Fluoreto de sódio	0,0635	0,0635	0,0635
Carbonato de níquel	0,0318	0,0318	0,0318
Vanadato de amônio	0,0066	0,0066	0,0066
Sacarose	212,646	134,596	209,8

Composição da mistura salínica para as dietas de acordo com o Instituto Americano de Nutrição (REEVES *et al.*, 1993).

As rações hipoprotéica e controle são isocalóricas, sendo que na hipoprotéica há 2% de proteínas em comparação a 12% da ração controle. A ração hiperlipídica apresenta 30% de gordura na forma de banha de porco e todos os outros ingredientes foram aumentados em 33% para oferecer uma proporção equilibrada de nutrientes em relação ao controle pois, em projeto piloto, verificamos que o consumo de ração nos animais submetidos à dieta hiperlipídica era inferior ao controle nesta proporção (BORGES, 2011; CARMO, 2012).

Tabela 3 - Composição da Mistura Vitamínica

Componentes	Rações Normoprotéica, Hipoprotéica e Hiperlipídica	
	g/Kg de mix	
Ácido nicotínico	3,00	
Pantotenato de cálcio	1,60	
Piridoxina-HCl	0,70	
Tiamina-HCl	0,60	
Riboflavina	0,60	
Ácido fólico	0,20	
D-biotina	0,02	
Vitamina B12	2,50	
Vitamina E	15,00	
Vitamina A	0,80	
Vitamina D ₃	0,25	
Vitamina K	0,075	
Sacarose	974,655	

Composição da mistura vitamínica para as dietas de acordo com o Instituto Americano de Nutrição (REEVES *et al.*, 1993).

3.3 Indução às dietas hipoprotéica e hiperlipídica

Os animais foram alocados individualmente em gaioleiros metabólicos sob condições ambientais semelhantes, com ciclo de luz claro/escuro de 12/12h, temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de $55 \pm 10\%$. O período de adaptação aos gaioleiros foi de 10-15 dias (até que o peso corporal se estabilizasse). Neste período os animais receberam ração controle (normoprotéica) e água *ad libitum*,

sendo pesados a cada 48 horas para avaliação do peso corporal. Após o período de adaptação os animais foram separados em 3 grupos: *Controle*, *Desnutrido* e *Hiperlipídico*, sendo a média de peso corporal (após período de adaptação) do Grupo Controle estatisticamente semelhante ao do Grupo Desnutrido e Hiperlipídico. O Grupo Controle continuou a receber a ração controle enquanto que o Desnutrido passou a receber ração hipoprotéica e o Hiperlipídico passou a receber a ração hiperlipídica. Durante todo experimento, o peso corporal e de ração foram avaliados em intervalos de 48 horas.

A avaliação do estado nutricional dos animais foi baseada na determinação do peso corporal e consumo diário das rações, obtido através da diferença entre quantidade de ração fornecida e ingerida e na determinação de proteína e albumina plasmática.

Tabela 4 – Rações e grupos

GRUPOS	RAÇÃO UTILIZADA EM CADA PERÍODO	
	Adaptação (10-15 dias)	Indução (5-6 semanas)
Grupo Controle (C)	Ração controle	Ração controle
Grupo Desnutrido (D)	Ração controle	Ração hipoprotéica
Grupo Hiperlipídico (HL)	Ração controle	Ração hiperlipídica

3.4 Obtenção das amostras biológicas

3.4.1 Amostras sanguíneas

Foram obtidas amostras de sangue total por meio da punção do plexo axilar de camundongos previamente anestesiados com xilazina (16 mg/Kg) e cetamina (120 mg/Kg). As amostras foram coletadas utilizando-se como anticoagulante o sal potássico do ácido etileno diaminotetracético (EDTA), 10% na proporção de 50 µL para cada 1,0 mL de sangue e utilizadas para realização do hemograma e contagem de reticulócitos.

As amostras sanguíneas coletadas, dos animais de ambos os grupos, sem anticoagulante, foram utilizadas para obtenção do soro, separado por centrifugação (1.500 rpm por 10 minutos a 4°C) e congelado em alíquotas a -40°C e utilizadas para determinação de insulina, colesterol total e frações, triacilgliceróis, leptina, adiponectina, resistina, TNF α , IL-6 e MCP-1.

3.4.2 Adipócitos

Posteriormente a coleta do sangue e a eutanásia, os coxins adiposos retroperitoneal e periepididimal, foram dissecados e, imediatamente, pesados. O tecido adiposo periepididimal colhido foi mergulhado em 3 ml de meio de cultura DMEM. O tecido adiposo foi seccionado em pedaços pequenos até apresentar consistência homogênea, aumentando a área de contato com o meio. Depois da fragmentação, o tecido foi transferido para um tubo coletor e foi adicionado 2,5 ml de meio para cada 1g de tecido adiposo. A cultura foi colocada em banho-maria 37°C, sob leve agitação por 30 minutos. Após essa incubação, as células foram transferidas para um tubo de 50 ml filtrando através de uma malha fina. Depois foi adicionado meio para um volume final de 25 ml. A amostra foi centrifugada a 400g por 30 segundos. Após a centrifugação, os adipócitos ficam na superfície e as células estromais no sedimento. Foi aspirado cuidadosamente o sedimento. Caso necessário, o procedimento era repetido para melhor lavagem dos adipócitos (PERES & CURI, 2005).

3.5 Análises hematológicas

3.5.1 Hemograma e contagem de reticulócitos

A partir de sangue total foram realizados o hemograma e contagem de reticulócitos. A dosagem de hemoglobina, determinação do volume do hematócrito e contagem global de hemácias e leucócitos foram feitas pelo analisador automático de células sanguíneas ABC Vet® (ABX DIAGNOSTICS).

Utilizando-se a relação entre hematócrito, hemoglobina e contagem de eritrócitos foram possíveis calcular os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

As contagens diferenciais dos leucócitos foram feitas em extensões sanguíneas preparadas imediatamente após a coleta e coradas pelo corante de May-Grunwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, contando-se no mínimo 100 leucócitos.

3.6 Obtenção de macrófagos peritoniais

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical após sobrecarga de anestésico (conforme item 3.4.1) e exsanguinados por venossecção. Em ambiente de fluxo laminar foram introduzidos 5 mL de PBS (para dosagem de peróxido de hidrogênio) ou meio McCoy's 5A® modificado (para cultura celular), pH 7,4, estéril e apirogênico, na cavidade peritoneal. Depois de vigorosa massagem na região, aspirou-se, em seguida, o lavado contendo as células.

3.6.1 Cultura de células mononucleares peritoniais

As células foram inicialmente plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/mL/poço em placas de cultura de 24 poços, durante 1 hora a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após este período, o sobrenadante foi retirado a fim de remover as células não aderentes e em seguida foi adicionado meio de cultura. As amostras foram cultivadas por 24 horas em meio RPMI 1640, pH 7,4, estéril, apirogênico, com soro fetal bovino (10%). Após 24 hs, as células foram incubadas com 1,25 µg/mL de LPS de *Escherichia coli*, sorotipo 055:B5 (Sigma Chemical Company®, USA), durante 30 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e armazenado em freezer a -40°C, para determinação da concentração de citocinas presente no sobrenadante das culturas celulares e realizada pelo método de ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) – kits R&D Systems®.

3.7 Viabilidade celular

A viabilidade da suspensão celular foi avaliada em câmara de Neubauer, utilizando o azul de tripan 0,1%. Foram utilizadas as amostras que apresentaram viabilidade acima de 90%.

3.8 Análise morfológica e caracterização imunofenotípica das células do lavado peritoneal

A análise morfológica foi realizada em lâmina obtida por meio de citocentrifugação de células do lavado peritoneal, coradas com método de May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947) e analisadas em microscópio

óptico para identificar e quantificar os tipos celulares, contando-se 200 células por lâmina, no mínimo.

A caracterização imunofenotípica foi realizada por citometria de fluxo. Alíquotas de 1×10^5 células/mL de suspensão celular da amostra de células do lavado peritoneal de camundongos controles, desnutridos e hiperlipídicos, suspensas em meio RPMI 1640 (Cultilab[®], Campinas, Brasil), pH 7,4, foram centrifugadas a 1500 rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi desprezado por inversão. Adicionou-se anticorpos e incubou-se por 30 minutos com 2 μ L anticorpo APC-F4/80 (Cat 113006, lot # b146514 Biologend[®]) e/ ou 2 μ L anticorpo FITC-CD11b (Cat 11-0112-82, lot# E033743 e-Bioscience[®]), sob agitação, protegido da luz. Após a incubação as amostras foram lavadas e adicionou-se 500 μ L de PBS e imediatamente realizou-se a aquisição no FACSCanto II (Becton Dickson[®], NJ, USA) adquirindo 10.000 eventos. As aquisições foram analisadas e compensadas pelo software FLOW JO 7.6 [®] (TreeStar[®], OR, USA).

3.9 Avaliação da capacidade de adesão de células da cavidade peritoneal

As células da cavidade peritoneal foram plaqueadas em placa de 96 poços na concentração de $1 \times 10^5/150$ μ L e incubadas durante 1 hora, a 37°C, 5% CO₂ e em atmosfera úmida. Depois disso foi feita a lavagem com meio de cultura para remover células não aderentes. As células aderidas foram cultivadas na presença ou ausência de 1,25 μ L/mL de LPS (sorotipo O55:B5. SIGMA-ALDRICH[®]), durante 2 e 24 horas a 37°C, 5% CO₂ e em atmosfera úmida. A quantidade de células aderidas foi avaliada pelo método do cristal violeta (LEE & WARREN, 1987). Os poços foram lavados com PBS pH 7,4 e as células fixadas com 30 μ L de paraformaldeído 4% durante 10 minutos, em temperatura ambiente. Após a fixação, 50 μ L de solução de cristal violeta em metanol (0,25 g de cristal violeta; 10 mL de metanol PA; 40 mL de água deionizada) foi adicionado em cada poço. A placa foi mantida ao abrigo da luz, durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Após lavagem dos poços com PBS pH 7,4, adicionou-se 50 μ L de citrato de sódio 0,1M pH 4,2. O sobrenadante foi transferido para outra placa e sua absorbância determinada em comprimento de onda de 550 nm. Os resultados foram expressos em absorbância/ 1×10^5 células.

3.10 Teste de espiamento de células da cavidade peritoneal

As células da cavidade peritoneal foram plaqueadas na concentração de 5×10^5 /mL em placa de cultura de 24 poços contendo, em cada poço, uma lamínula de vidro circular e estéril (13-16 mm de diâmetro). A placa foi incubada durante 1 hora, a 37°C, 5% CO₂ e em atmosfera úmida. Após este tempo, os poços foram lavados com meio de cultura a fim de se remover as células não aderentes (PAPADIMETRIOU & BRUGGEN, 1988). As células aderidas foram cultivadas na presença ou ausência de 1,25 µg/mL de LPS (sorotipo O55:B5. SIGMA-ALDRICH®), por 2 e 24 horas a 37°C e 5% CO₂. Após a incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS pH 7,4 e coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947) para avaliação morfológica das células presentes na preparação. Considerou-se como células espiadas aquelas que estavam aderidas à lamínula emitindo pseudópodes (RABINOVITCH & DESTEFANO, 1973).

3.11 Avaliação da fagocitose e da atividade fungicida, *in vitro*, de células da cavidade peritoneal

3.11.1 Obtenção de soro homólogo normal (SHN)

Foram utilizados 10 camundongos Swiss webster, machos, adultos. Após anestesia e, por punção axilar, sem uso de anticoagulante, foi retirado o sangue que após retração do coágulo, foi centrifugado (2.000 rpm, por 20 minutos, a 4°C) para obtenção do soro. Com as amostras constituiu-se um *pool*, que foi filtrado e esterilizado em condições assépticas, utilizando-se membrana de 0,22 µm, e posteriormente fracionado em volumes de 2 mL e armazenado a -80°C até o uso. O soro obtido foi usado para opsonização de *Candida albicans*. Todo o processamento foi feito em condições assépticas, sendo os materiais utilizados todos estéreis.

3.11.2 Preparo e opsonização da suspensão de *Candida albicans*

As leveduras foram obtidas após cultura de 24 horas em meio ágar-Sabouraud (Difco®). A suspensão de *Candida albicans* (ATCC 90028) foi preparada em 3 mL de tampão PBS Dulbecco estéril (pH 7,4) e mantida durante 3 minutos em tubo Falcon®. Após este tempo, o sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo Falcon®

constituindo a **Suspensão A**. A partir da suspensão A foi preparada uma nova suspensão de *Candida albicans* em PBS Dulbecco estéril (pH 7,4) e SHN, perfazendo um total de $3,75 \times 10^6/1,5$ mL, constituindo a **Suspensão B**. Esta suspensão foi incubada a 37°C, sob agitação de 10 rpm, durante 30 minutos.

3.11.3 Obtenção da suspensão de células peritoniais

Animais anestesiados conforme descrito no item 3.4 foram exsanguinados por venossecção e eutanasiados por deslocamento cervical. Células da cavidade peritoneal foram obtidas de acordo com o descrito no item 3.6. A suspensão de células foi ajustada para a concentração de $0,75 \times 10^6/\text{mL}$ e mantida no gelo até o momento do uso (**Suspensão C**).

3.11.4 Ensaios de fagocitose e de atividade fungicida

Em microtubos estéreis, foram adicionadas as suspensões B e C na proporção de 1:5, constituindo-se assim a **Suspensão D**. Os tubos foram incubados a 37°C, em sistema rotatório, à velocidade de 10 rpm, durante 30, 60, 90 e 120 minutos. Como controle da reação foram utilizados tubos contendo PBS Dulbecco estéril (pH 7,4) e apenas a suspensão de células do lavado peritoneal (**Suspensão C**). Após os tempos acima mencionados, alíquotas da Suspensão D foram retiradas e utilizadas para o preparo de citocentrifugados, corados posteriormente pela técnica de May-Grunwald-Giemsa modificada (ROSENFELD, 1947). Para avaliação da fagocitose, foram contadas, no mínimo, 200 células por lâmina, sendo consideradas como tendo realizado fagocitose as células que apresentaram, pelo menos, uma *Candida albicans* internalizada. A atividade fungicida foi avaliada pela técnica de coloração proposta por HERSCOWITZ e colaboradores (1981). Nesta técnica, leveduras vivas coram-se de azul pelo corante May-Grunwald-Giemsa, enquanto as leveduras mortas não se coram. A atividade fungicida foi avaliada contando-se, no mínimo, 200 células que fagocitaram *Candida albicans*. Como o número de leveduras fagocitadas e mortas varia de célula para célula, a atividade fungicida foi expressa por meio de **score** conforme critério estabelecido por CORAZZINI (1993).

Nº de macrófagos sem <i>C. albicans</i> morta X 0
Nº de macrófagos com 1 a 2 <i>C. albicans</i> mortas X 1
Nº de macrófagos com 3 a 4 <i>C. albicans</i> mortas X 2
Nº de macrófagos com +4 de <i>C. albicans</i> mortas X 3

3.12 Determinação de síntese de óxido nítrico

A análise da síntese de óxido nítrico foi realizada pelo método de GRIESS (1879), onde o sobrenadante de cultura de macrófagos obtido após 24 horas é submetido à detecção colorimétrica para avaliar a conversão de óxido nítrico em nitrito.

3.13 Determinação da liberação de peróxido de hidrogênio

A determinação de peróxido de hidrogênio foi realizada pelo método de oxidação da peroxidase dependente do vermelho de fenol descrito por PICK & KEISARI (1980), adaptado para micro-ensaio por PICK & MIZEL (1981) e modificado por RUSSO e colaboradores (1989). Foram obtidas alíquotas de uma suspensão de células peritoniais (2×10^6 células/mL em solução de vermelho de fenol) que foram transferidas para uma placa de cultura de fundo chato (96 poços). Cada amostra foi pipetada em octuplicata, sendo que em quatro dos poços foi acrescentado 10ng de acetato miristato de forbol (PMA) (SIGMA ALDRICH®) diluído em dimetil sulfóxido (DMSO), de modo a se obter uma concentração final de 10 ng/poço. A placa foi incubada em estufa a 37°C, 5% CO₂, durante 1h. Após este tempo, o sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços e a reação foi interrompida pela adição de NaOH 1N. A absorbância foi determinada em um leitor de ELISA em 630 nm contra um branco constituído pela solução de vermelho de fenol. A concentração de peróxido de hidrogênio das amostras foi obtida com base em uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio em uma solução de vermelho de fenol (5, 10, 20 e 40 uM) e expressas em nmol/ 2×10^5 células.

3.14 Avaliação da capacidade de apresentação de antígenos

Realizamos por citometria de fluxo a avaliação da capacidade de apresentação de antígenos pelos macrófagos peritoniais. Após caracterizar a

população pela dupla marcação com anticorpos CD11b e F4/80, utilizamos este gate para avaliar a marcação com 3µl do anticorpo PE-MHC-II (Cat 11-3206-2, lot # E134551) conforme metodologia descrita no item 3.8.

3.15 Determinação da concentração sérica de glicose, colesterol total, triacilgliceróis, proteínas totais e albumina

A concentração sérica de glicose, colesterol total, triacilgliceróis, proteínas totais e albumina foi quantificada por meio de *kits* (Labtest®, Brasil) segundo as instruções do fabricante. As amostras foram processadas em duplicata.

3.16 Determinação das concentrações séricas de insulina, leptina, resistina, adiponectina e proteína C reativa

As concentrações séricas de insulina, leptina, resistina e adiponectina foram quantificadas utilizando-se o *kit* Lincoplex® (Linco Research Inc.®, St. Charles, MO), seguindo-se as instruções do fabricante.

3.17 Avaliação da síntese de citocinas

A análise de citocinas foi realizada em amostras do sobrenadante de cultura de células peritoniais e de adipócitos do tecido adiposo periepídidimo obtido após 2 e 24 horas de cultivo. A concentração de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF α foi determinada por meio de imunoensaio do tipo ELISA, utilizando-se *kit* Quantikine® (R&D System®, USA), segundo metodologia descrita pelo fabricante.

3.18 Avaliação Histológica

Após eutanásia, conforme item 3.4, procedemos a retirada do esterno e do tecido adiposo periepídidimo (TAP). O TAP coletado foi fixado em Carnoy por 1 hora, sob agitação. Posteriormente foi colocado em álcool 70% até ser processado. O esterno foi fixado em paraformaldeído 4% por 1 dia, sob agitação. Após este período, o esterno foi colocado em EDTA 10% onde permaneceu por 7 dias. Depois foi colocado em álcool 70% até o momento de realizar o corte histológico. Os tecidos foram

enblocados em parafina e os cortes (aproximadamente 5 μm) foram corados com Hematoxilina-Eosina (H/E) e fotografados em microscópio óptico.

3.19 Avaliação do Índice de Massa Corporal murino

Realizamos o índice de massa corporal pelo Índice de Lee (ROGERS & WEBB, 1980), onde utilizamos a seguinte relação: [peso ($\text{g}^{0,33}$)/ medida naso-anal (mm)]. Esses valores podem caracterizar a variação da massa dos camundongos após o período de indução a desnutrição ou obesidade.

3.20 Aminograma

Foram enviadas alíquotas de 200 μl de soro dos animais dos três grupos para a empresa CBO Análises Laboratoriais® que realizou o aminograma para avaliar as diferenças entre os aminoácidos referentes à diferença de ingestão protéica.

3.21 Avaliação radiográfica da proporção de tecido adiposo

As radiografias foram realizadas no Centro de Imagem Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, utilizando o Carestream *In Vivo* MS FX PRO®. Após a aquisição das imagens, foi realizada a medida dos órgãos e gordura pelo programa *Carestream MI*®.

3.22. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o programa GraphPadPrism5®. Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade de sua distribuição (curva Gaussiana) sendo classificados em paramétricos ou não paramétricos pela aderência à curva. Em casos de distribuição não gaussiana realizou-se o One-way ANOVA pelo teste de Kruskal Wallis, utilizando-se o pós-teste de Dunns para a identificação dos contrastes significantes entre os três grupos.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação do estado nutricional

4.1.1 Análise do peso corporal

Após um período de 10-15 dias de adaptação, os animais foram separados em grupos controle, desnutrido e hiperlipídico, sendo que a média de peso corporal dos três grupos foi estatisticamente semelhante. Ao final do período de indução de 5 semanas, o grupo C (controle) apresentou ganho de peso de $6,4 \pm 2,7\%$ (média \pm SDM), o grupo D (desnutrido) teve perda de peso de $16,6 \pm 3,7\%$ (média \pm SDM) e o grupo HL (hiperlipídico) teve ganho de peso de $20,0 \pm 8,0\%$ (média \pm SDM).

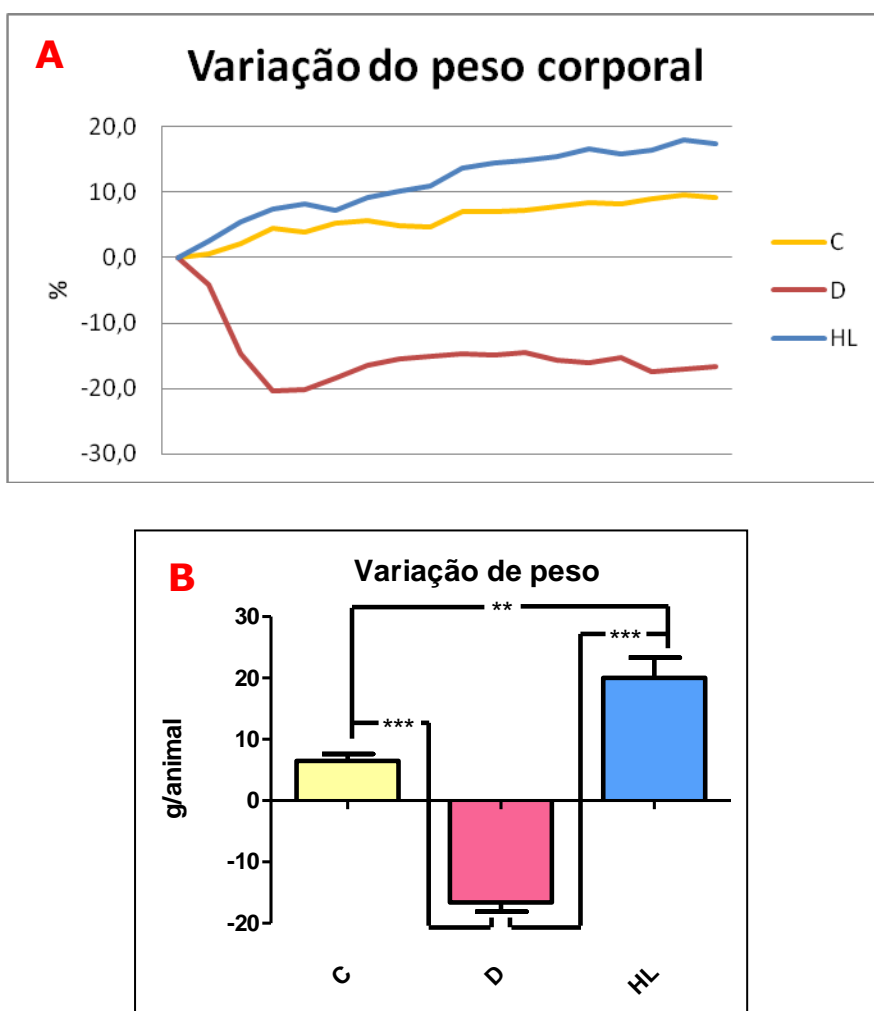


Figura 3. Resultados representam variação de peso corporal em função do tempo (A) e variação final do peso corporal (média \pm SDM) (B) dos grupos C - Controle (n=7), D - Desnutrido (n=7) e HL - Hiperlipídico (n=7). ** Valores significativos para $p < 0,01$; *** Valores significativos para $p < 0,001$. n representa número de animais avaliados.

4.1.2 Análise do consumo de ração, proteínas, lipídios e calorias

Os animais passaram por um período de 5 semanas de indução, onde o grupo C (controle) ingeriu quantidade de ração diária semelhante ao grupo D (desnutrido): $7,21 \pm 0,5g$ e $7,5 \pm 0,9g$ (média \pm SDM - *standard deviation*), respectivamente. O grupo HL (hiperlipídico) apresentou consumo diário inferior $5,1 \pm 0,6g$ aos demais grupos.

Mesmo com consumo de ração diferente, os 3 grupos apresentaram consumo de calorias diárias semelhante: controle = $28,7 \pm 2,3$ kcal; desnutrido = $30,1 \pm 3,6$ kcal; hiperlipídico = $28,2 \pm 3,1$ kcal.

O modelo de desnutrição é induzido pelo consumo reduzido de proteínas. Enquanto o grupo C consumia uma média diária de $0,96g \pm 0,05$ e o grupo HL consumiu $0,87g \pm 0,04$, tivemos o consumo de apenas $0,21g \pm 0,02$ pelo grupo D.

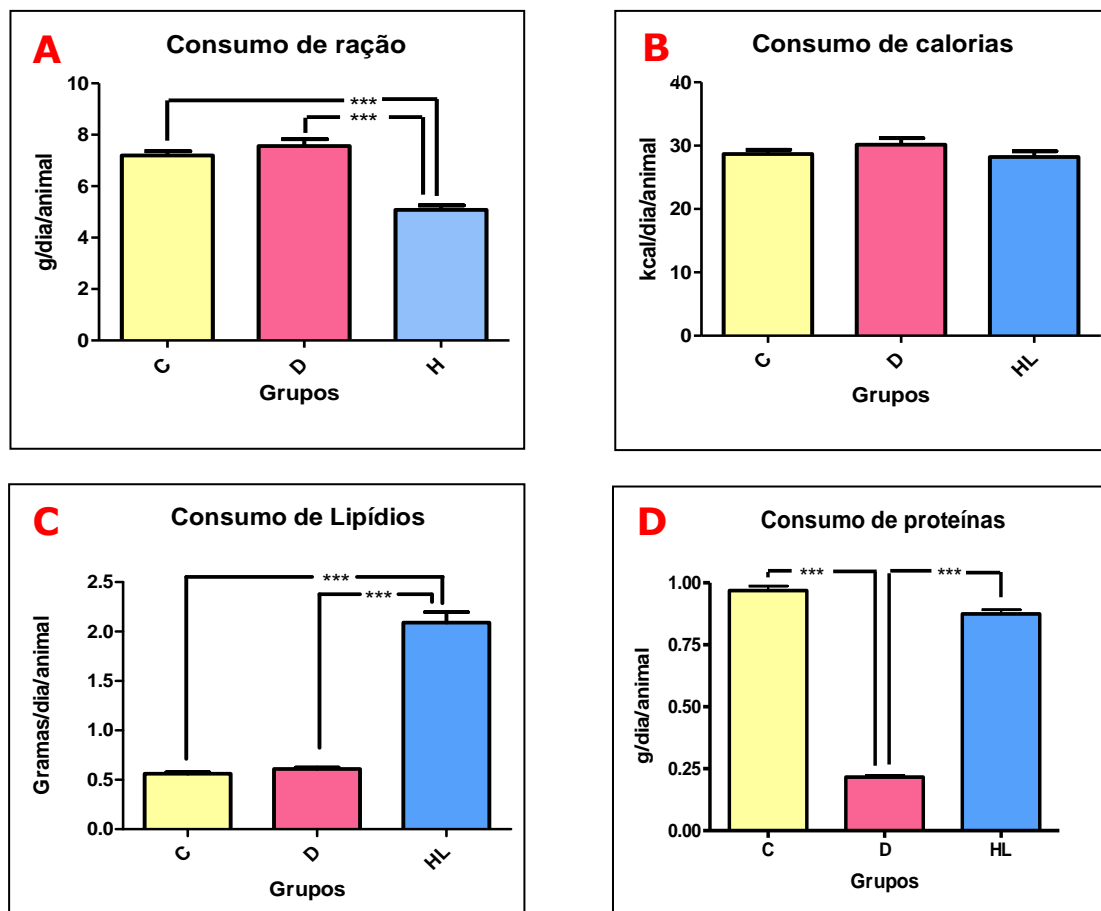


Figura 4. Resultados, em valores médios \pm SDM, do consumo de ração (A), calorias (B), lipídios (C) e proteínas (D) dos grupos C - Controle (n=7), D - Desnutrido (n=7) e HL - Hiperlipídico (n=7). ***Valores significativos para $p < 0,001$. n representa número de animais avaliados.

4.1.3 Avaliação dos coxins adiposos: periepididimal e retroperitoneal

O peso total dos coxins adiposos não apresentou diferenças significativas entre o grupo C ($2,6 \pm 5,8g$) e o D ($1,6 \pm 0,5g$), já no grupo HL encontrou-se com valores estatisticamente superiores ($3,4 \pm 1,1g$). O grupo C apresentou gordura periepididimal de $2,02 \pm 0,6g$, enquanto que o D apresentou $1,28 \pm 0,4g$ e o HL com $2,7 \pm 0,7g$. Em relação a gordura retroperitoneal, tivemos o grupo C com $0,61 \pm 0,30g$; o grupo D com $0,38 \pm 0,12g$ e o grupo HL com $0,90 \pm 0,28g$.

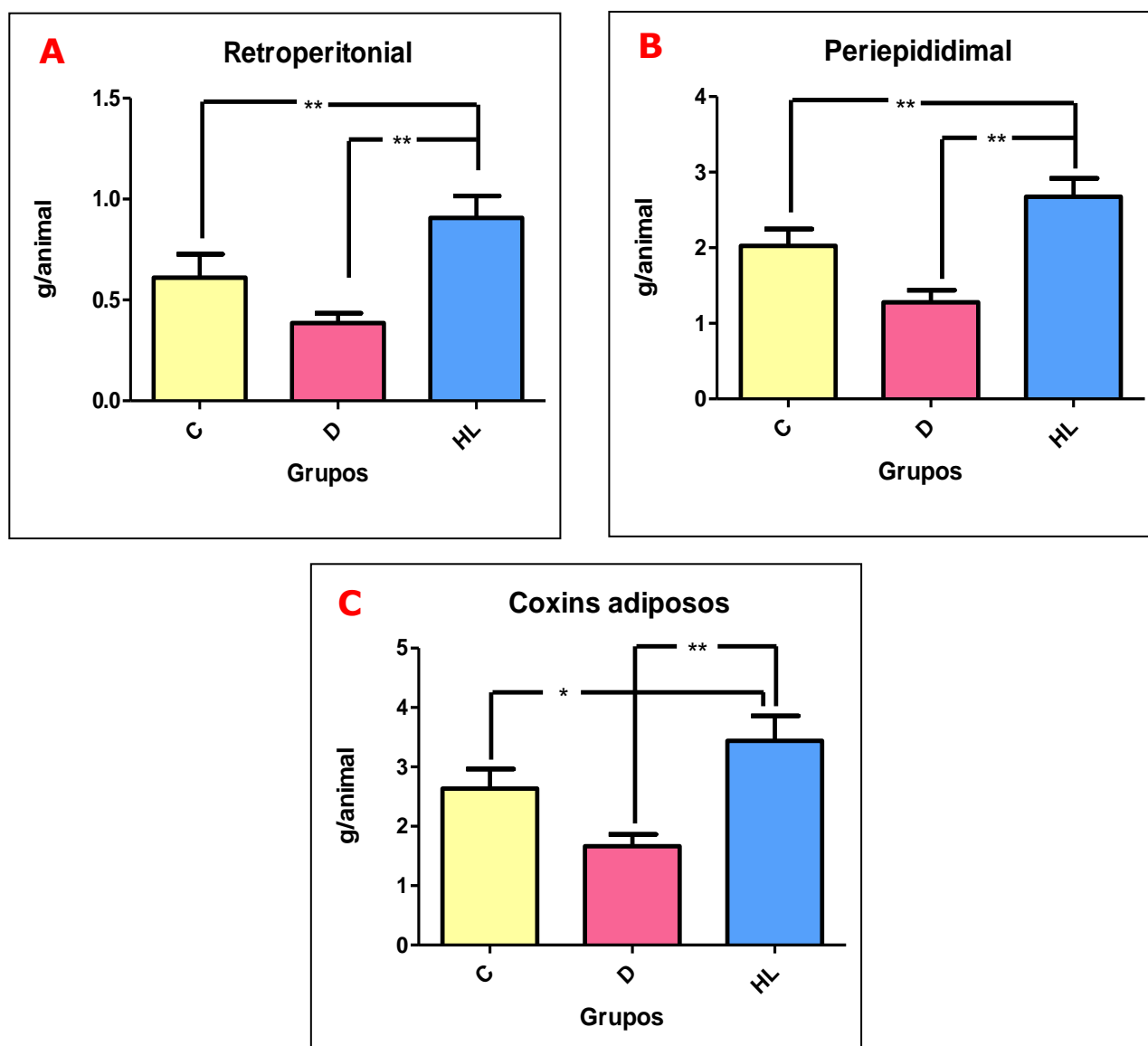


Figura 5. Resultados, em valores médios±SDM, do peso dos coxins adiposos retroperitoneal (A), periepididimal (B) e total (C) dos grupos C - Controle (n=7), D - Desnutrido (n=7) e HL - Hiperlipídico (n=7). *Valores significativos para $p < 0,05$; ** Valores significativos para $p < 0,01$. n representa número de animais.

4.1.4 Avaliação histológica do tecido adiposo periepididimal

Ao avaliarmos os cortes histológicos identificamos um maior infiltrado celular entre os adipócitos nos animais do grupo hiperlipídico, não havendo diferença aparente entre os grupos controle e desnutrido.

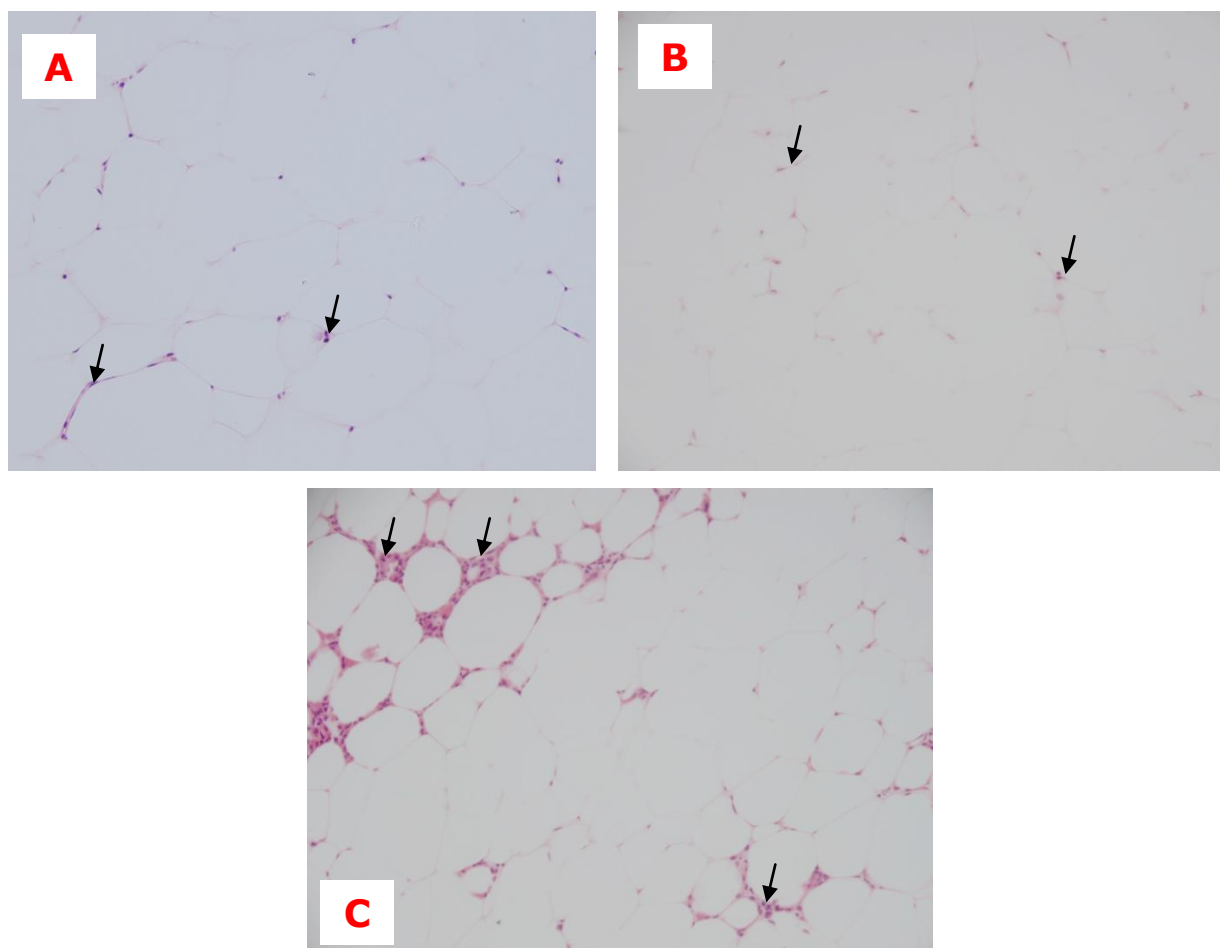


Figura 6 – Fotomicrografia representativa de corte histológico corado com hematoxilina-eosina do coxim adiposo epididimal dos grupos Controle (A), Desnutrido (B) e Hiperlipídico (C) mostrando infiltrado celular entre os adipócitos, como mostram as setas (Aumento de 200x).

4.1.5 Índice de Lee

O índice de massa corpórea de ratos e camundongos é realizado pelo índice de Lee [peso ($\text{g}^{0,33}$)/ medida naso-anal (mm)]. Os animais submetidos a dieta hiperlipídica tiveram um índice mais elevado ($3,8 \pm 0,10$), sendo significativamente maior que o grupo controle ($3,4 \pm 0,10$) e o grupo desnutrido ($3,1 \pm 0,14$).

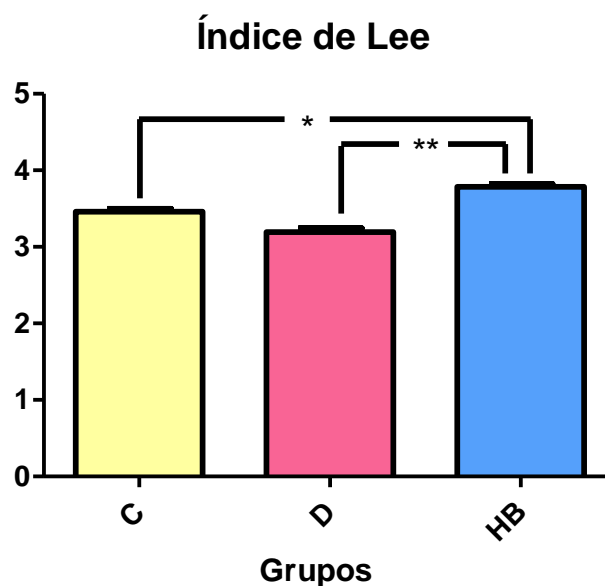


Figura 7 – Resultados, em valores médios \pm SDM, do Índice de Lee dos grupos C - Controle (n=6), D - Desnutrido (n=6) e HL - Hiperlipídico (n=6). *Valores significativos para $p < 0,05$; ** Valores significativos para $p < 0,01$. n representa número de animais.

4.1.6 Avaliação radiográfica da proporção de tecido adiposo

Realizamos as radiografias de animais dos 3 grupos, onde pudemos observar que nos animais submetidos a uma dieta hiperlipídica, encontramos uma maior massa total (3.557 mm^3) em relação ao controle (2.659 mm^3) e maior ainda em relação ao desnutrido (2.049 mm^3). A massa adiposa apresentou-se, de maneira semelhante, maior no grupo submetido a dieta hiperlipídica (842 mm^3) em relação ao controle (775 mm^3) e ao desnutrido (512 mm^3).

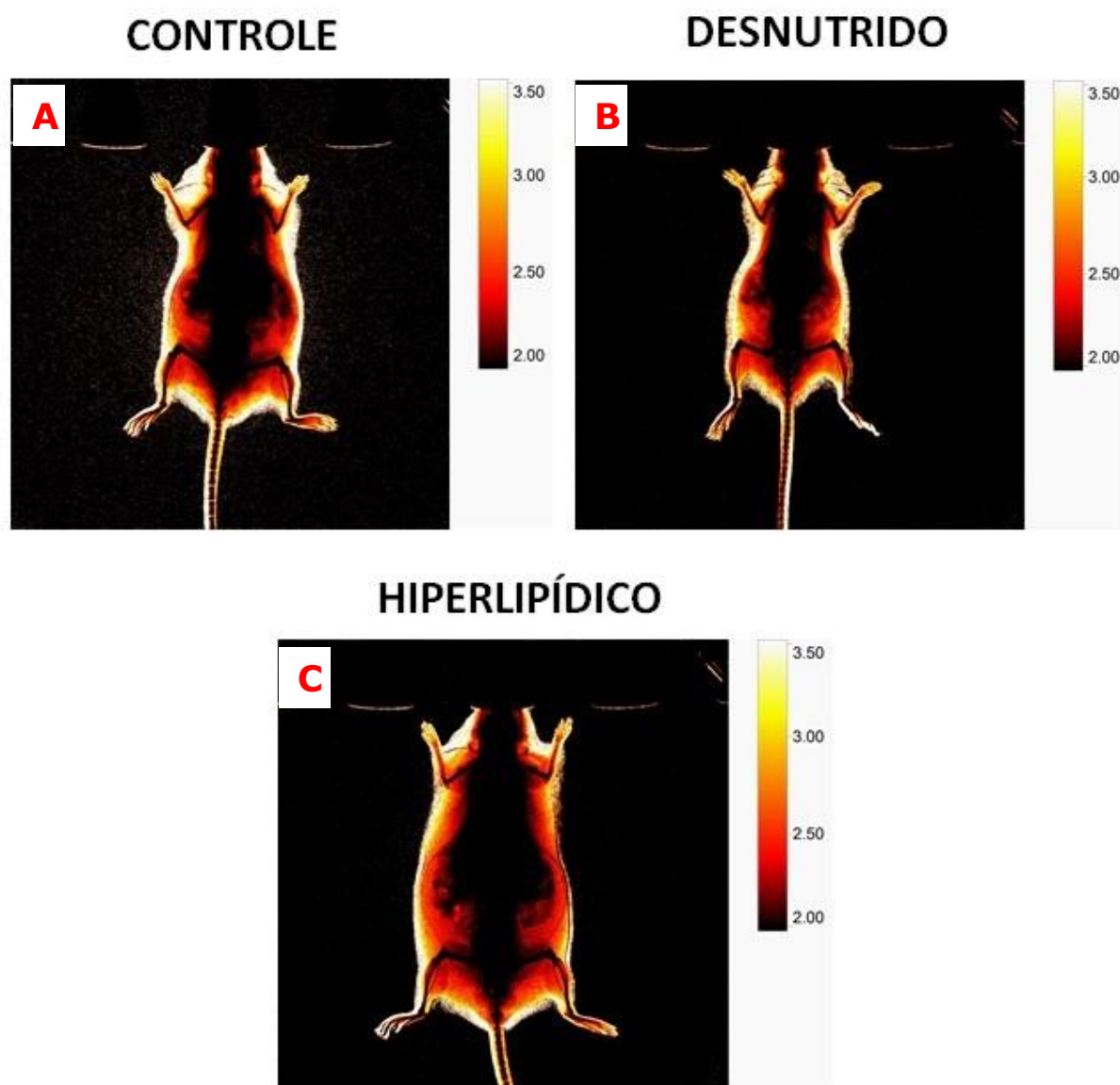


Figura 8 – Fotomicrografia representativa de radiografia dos grupos Controle (A), Desnutrido (B) e Hiperlipídico (C).

4.1.7 Avaliação da concentração sérica de proteínas totais e albumina

Os grupos C e HL apresentaram valores semelhantes em relação a concentração sérica de proteínas totais. O Grupo C apresentou $6,1 \pm 0,2$ g/dL e o Grupo HL apresentou $5,9 \pm 0,2$ g/dL. Já o grupo D teve uma concentração diminuída, apresentando $4,5 \pm 1,4$ g/dL.

Dados semelhantes foram vistos na concentração sérica de albumina, com o Grupo C apresentando $3,1 \pm 0,4$ g/dL e o Grupo HL apresentando $3,2 \pm 0,7$ g/dL. Semelhantemente, o grupo D teve valores mais baixos ($2,2 \pm 0,6$ g/dL).

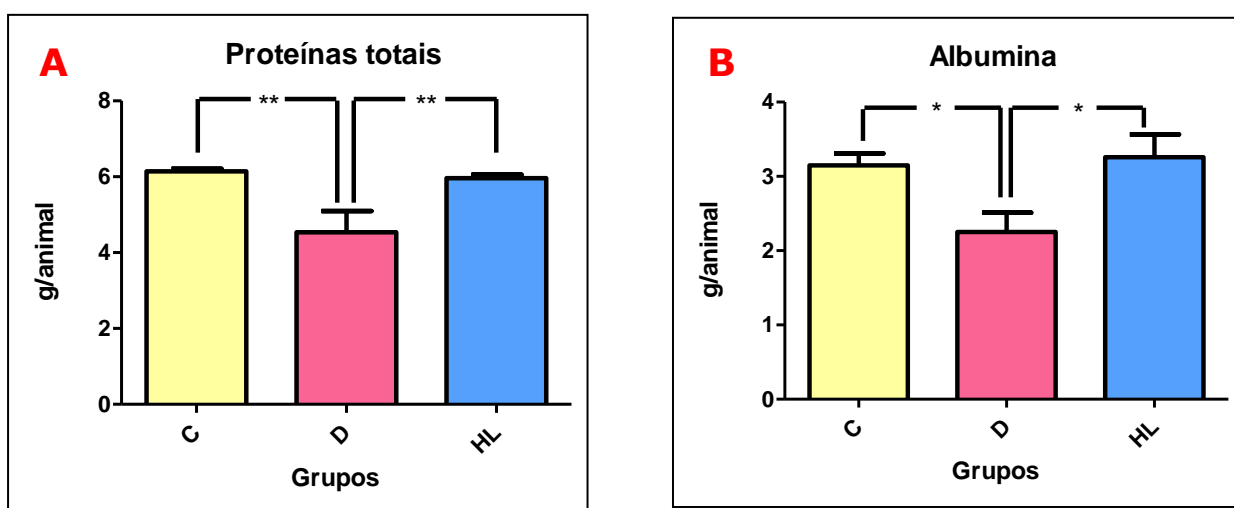


Figura 9. Resultados, em valores médios \pm SDM, da concentração sérica de proteínas totais (A) e de albumina (B) dos grupos C - Controle (n=7), D - Desnutrido (n=6) e HL - Hiperlipídico (n=7). ; *Valores significativos para $p < 0,05$; **Valores significativos para $p < 0,01$. n representa número de animais avaliados.

4.1.8 Aminograma

Realizamos o aminograma a partir do soro dos animais avaliados e registramos nas tabelas abaixo os valores absolutos e relativos dos grupos Controle, Desnutrido e Hiperlipídico.

Tabela 5 – Valores absolutos referente ao aminograma (mg/kg)

	Aminoácido	Controle (mg/kg)	Desnutrido (mg/kg)	Hiperlipídico (mg/kg)
1	Asparagina	5,6±1,4	6,4±0,9	8,6±3,4
2	Glutamina	62,1±11,5	86,4±13,1	84,0±15,1
3	Alanina	49,8±25,0	64,3±8,0	53,6±12,0
4	Arginina	38,9±21,1	36,5±20,1	41,7±19,4
5	Ac. Aspártico	13,5±17,9	6,5±7,1	11,3±7,4
6	Glicina	22,7±12,9	23,9±3,7	20,7±4,2
7	Isoleucina	17,3±10,2	10,5±0,6	15,0±3,4
8	Leucina	38,4±28,0	26,2±8,5	36,8±14,1
9	Ac. Glutâmico	29,1±26,1	21,4±12,2	32,3±12,4
10	Lisina	55,1±28,6	50,8±9,7	68,0±25,9
11	Cistina	16,8±9,8	14,0±9,8	20,4±14,5
12	Metionina	11,1±7,2	9,1±4,4	14,2±6,4
13	Fenilalanina	19,9±15,2	13,5±6,2	22,6±10,7
14	Tirosina	19,7±11,9	12,9±2,7	22,9±4,7
15	Treonina	23,3±13,9	20,3±8,3	33,0±12,3
16	Prolina	18,1±12,6	17,1±4,6	20,1±8,0
17	Valina	43,1±22,8	23,3±1,3	35,7±6,9
18	Histidina	13,3±12,7	15,2±10,1	19,1±10,6
19	Serina	21,1±14,5	26,3±6,9	28,2±12,1
20	Taurina	108,1±33,7	107,0±60,2	99,4±16,7
	AA livres	627,4±312	591,8±197	688,3±211

Resultados, em valores médios±SDM, dos valores absolutos (mg/kg) dos aminoácidos séricos de animais dos grupos Controle (n=4), Desnutrido (n=4) e Hiperlipídico (n=4).

Tabela 6 – Valores absolutos referente ao aminograma

	Aminoácido	Controle (%)	Desnutrido (%)	Hiperlipídico (%)
1	Asparagina	0,96±0,24	1,12±0,21	1,22±0,19
2	Glutamina	10,9±3,14	15,0±2,75	12,7±2,15
3	Alanina	7,90±0,77	11,27±2,38	7,96±1,02
4	Arginina	6,10±0,43	5,93±1,43	5,82±1,44
5	Ac. Aspártico	1,63±1,61	0,91±0,86	1,54±0,75
6	Glicina	3,58±0,62	4,16±0,73	3,08±0,34
7	Isoleucina	2,77±0,99	1,87±0,52	2,23±0,29
8	Leucina	5,86±2,02	4,45±0,02	5,26±0,45
9	Ac. Glutâmico	4,14±1,69	3,47±0,90	4,61±0,56
10	Lisina	8,70±1,11	8,79±1,28	9,73±0,78
11	Cistina	2,60±0,66	2,21±0,93	2,77±1,20
12	Metionina	1,67±0,30	1,51±0,25	2,00±0,33
13	Fenilalanina	2,94±0,85	2,23±0,30	3,16±0,62
14	Tirosina	3,11±0,82	2,22±0,27	3,42±0,81
15	Treonina	3,80±0,33	3,38±0,20	4,71±0,57
16	Prolina	2,27±0,52	2,92±0,19	2,87±0,29
17	Valina	7,05±2,57	4,20±1,65	5,36±0,91
18	Histidina	1,87±0,79	2,41±0,91	2,62±0,81
19	Serina	3,18±0,57	4,48±0,31	3,98±0,63
20	Taurina	18,6±6,54	17,3±4,44	15,0±3,42

Resultados, em valores médios±SDM, dos valores relativos (%) dos aminoácidos séricos de animais dos grupos Controle (n=4), Desnutrido (n=4) e Hiperlipídico (n=4).

4.1.9 Avaliação da concentração sérica de glicose, insulina e índice HOMA-IR de Resistência à insulina

A concentração sérica de glicose no grupo Controle apresentou concentração de $161,1 \pm 26,2$ mg/dL e não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo Hiperlipídico ($164,7 \pm 14,5$ mg/dL). Mas houve diferença quando comparada com o grupo Desnutrido ($125,4 \pm 21,2$ mg/dL).

Notamos que a concentração sérica de insulina também não apresentou diferenças significativas entre o grupo Controle (2634 ± 1982 pg/mL) e o grupo Hiperlipídico (1938 ± 1546 pg/mL). No entanto está extremamente diminuído no grupo Desnutrido (339 ± 244 pg/mL).

Ao calcularmos o índice HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment – Insulin Resistance*) para avaliar a resistência à insulina, o grupo Desnutrido ($0,511 \pm 0,41$) apresentou valores mais baixos que o Controle ($1,865 \pm 0,63$). O grupo Hiperlipídico ($3,171 \pm 1,52$) apresentou valores significativamente maiores aos demais grupos.

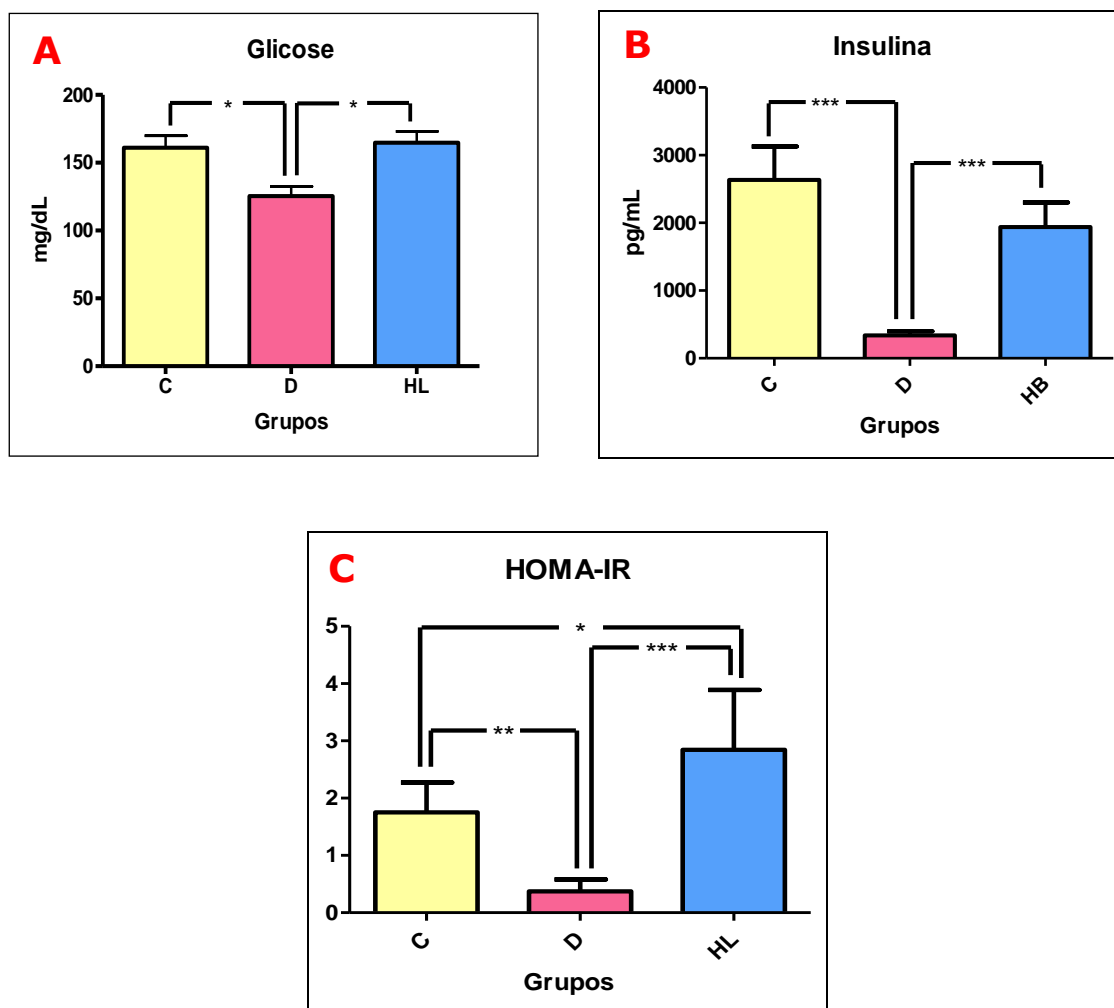


Figura 10. Resultados, em valores médios \pm SDM, da concentração sérica de glicose (A) e insulina (B) e do índice HOMA-IR (C) dos grupos C - Controle (n=7), D - Desnutrido (n=6) e HL - Hiperlipídico (n=7). ; *Valores significativos para $p < 0,05$ ***Valores significativos para $p < 0,001$. n representa número de animais avaliados.

4.1.10 Avaliação da concentração sérica de Colesterol e Triglicérides

Entre os animais Controle e Desnutrido não encontramos diferença significativa ($108,6 \pm 12,5$ mg/dL e $93,7 \pm 17,9$ mg/dL, respectivamente) nos índices de colesterol sérico. No entanto, encontramos níveis mais elevados no grupo Hiperlipídico com $161,2 \pm 43,2$ mg/dL.

Na dosagem de triglicérides encontramos os níveis reduzidos ($25,6 \pm 5,8$ mg/dL) no grupo hiperlipídico em relação ao grupo desnutrido ($54,9 \pm 14,0$ mg/dL) e controle ($161,2 \pm 43,2$ mg/dL).

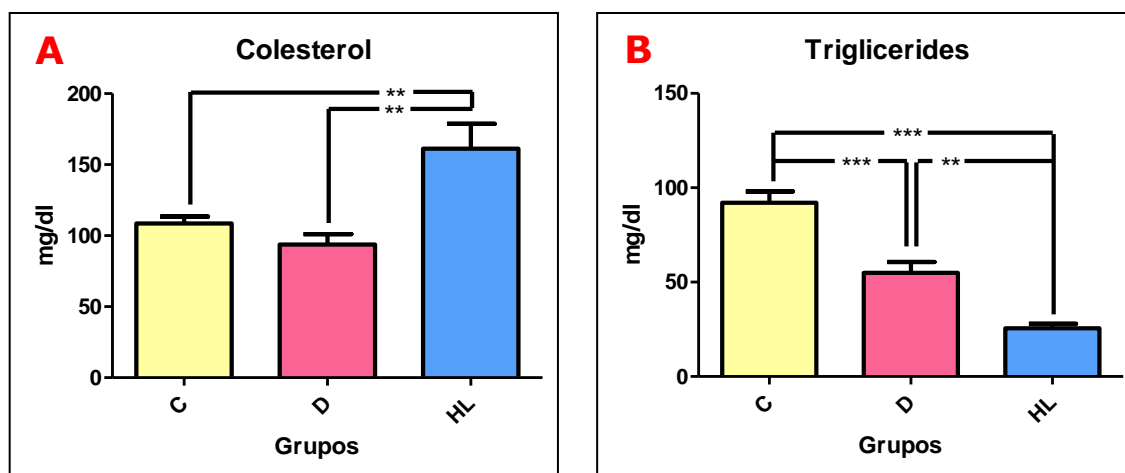


Figura 11. Resultados, em valores médios \pm SDM, da concentração sérica de colesterol (A) e triglicérides (B) dos grupos C - Controle (n=7), D - Desnutrido (n=6) e HL - Hiperlipídico (n=6). ; **Valores significativos para $p < 0,01$; ***Valores significativos para $p < 0,001$. n representa número de animais avaliados.

4.2 Avaliação hematológica

4.2.1 Hemograma

4.2.1.1 Eritrograma

O grupo Desnutrido apresentou redução significativa do número de hemácias, hematócrito e hemoglobina ($6,0 \pm 1,6 \times 10^6/\text{mm}^3$; $26,9 \pm 7,3\%$; $8,3 \pm 2,1 \text{ g/dL}$, respectivamente) em relação ao grupo Controle ($8,1 \pm 0,7 \times 10^6/\text{mm}^3$; $38,8 \pm 3,2\%$; $11,6 \pm 0,9 \text{ g/dL}$, respectivamente) e Hiperlipídico ($7,7 \pm 0,9 \times 10^6/\text{mm}^3$; $34,8,9 \pm 3,6\%$; $11,0 \pm 0,9 \text{ g/dL}$, respectivamente).

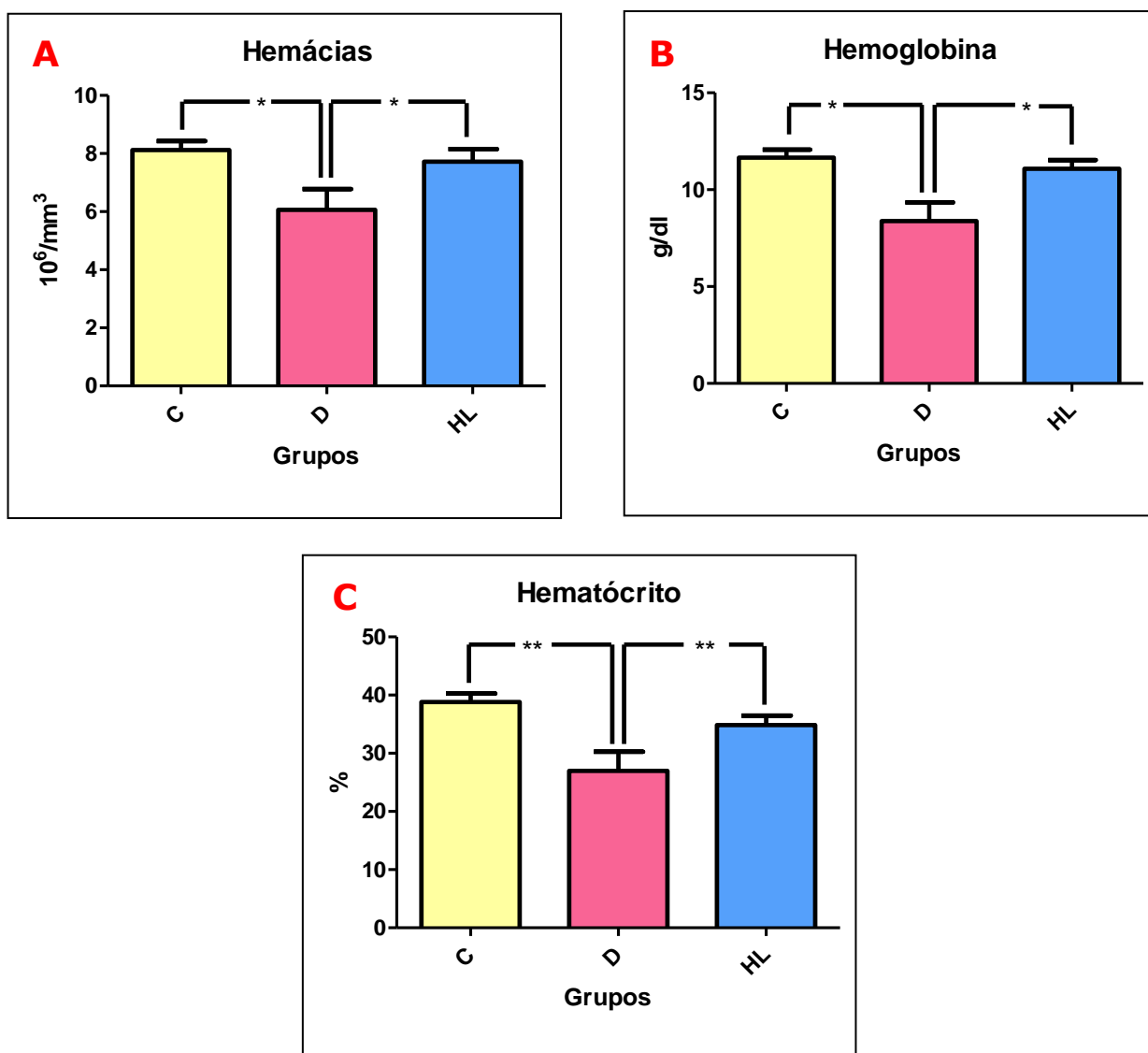


Figura 12. Resultados, em valores médios \pm SDM, do número de hemácias (A), hematócrito (B) e hemoglobina (C) dos grupos C - Controle (n=15), D - Desnutrido (n=15) e HL - Hiperlipídico (n=15). *Valores significativos para $p < 0,05$; **Valores significativos para $p < 0,01$. n representa número de animais avaliados.

Os índices hematimétricos não demonstraram nenhuma diferença significativa entre os grupos controle, desnutrido e hiperlipídico. Sendo que o VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) mostraram-se semelhantes entre o controle ($47,8 \pm 1,1$ fl; $14,3 \pm 0,3$ pg; $30,0 \pm 0,7$ %, respectivamente), desnutrido ($44,4 \pm 0,9$ fl; $13,9 \pm 0,4$ pg; $31,2 \pm 0,7$ %) e hiperlipídico ($45,2 \pm 2,0$ fl; $14,4 \pm 0,7$ pg; $31,8 \pm 0,6$ %, respectivamente).

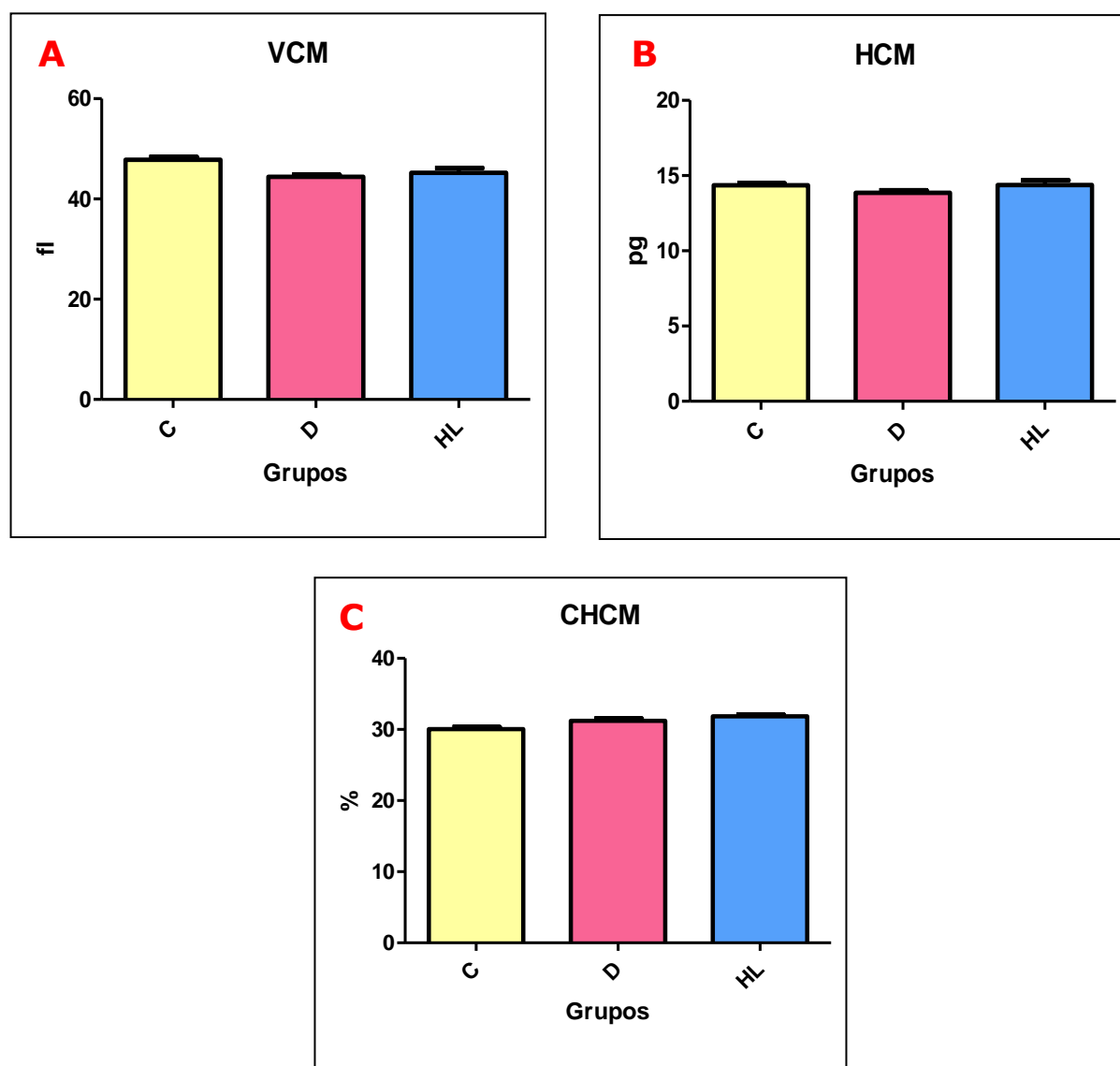


Figura 13. Resultados, em valores médios \pm SDM, dos índices hematimétricos: VCM (A), HCM (B) e CHCM (C) dos grupos C - Controle (n=15), D - Desnutrido (n=15) e HL - Hiperlipídico (n=15). n representa número de animais avaliados.

4.2.1.2 Leucograma

O consumo de dieta hipoprotéica causou uma redução do número de leucócitos circulantes no sangue periférico ($1,3 \pm 0,6 \times 10^3/\text{mm}^3$) em relação ao grupo controle ($2,5 \pm 1,5 \times 10^3/\text{mm}^3$), no entanto, o consumo de dieta hiperlipídica não apresentou alterações significativas no número de leucócitos ($2,2 \pm 1,1 \times 10^3/\text{mm}^3$).

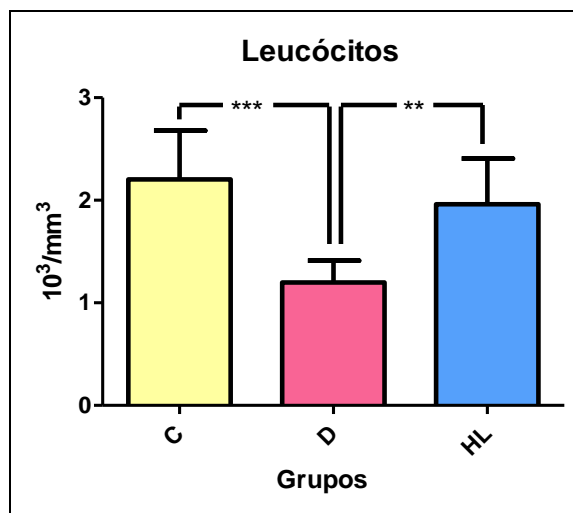


Figura 14. Resultados, em valores médios \pm SDM, do número de leucócitos no sangue periférico dos grupos C – Controle (n=34), D - Desnutrido (n=33) e HL – Hiperlipídico (n=29). *Valores significativos para $p < 0,05$. n representa número de animais avaliados.

Ao realizarmos a contagem diferencial relativa, não encontramos diferenças significativas entre os três grupos em nenhum dos tipos celulares encontrados no sangue periférico, no entanto, ao realizar a contagem diferencial absoluta, notamos que o animal desnutrido apresenta linfopenia e neutrófilopenia, enquanto que o hiperlipídico apresenta apenas uma linfopenia, estando os neutrófilos semelhantes ao controle.

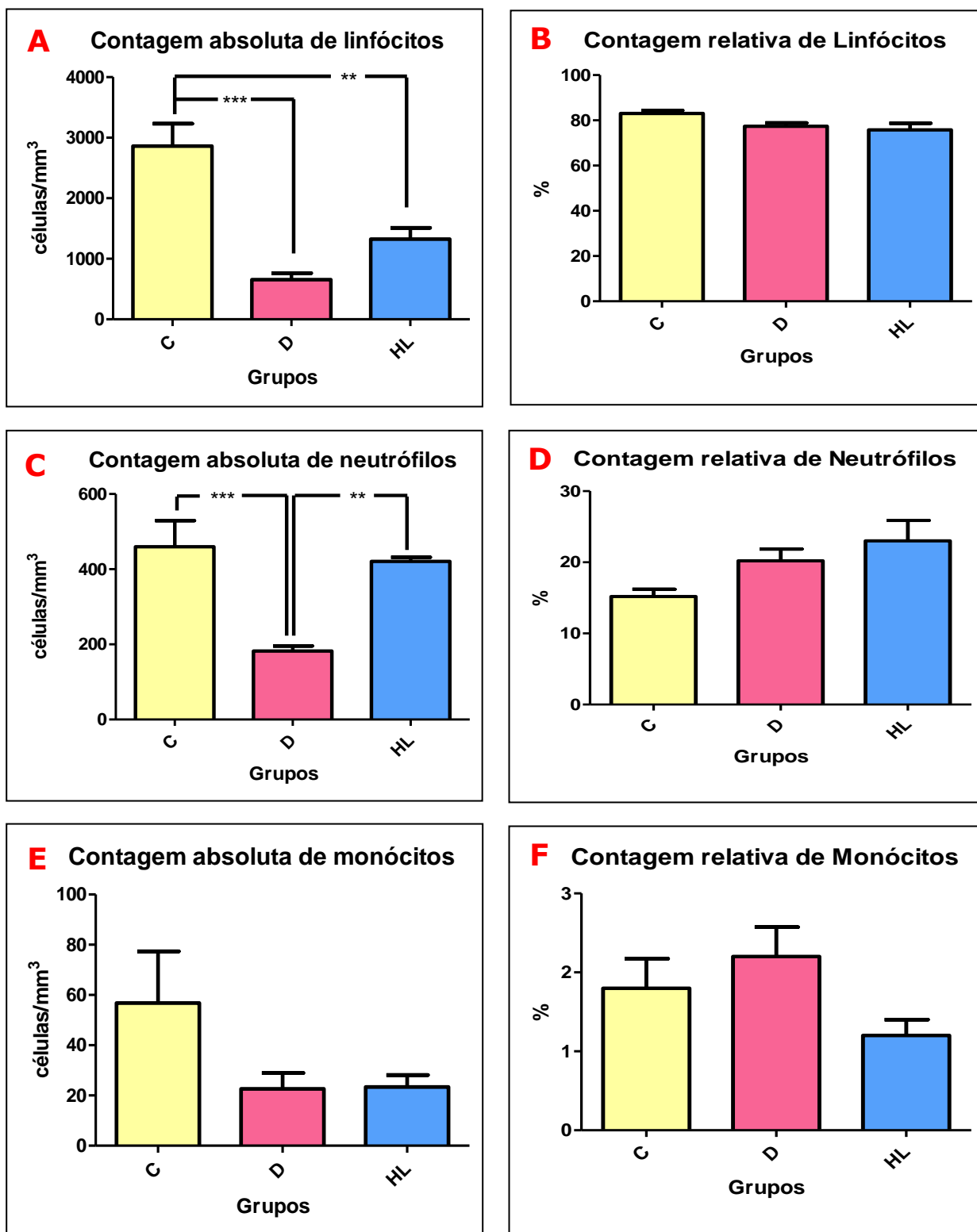


Figura 15. Resultados, em valores médios±SDM, da contagem diferencial relativa e absoluta de leucócitos no sangue periférico dos grupos C – Controle (n=6), D - Desnutrido (n=6) e HL – Hiperlipídico (n=6). *Valores significativos para $p < 0,05$. **Valores significativos para $p < 0,01$. ***Valores significativos para $p < 0,001$. n representa número de animais avaliados.

4.3 Mielograma

Foi observada redução significativa da celularidade da medula óssea em decorrência do quadro de desnutrição protéica ($2,4 \pm 1,5 \times 10^7/\text{mm}^3$), no entanto, o grupo hiperlipídico ($5,1 \pm 2,4 \times 10^7/\text{mm}^3$) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle ($3,8 \pm 2,4 \times 10^7/\text{mm}^3$).

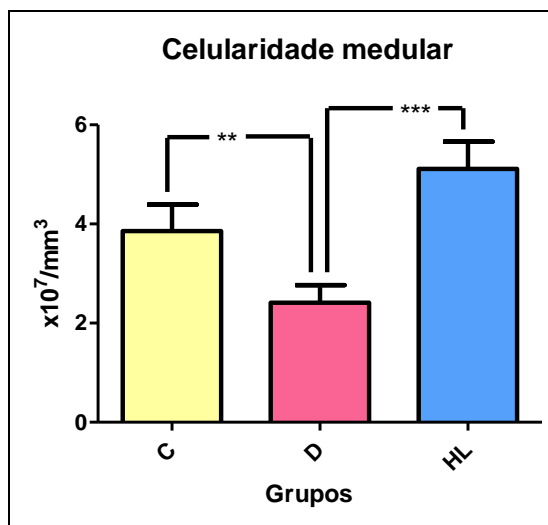


Figura 16. Resultados, em valores médios \pm SDM, do número de células nucleadas da medula óssea dos grupos C - Controle (n=7), D - Desnutrido (n=6) e HL - Hiperlipídico (n=6). **Valores significativos para $p < 0,01$. n representa número de animais avaliados.

Realizamos também a contagem diferencial, relativa e absoluta, de células da medula óssea do fêmur dos animais dos três grupos. Notamos que os valores absolutos encontram-se reduzidos em quase todas as linhagens do grupo desnutrido e não há diferença significativa entre animais do grupo controle e animais do grupo hiperlipídico.

A contagem relativa mostrou-se mais homogênea entre os três grupos, encontramos apenas redução significativa na quantidade de monócitos/macrófagos e eritroblastos jovens no grupo desnutrido. Nos animais submetidos à dieta hiperlipídica, encontramos o aumento na quantidade relativa de plasmócitos e formas jovens de granulócitos (promielócitos, mielócitos e metamielócitos).

Tabela 5 – Distribuição absoluta das populações medulares

Tipo celular	Controle (x10 ⁷ /mL)	Desnutrido (x10 ⁷ /mL)	Hiperlipídico (x10 ⁷ /mL)
Blasto	0,89 ± 0,26	0,54 ± 0,28 ^a	0,74 ± 0,24
Forma jovem	1,17 ± 0,43	0,75 ± 0,21 ^b	1,49 ± 0,31
Forma em anel	1,17 ± 0,48	1,12 ± 0,40	1,72 ± 0,53
Segmentado	12,86 ± 4,5	8,22 ± 3,0 ^a	12,44 ± 1,2
Eosinófilo	0,86 ± 0,44	0,54 ± 0,37 ^a	0,95 ± 0,29
Monócito/macrófago	0,92 ± 0,56	0,36 ± 0,16 ^b	0,96 ± 0,36
Plasmócito	0,20 ± 0,17	0,08 ± 0,05 ^b	0,19 ± 0,08
Linfoblasto/Linfócito	4,0 ± 1,22	2,4 ± 0,65 ^a	3,8 ± 0,72
Eritroblasto jovem	1,0 ± 0,38	0,8 ± 0,21	1,0 ± 0,32
Eritroblasto maduro	7,7 ± 2,8	5,1 ± 1,4 ^a	6,9 ± 0,5

Resultados, em valores médios±SDM, dos valores absolutos das populações medulares dos grupos Controle (n=6), Desnutrido (n=6) e Hiperlipídico (n=6). ^aValores significativos para p<0,05 do desnutrido em relação aos outros grupos. ^bValores significativos para p<0,01 do desnutrido em relação aos outros grupos. **n** representa número de animais analisados.

Tabela 6 – Distribuição relativa das populações medulares

Tipo celular	Controle (%)	Desnutrido (%)	Hiperlipídico (%)
Blasto	2,97 ± 0,82	2,64 ± 1,10	2,41 ± 0,60
Forma jovem	3,70 ± 0,47	3,82 ± 0,53	4,89 ± 0,69 ^b
Forma em anel	5,61 ± 0,48	5,51 ± 0,80	5,63 ± 1,25
Segmentado	40,7 ± 0,73	40,4 ± 3,04	41,0 ± 2,18
Eosinófilo	2,68 ± 0,86	2,64 ± 1,12	3,10 ± 0,76
Monócito/macrófago	2,80 ± 1,02	1,80 ± 0,55 ^a	3,16 ± 1,17
Plasmócito	0,40 ± 0,38	0,42 ± 0,19	0,64 ± 0,31 ^b
Linfoblasto/Linfócito	13,1 ± 1,32	12,5 ± 2,21	12,7 ± 2,30
Eritroblasto jovem	2,80 ± 1,02	1,80 ± 0,55 ^a	3,16 ± 1,17
Eritroblasto maduro	24,6 ± 1,41	26,1 ± 3,09	22,8 ± 2,19

Resultados, em valores médios±SDM, da porcentagem das populações medulares dos grupos Controle (n=6), Desnutrido (n=6) e Hiperlipídico (n=6). ^a Valores significativos para p<0,05 do desnutrido em relação aos outros grupos. ^b Valores significativos para p<0,05 do hiperlipídico em relação aos outros grupos. **n** representa número de animais analisados.

Realizamos os cortes histológicos de esterno, corados com hematoxilina-eosina e encontramos uma celularidade diminuída no grupo Desnutrido e uma discreta hiperplasia nos animais do grupo Hiperlipídico.

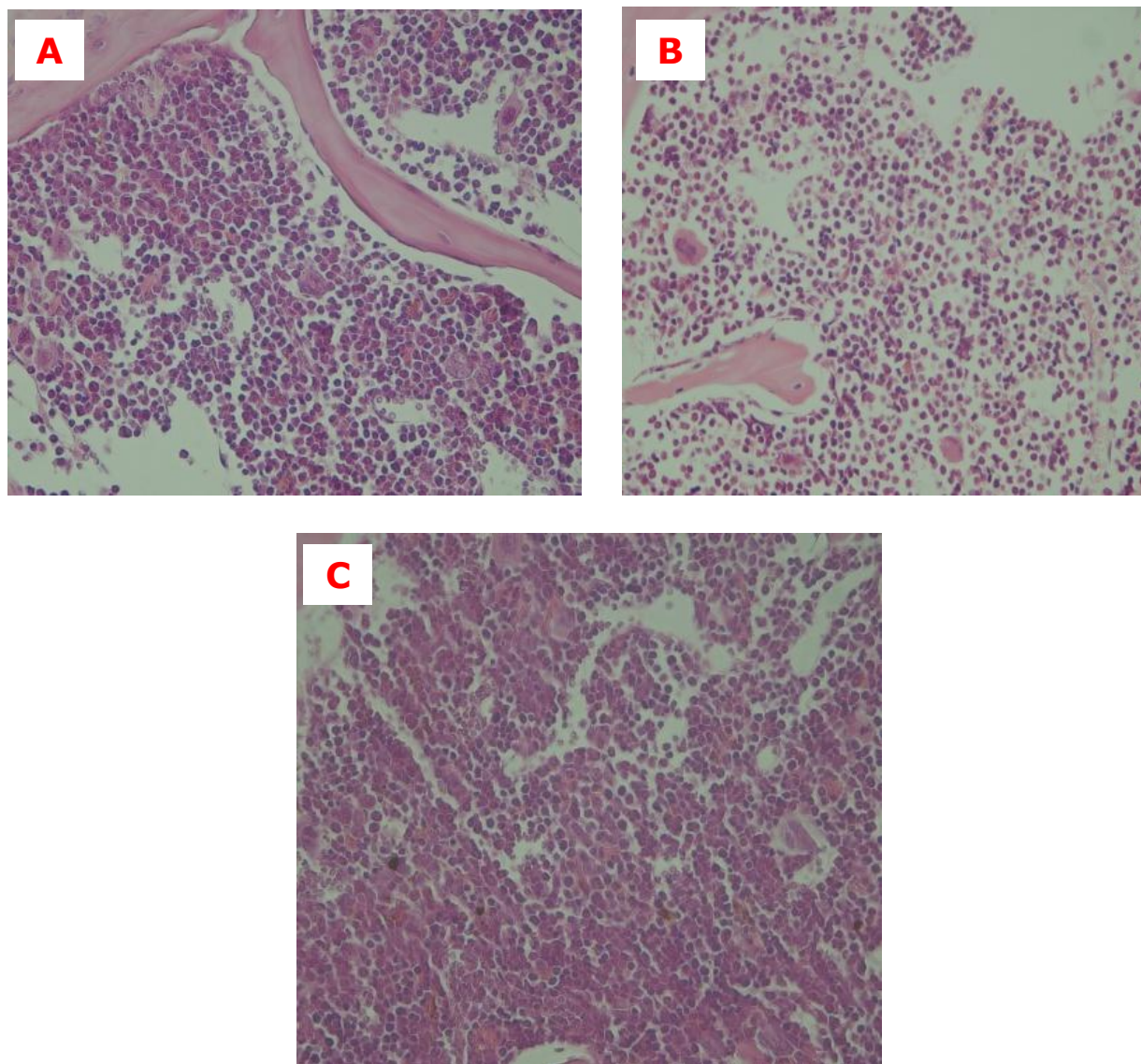


Figura 17 – Fotomicrografia representativa de cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina da medula óssea esternal dos grupos Controle (A), Desnutrido (B) e Hiperlipídico (C) (Aumento de 400x).

4.4 Avaliação de células nucleadas da cavidade peritoneal

Foi observada redução significativa da celularidade na cavidade peritoneal em decorrência do quadro de desnutrição protéica ($2,8 \pm 1,7 \times 10^6/\text{mm}^3$) e uma semelhança entre o grupo hiperlipídico ($2,9 \pm 1,1 \times 10^6/\text{mm}^3$) e o grupo controle ($3,9 \pm 1,4 \times 10^6/\text{mm}^3$).

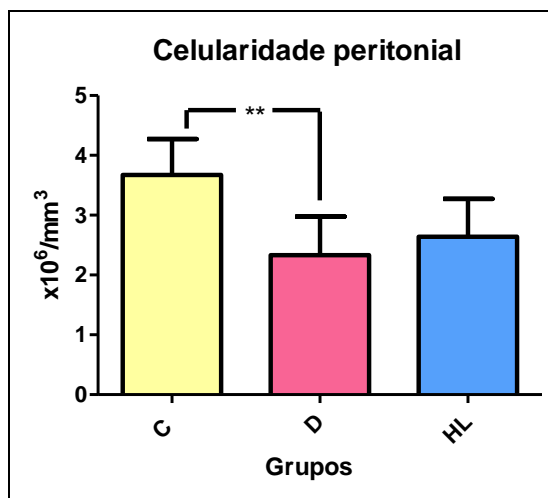


Figura 18 - Resultados, em valores médios±SDM, do número de células nucleadas totais da cavidade peritoneal dos grupos C - Controle (n=30), D - Desnutrido (n=30) e HL - Hiperlipídico (n=29). *Valores significativos para $p < 0,05$. n representa número de animais avaliados.

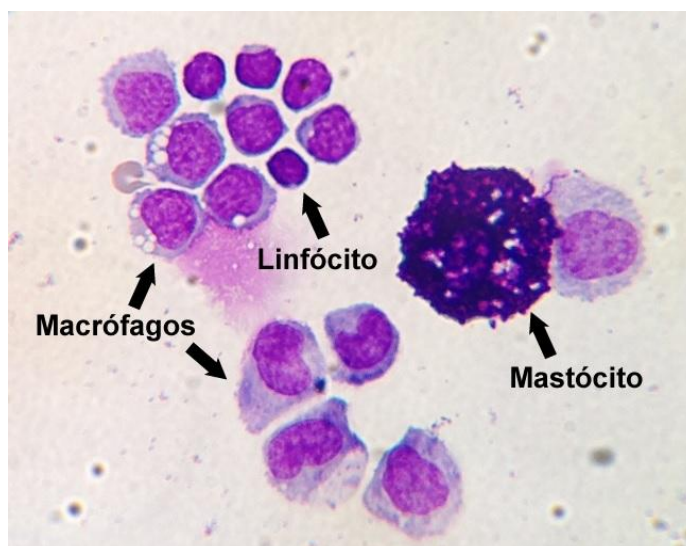


Figura 19 - Fotomicrografia representativa da celularidade peritoneal, mostrando as principais células encontradas no lavado peritoneal: Macrófagos, Linfócitos e Mastócitos (Aumento de 1.000x). Coloração: May-Grunwald modificado por Roselfeld, 1947.

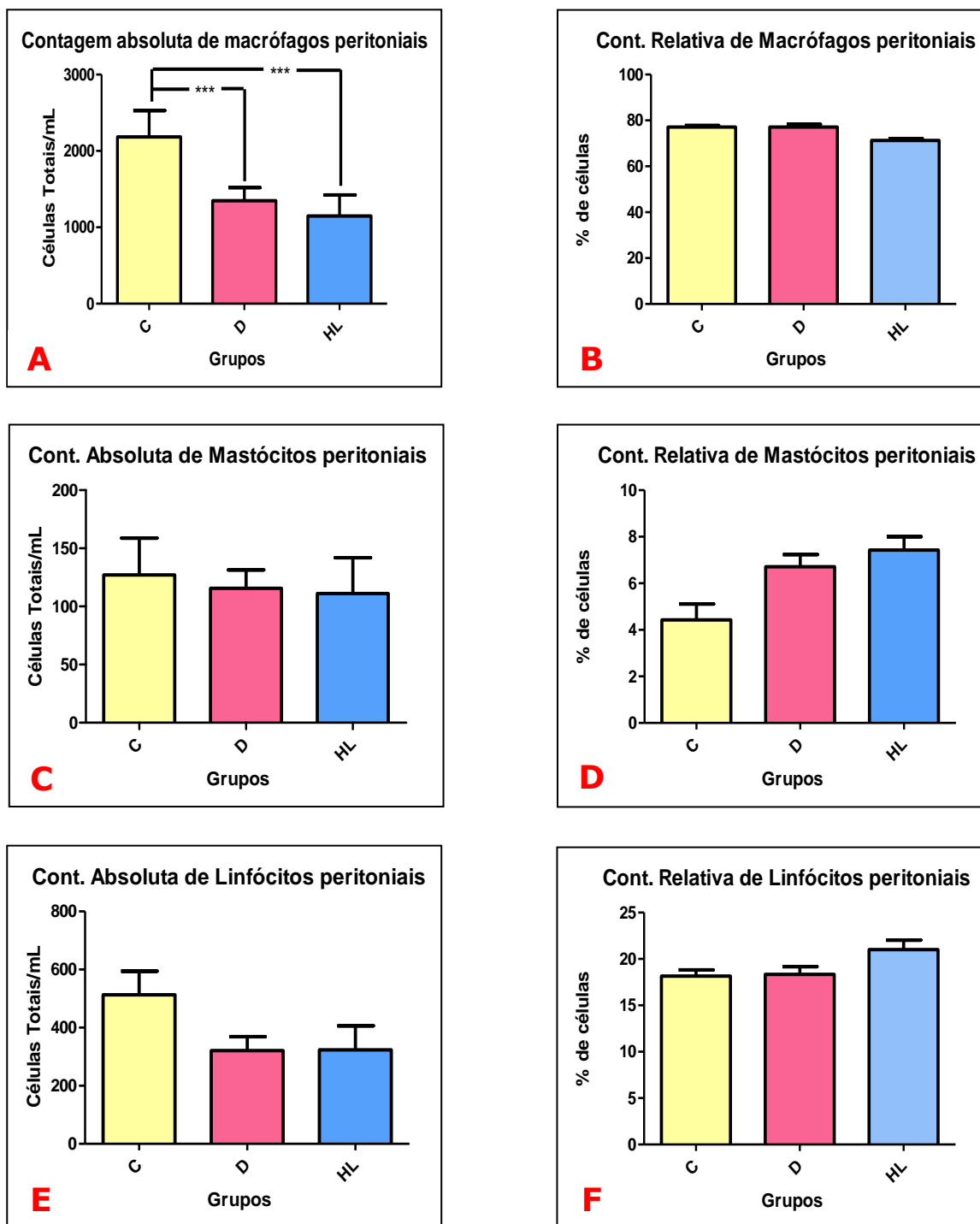


Figura 20. Resultados, em valores médios±SDM, da contagem diferencial relativa e absoluta de células nucleadas da cavidade peritoneal dos grupos C - Controle (n=7), D - Desnutrido (n=7) e HL - Hiperlipídico (n=7). *Valores significativos para $p < 0,05$. n representa número de animais avaliados.

4.5 Função de macrófagos

4.5.1 Citometria de fluxo

4.5.1.1 Caracterização imunofenotípica das células da cavidade peritoneal

A avaliação imunofenotípica da população da cavidade peritoneal foi feita por citometria de fluxo utilizando os marcadores CD11b (FITC) e F4/80 (APC). As células duplo marcadas foram classificadas como macrófagos. Não encontramos diferenças significativas da proporção de macrófagos nos animais dos grupos controle ($44,2 \pm 3,3\%$), desnutrido ($46,4 \pm 3,6\%$) e hiperlipídico ($45,5 \pm 5,3\%$).

4.5.1.2 Apresentação de antígenos

A avaliação da apresentação de antígenos foi realizada utilizando-se o marcador MHC-II (PE). Utilizamos o *gate* formado pelos macrófagos duplo marcados do item anterior. Encontramos uma menor apresentação de antígenos nos animais do grupo desnutrido ($86,5 \pm 5,0\%$) em relação ao controle ($91,1 \pm 1,9\%$). Os animais submetidos a dieta hiperlipídica apresentaram uma porcentagem maior de células apresentadoras de antígenos ($96,1 \pm 1,3\%$).

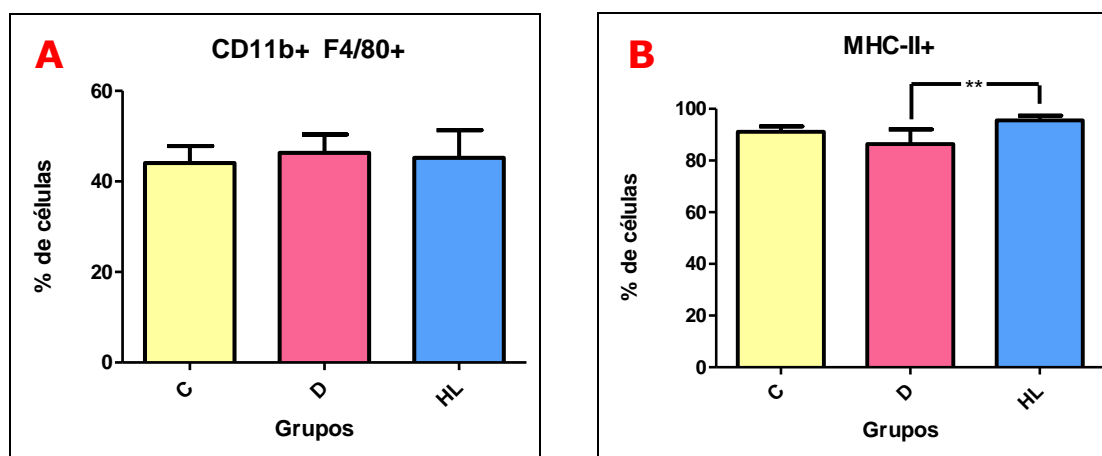


Figura 21. Resultados, em valores médios±SDM, de: (A) quantidade de células duplo marcadas (CD11b+F4/80+) por citometria de fluxo, de células totais do lavado peritoneal; (B) proporção de macrófagos peritoneais apresentadores de antígenos dos grupos C - Controle (n=6), D - Desnutrido (n=6) e HL - Hiperlipídico (n=6). **Valores significativos para $p < 0,01$. n representa número de animais avaliados.

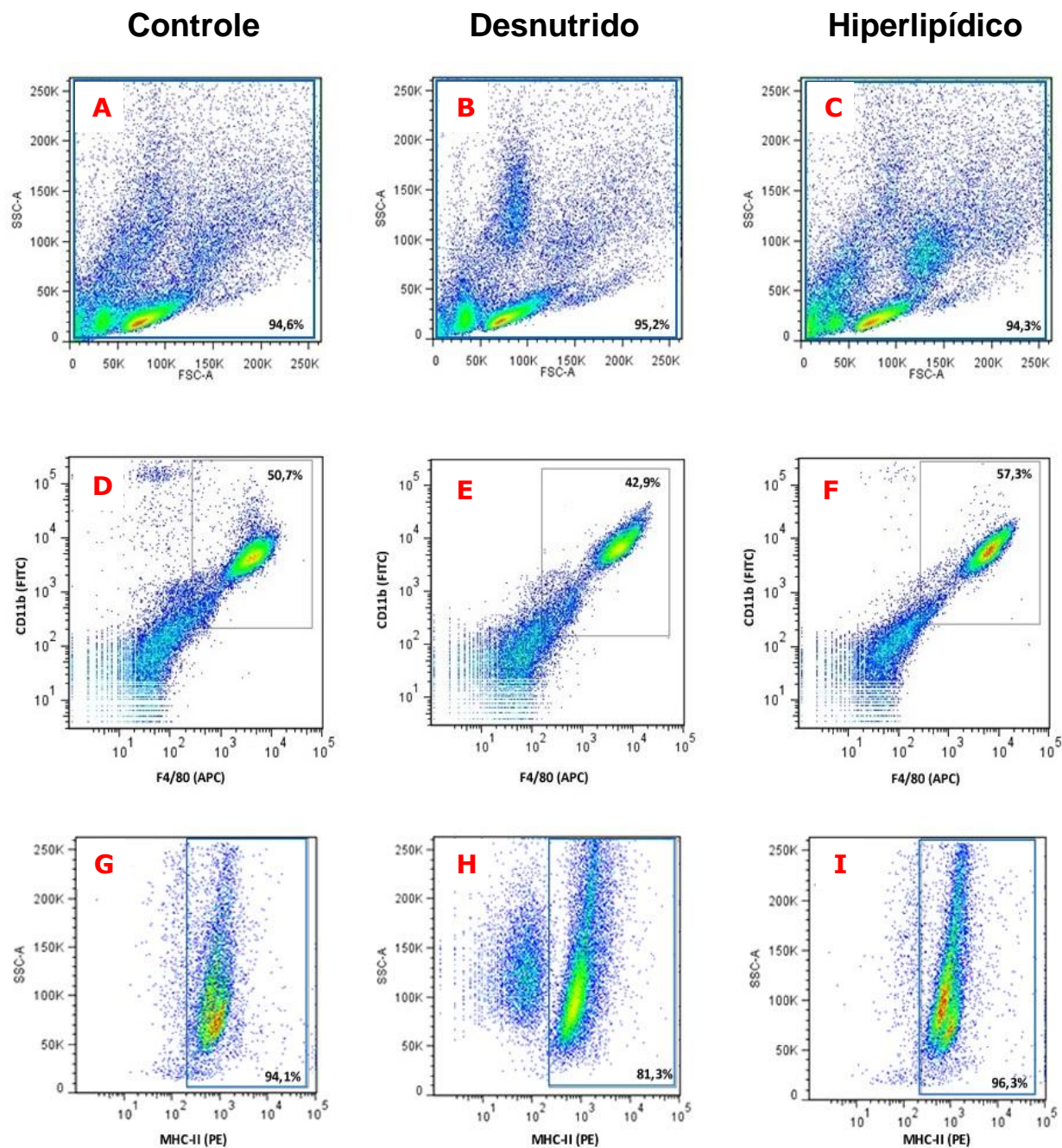


Figura 22. Resultados representativos, por citometria de fluxo, da celularidade peritoneal de animal do grupo (A) Controle, (B) Desnutrido e (C) Hiperlipídico; Duplo marcado CD11b+F4/80+ do grupo (D) Controle, (E) Desnutrido e (F) Hiperlipídico; MHC-II+ de animal do grupo (G) Controle, (H) Desnutrido e (I) Hiperlipídico.

4.5.2 Avaliação da capacidade de adesão de macrófagos peritoneais

O Gráfico 23 demonstra que os grupos Controle ($0,09 \text{ abs}/1 \times 10^5 \text{ cél.} \pm 0,003$), Desnutrido ($0,08 \text{ abs}/1 \times 10^5 \text{ cél.} \pm 0,002$) e Hiperlipídico ($0,12 \text{ abs}/1 \times 10^5 \text{ cél.} \pm 0,003$) apresentaram diferenças significativas entre si e que os 3 grupos responderam ao estímulo por LPS e tiveram um aumento na capacidade de adesão após o período de 2 horas (Gráfico 23A).

Depois de 24 horas (Gráfico 23B) os grupos já não apresentam diferença significativa entre o grupo estimulado e o basal (Controle = $0,11 \pm 0,006$ e $0,13 \pm 0,001$ Abs/ 1×10^5 cél.; Desnutrido = $0,07 \pm 0,006$ e $0,08 \pm 0,005$ Abs/ 1×10^5 cél. e Hiperlipídico = $0,15 \pm 0,003$ e $0,15 \pm 0,003$ Abs/ 1×10^5 cél.). O grupo desnutrido apresenta menor capacidade de adesão ($0,07 \pm 0,006$ Abs/ 1×10^5 cél.) que o controle ($0,11 \pm 0,006$ Abs/ 1×10^5 cél.). O grupo hiperlipídico apresenta adesão semelhante ao controle ($0,14 \pm 0,005$ Abs/ 1×10^5 cél.).

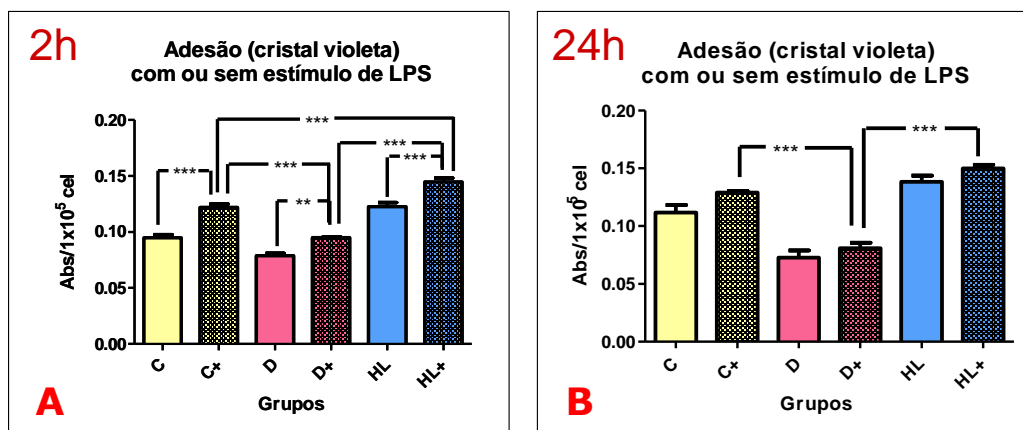


Figura 23. Resultados, em valores médios \pm SDM, do número de células nucleadas totais da cavidade peritoneal no período de 2 horas (A) e 24 horas (B) dos grupos C - Controle (n=7), D - Desnutrido (n=6) e HL - Hiperlipídico (n=6). *Valores significativos para $p < 0,05$. n representa número de animais avaliados.

4.5.3 Teste de espriamento de macrófagos peritoniais

O grupo hiperlipídico apresentou menor quantidade de células espriadas, após 2 horas, tanto no basal quanto no grupo estimulado com LPS em relação ao grupo Controle (Figura 24A). O grupo desnutrido mostrou ainda menos células espriadas que o hiperlipídico, mesmo após o estímulo. Na Figura 24B observamos a reação ao estímulo, demonstrando que os grupos Controle e Hiperlipídico respondem ao estímulo e as células tentem a espriar em maior quantidade. Já os animais do grupo desnutrido não responderam ao estímulo de LPS.

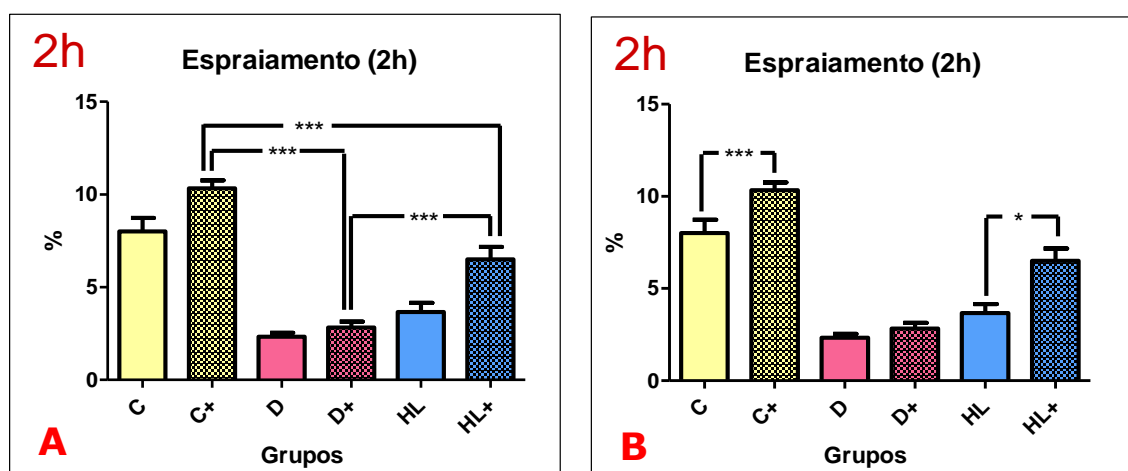


Figura 24. Resultados, em valores médios \pm SDM, da porcentagem de células nucleadas espriadas da cavidade peritoneal após o período de 2 horas. Gráfico A demonstra diferenças significativas entre os grupos C - Controle (n=7), D - Desnutrido (n=6) e HL - Hiperlipídico (n=6). Gráfico B apresenta as diferenças entre as células estimuladas e não estimuladas, dentro do mesmo grupo (+ = grupo estimulado). *Valores significativos para $p < 0,05$. n representa número de animais avaliados.

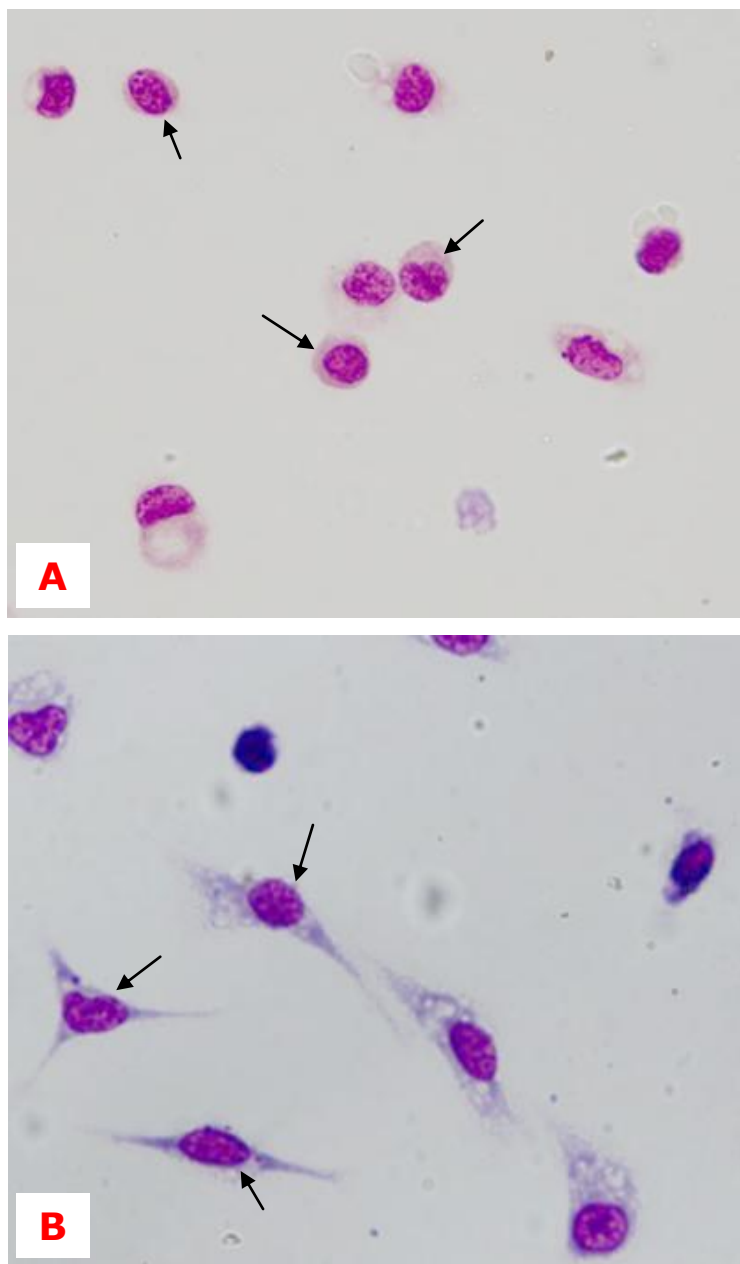


Figura 25. Fotomicrografia representativa de macrófagos peritoneais residentes (A) e ativados mostrando espraiamento (B). (Aumento de 1000x). Coloração: May-Grunwald modificado por Roselfeld, 1947.

Verificamos, ainda, a capacidade de espraio após o período de 24 horas, onde observamos (como mostra o Gráfico 26A) que as células espraíram bem mais, no entanto, os grupos hiperlipídico e desnutrido permaneceram com uma porcentagem inferior ao controle. Analisando a reação ao estímulo (Gráfico 26B), notamos que o grupo controle e hiperlipídico continuam a reagir ao estímulo e os animais do grupo desnutrido não apresentaram alterações significativas.

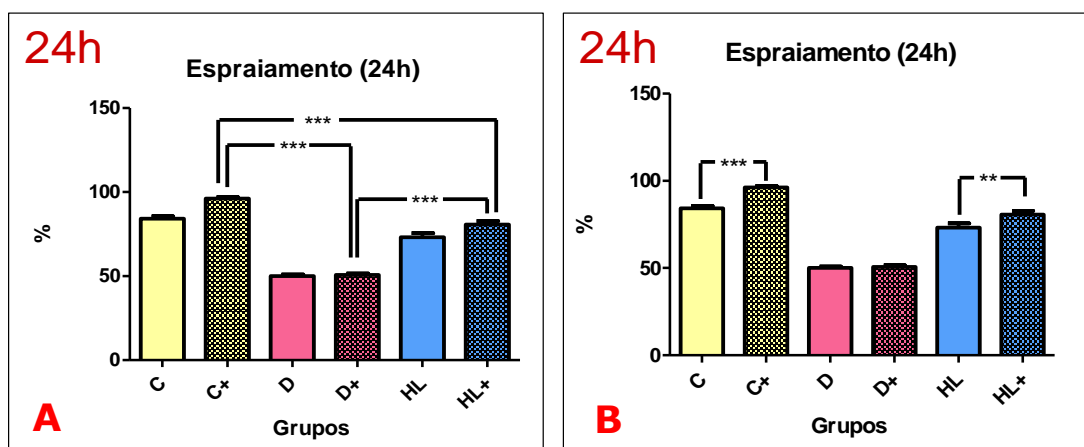


Figura 26. Resultados, em valores médios±SDM, da porcentagem de células nucleadas espraídas da cavidade peritoneal após o período de 2 horas. Gráfico A demonstra diferenças significativas entre os grupos C - Controle (n=7), D - Desnutrido (n=6) e HL - Hiperlipídico (n=6). Gráfico B apresenta as diferenças entre as células estimuladas e não estimuladas, dentro do mesmo grupo (+ = grupo estimulado). **Valores significativos para $p < 0,01$. ***Valores significativos para $p < 0,001$. n representa número de animais avaliados.

4.5.4 Avaliação Produção de óxido nítrico

Em condições sem estímulo, as células dos animais de todos os grupos não apresentaram diferença estatística entre si, no entanto, os grupos controle e hiperlipídico responderam ao estímulo de LPS (Gráfico 27A) e produziram mais óxido nítrico ($248 \pm 14,3 \mu\text{M/mL}$ e $272 \pm 30,5 \mu\text{M/mL}$) do que os não estimulados ($109 \pm 5,6 \mu\text{M/mL}$ e $113 \pm 4,9 \mu\text{M/mL}$). O grupo desnutrido não reagiu ao estímulo ($115 \pm 5,2 \mu\text{M/mL}$ e $132 \pm 5,6 \mu\text{M/mL}$). Apesar dos grupos não estimulados apresentarem produção de óxido nítrico semelhante, o Gráfico 27B mostra claramente que os grupos estimulados apresentam diferenças representativas, sendo a produção bem reduzida no grupo desnutrido e maior no grupo hiperlipídico.

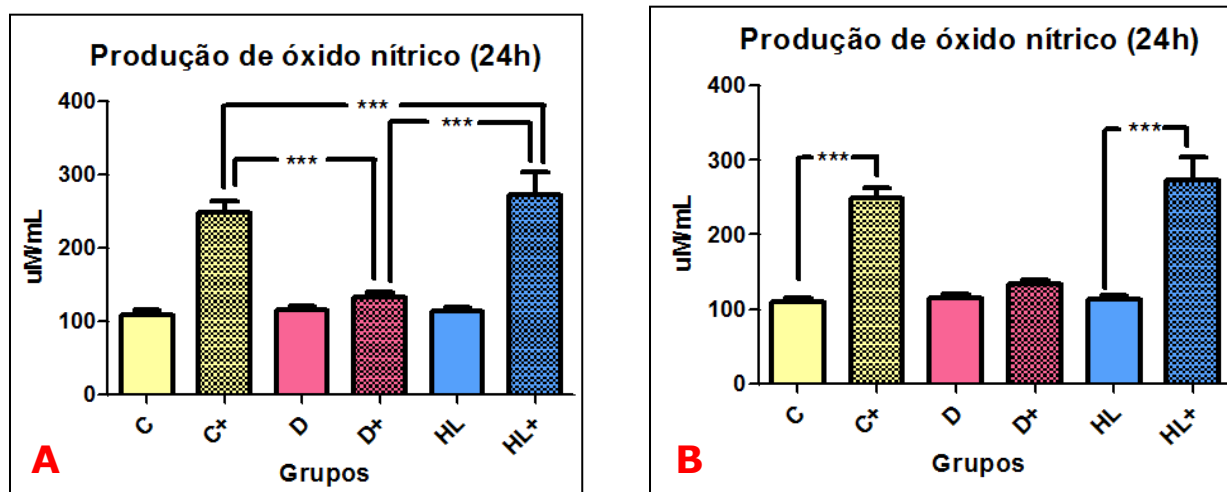


Figura 27. Resultados, em valores médios \pm SDM, da Produção de Óxido Nítrico após 24 horas. Gráfico A demonstra diferenças significativas entre os grupos C - Controle (n=7), D - Desnutrido (n=6) e HL - Hiperlipídico (n=6). Gráfico B apresenta as diferenças entre as células estimuladas e não estimuladas, dentro do mesmo grupo (+ = grupo estimulado). ***Valores significativos para $p < 0,001$. n representa número de animais avaliados.

4.5.5 Avaliação Produção de Peróxido de Hidrogênio

Em condições sem estímulo, as células dos animais de todos os grupos também não apresentaram diferença estatística, mas ao serem estimulados com PMA as células dos animais dos grupos controle e hiperlipídico aumentaram a produção (Gráfico 28A) e produziram mais peróxido de hidrogênio ($17,4 \pm 0,3 \mu\text{M}/2 \times 10^5 \text{ cél.}$ e $19,7 \pm 0,2 \mu\text{M}/2 \times 10^5 \text{ cél.}$) do que os não estimulados ($11,1 \pm 0,1 \mu\text{M}/2 \times 10^5 \text{ cél.}$ e $11,9 \pm 0,2 \mu\text{M}/2 \times 10^5 \text{ cél.}$). Os animais do grupo desnutrido não reagiram ao estímulo ($10,2 \pm 0,2 \mu\text{M}/2 \times 10^5 \text{ cél.}$ e $11,2 \pm 0,1 \mu\text{M}/2 \times 10^5 \text{ cél.}$). Apesar dos grupos não estimulados apresentarem produção semelhante de peróxido de hidrogênio, o Gráfico 28B demonstra que os grupos estimulados apresentam diferenças representativas, sendo a produção reduzida no grupo desnutrido e maior no grupo hiperlipídico.

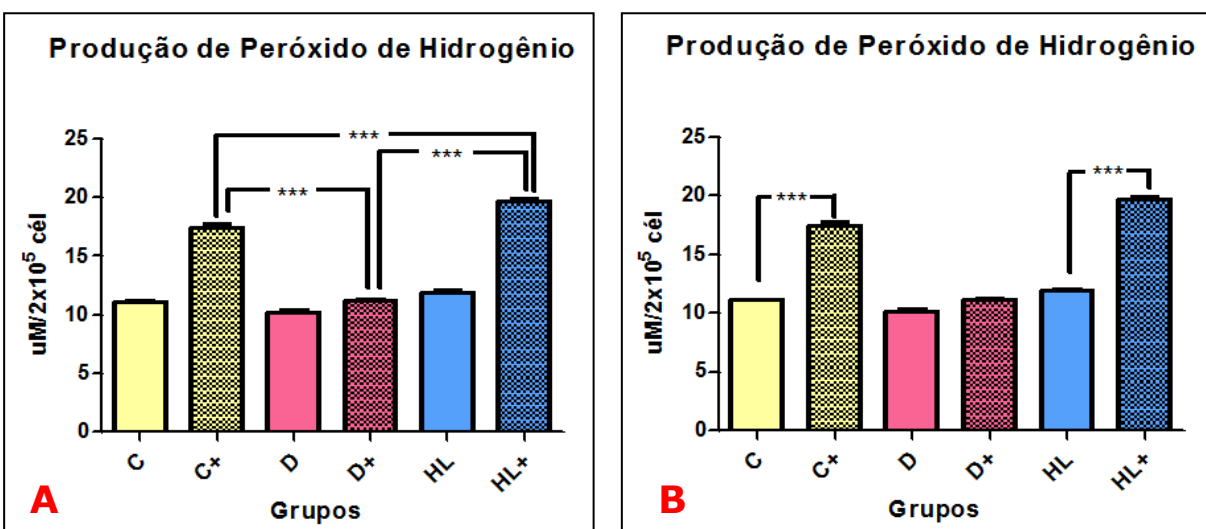


Figura 28. Resultados, em valores médios±SDM, da produção de Peróxido de Hidrogênio. Gráfico A demonstra diferenças significativas entre os grupos C - Controle (n=7), D - Desnutrido (n=6) e HL - Hiperlipídico (n=6). Gráfico B apresenta as diferenças entre as células estimuladas e não estimuladas, dentro do mesmo grupo (+ = grupo estimulado). ***Valores significativos para $p < 0,001$. n representa número de animais avaliados.

4.5.6 Avaliação da fagocitose e atividade fungicida

Não encontramos diferenças significativas na fagocitose quando utilizamos *Candida albicans* não opsonizada, nos tempos de 30, 60 e 90 minutos para os grupos Controle ($9,7 \pm 2,8\%$; $43,8 \pm 10,7\%$; $48,7 \pm 6,7\%$), Desnutrido ($10,8 \pm 2,2\%$; $42,3 \pm 7,3\%$; $39,8 \pm 5,0\%$) e Hiperlipídico ($10,5 \pm 1,2\%$; $43,3 \pm 7,1\%$; $52,8 \pm 7,0\%$). No entanto, no tempo de 120 minutos, o grupo Hiperlipídico ($68,8 \pm 14,1\%$) apresentou um aumento de fagocitose de *Candida albicans* não opsonizada em relação ao Controle ($50,4 \pm 4,0\%$) e Desnutrido ($48,4 \pm 4,0\%$).

No entanto, após opsonização, os grupos Controle ($28,2 \pm 4,1\%$; $73,7 \pm 7,5\%$; $85,8 \pm 4,1\%$; $93,0 \pm 4,0\%$) e Hiperlipídico ($33,7 \pm 5,9\%$; $77,1 \pm 4,8\%$; $91,1 \pm 3,1\%$; $96,5 \pm 2,4\%$) apresentaram aumento da fagocitose em relação às amostras não opsonizadas em todos os tempos, mas o Grupo Desnutrido ($16,1 \pm 3,0\%$; $40,7 \pm 4,3\%$; $45,7 \pm 2,4\%$; $80,8 \pm 9,4\%$) não teve um aumento significativo nos tempos 30, 60 e 90 minutos, o que ocorreu apenas no tempo 120 minutos, como mostra a Figura 29.

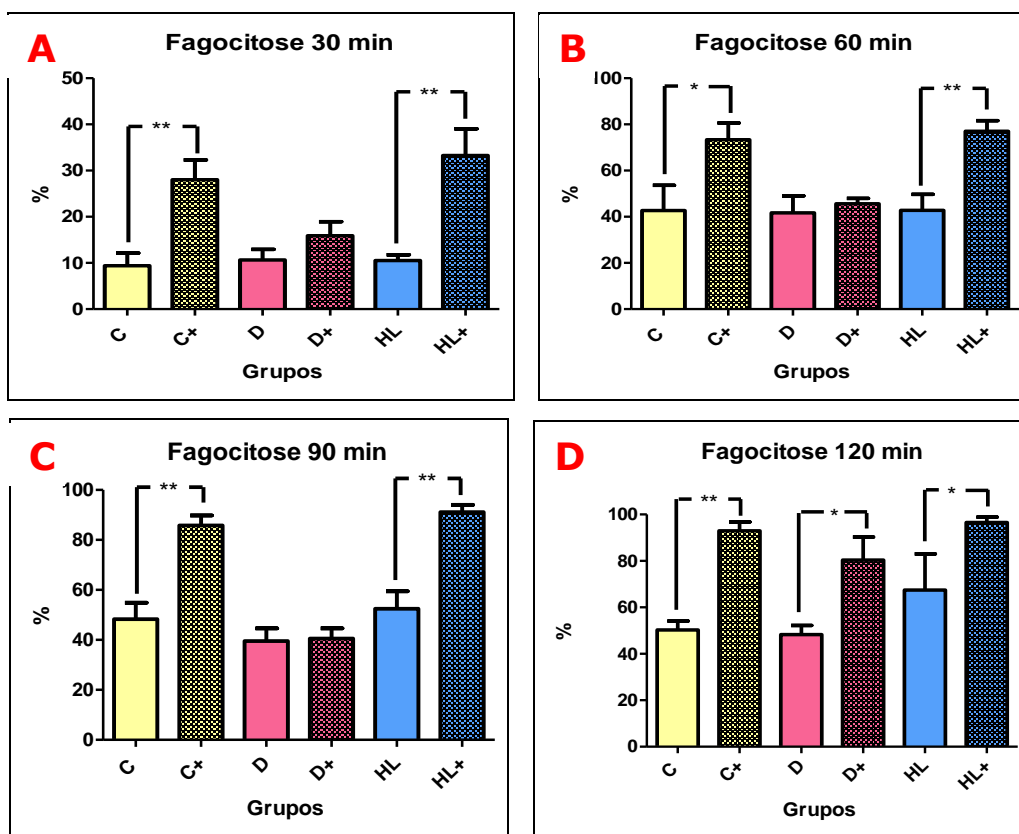


Figura 29 – Resultados, em valores médios \pm SDM comparativos da fagocitose de células não opsonizadas e opsonizadas dos grupos Controle (n=7), Desnutrido (n=7) e Hiperlipídico (n=7). *Valores significativos para $p < 0,05$. (+) representa os grupos opsonizados. n representa número de animais utilizados no experimento.

Após a análise entre os grupos opsonizados e não opsonizados, compararmos os grupos Controle, Desnutrido e Hiperlipídico. E notamos que nos tempos 30, 60 e 90 minutos, o grupo Desnutrido tem sua fagocitose diminuída e os grupos Controle e Hiperlipídico não apresentam diferença significativa. No entanto, no tempo de 120 minutos há uma semelhança na atividade fagocítica entre os três grupos analisados, como mostra a Figura 30.

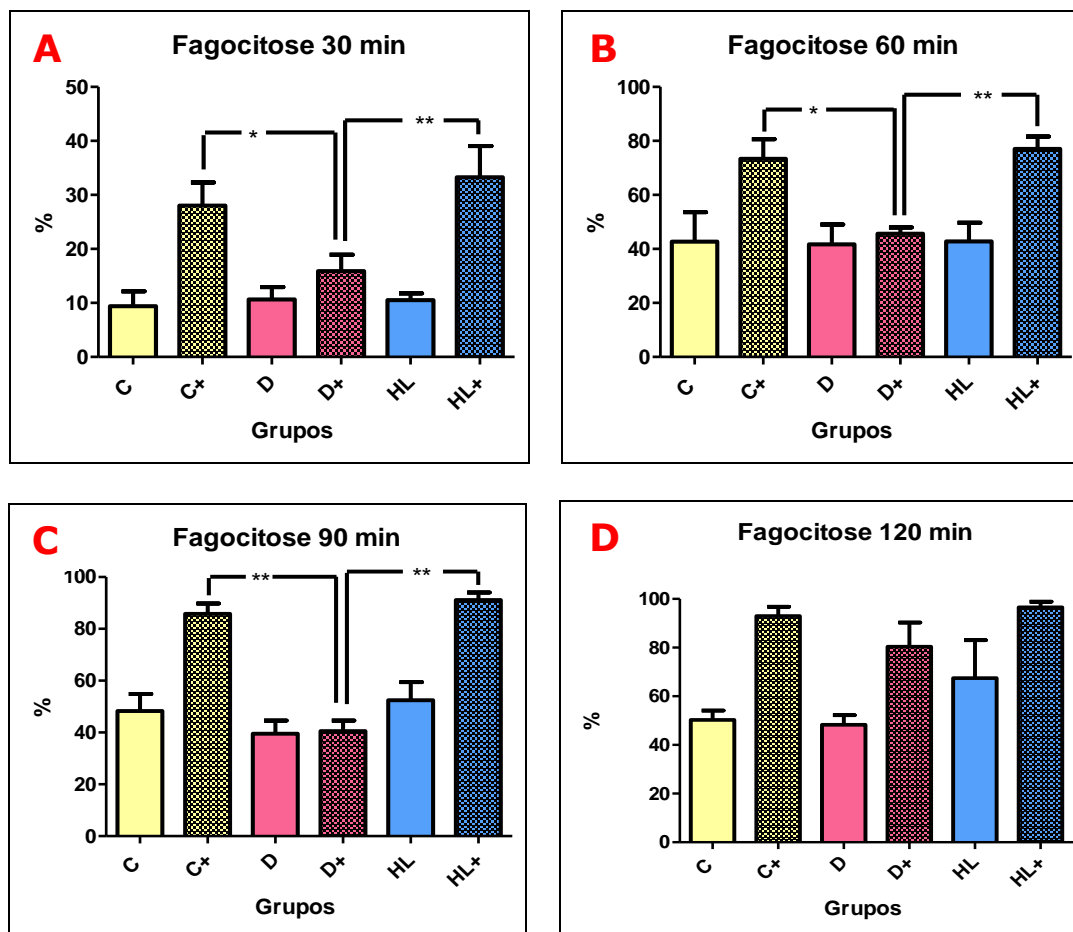


Figura 30 – Resultados, em valores médios±SDM comparativos da fagocitose de células opsonizadas dos grupos Controle (n=7), Desnutrido (n=7) e Hiperlipídico (n=7). *Valores significativos para $p < 0,05$. (+) representa os grupos opsonizados. n representa número de animais utilizados no experimento.

A atividade fungicida, de modo semelhante, mostrou-se aumentada nos grupos Controle e Hiperlipídico que fagocitaram *Candida albicans* opsonizada em relação aos grupos que fagocitaram *Candida albicans* não opsonizada em todos os tempos, mas o grupo Desnutrido não teve diferença significativa em relação a opsonização em nenhum dos tempos.

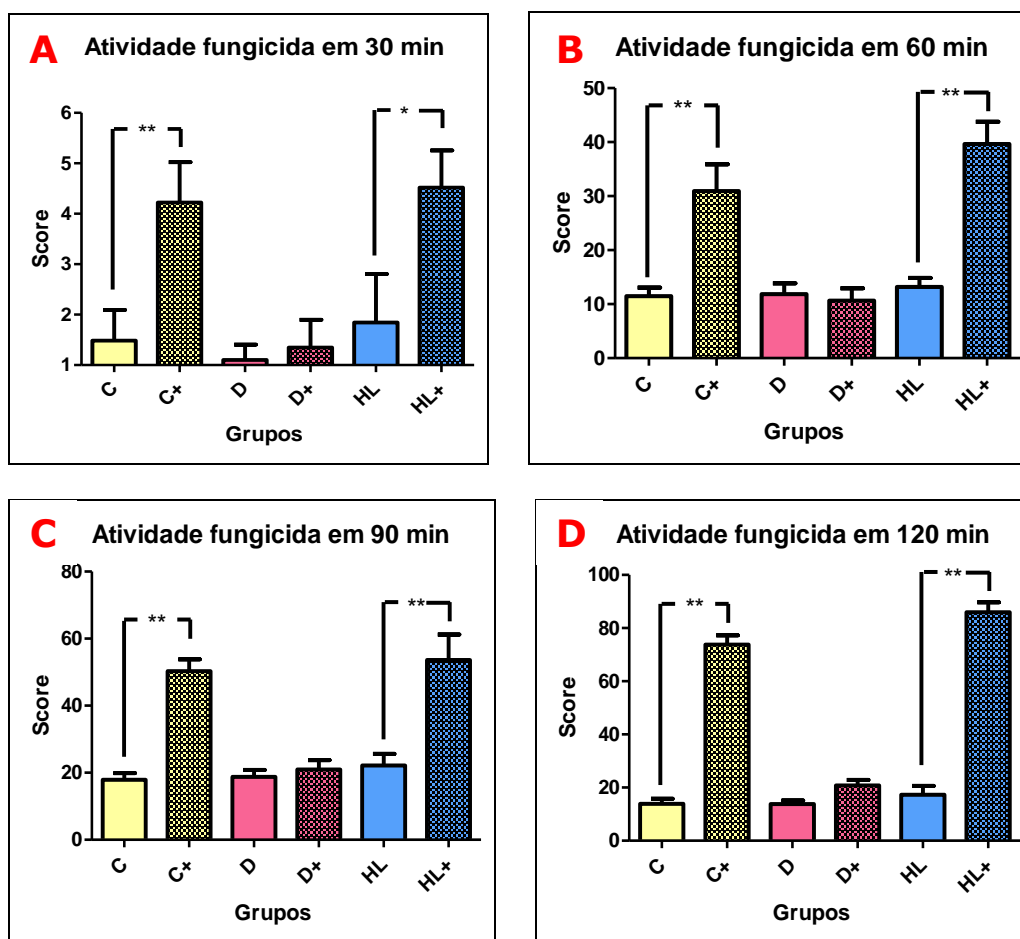


Figura 31 – Resultados, em valores médios±SDM comparativos da atividade fungicida de células opsonizadas e não opsonizadas dos grupos Controle (n=7), Desnutrido (n=7) e Hiperlipídico (n=7). *Valores significativos para $p < 0,05$. (+) representa os grupos opsonizados. n representa número de animais utilizados no experimento.

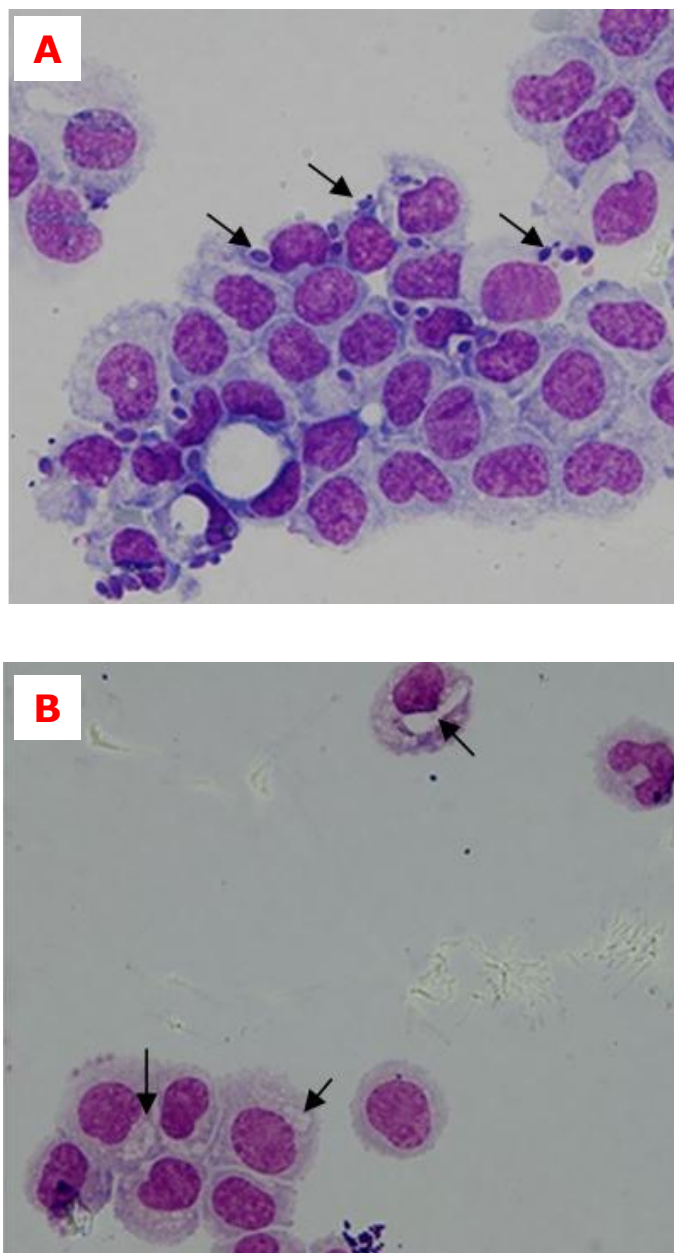


Figura 32 – Fotomicrografia representativa mostrando a fagocitose de fungos *Candida albicans* por macrófagos peritoneais. A primeira foto mostra fungos vivos corados de modo basófilo (setas) enquanto que a segunda foto apresenta fungos fagocitados e mortos (setas), que não são corados. (Aumento de 1.000x). Coloração: May-Grunwald modificado por Roselfeld, 1947.

4.5.7 Produção de citocinas em sobrenadante de cultura de macrófagos peritoniais (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10)

Fizemos a avaliação de TNF α , IL-1 β e IL-10 no soro dos animais e não foi encontrada produção significativa dessas citocinas. Identificamos apenas a produção de IL-6 (Figura 36C).

A avaliação dessas quatro citocinas em sobrenadante de cultura de macrófagos após 2h de cultivo e notamos que não houve diferença na produção de TNF α e IL-1 β entre os grupos, no entanto a produção de IL-10 mostrou-se elevada tanto no grupo desnutrido estimulado como no grupo não estimulado.

A avaliação de citocinas em sobrenadante de cultura de macrófagos após 24h (Fig. 33) mostrou uma produção de TNF α semelhante entre controle e desnutrido, mas elevada no grupo hiperlipídico. Quando estimulados, encontramos uma resposta ao estímulo elevada no grupo controle, se assemelhando ao grupo hiperlipídico. No entanto, o grupo desnutrido não responde ao estímulo.

A produção de IL-1 β não apresentou diferenças significativas entre os grupos, mesmo entre os estimulados, após cultura de 24h.

A produção de IL-6 mostrou-se semelhante entre os grupos controle, desnutrido e hiperlipídico. Quando estimulados, apresentaram resposta semelhante, sendo a resposta do desnutrido levemente menor.

A produção de IL-10 foi semelhante nos grupos controle e hiperlipídico e tiveram um pequeno aumento após o estímulo. No entanto, o grupo desnutrido mostrou níveis elevados dessa citocina.

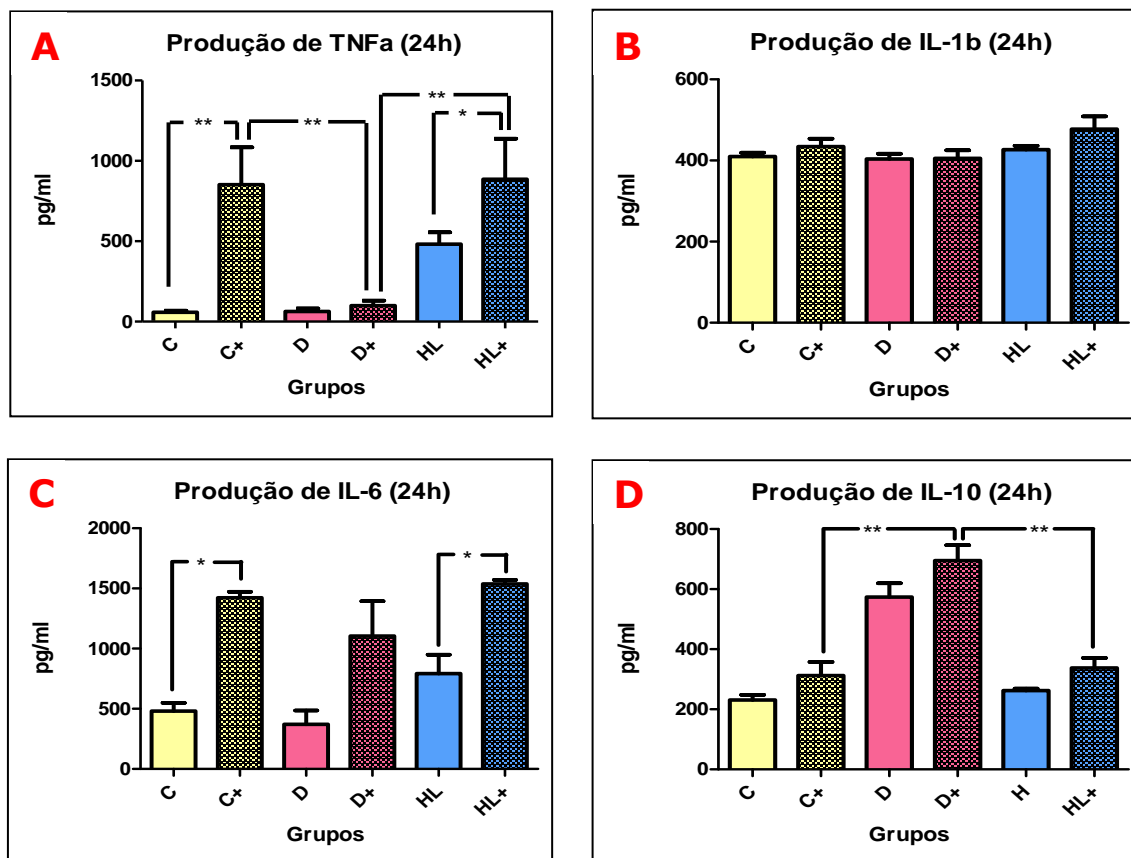


Figura 33 – Resultados, em valores médios \pm SDM, da concentração sérica de citocinas (TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) em sobrenadante de cultura após 24h dos grupos C - Controle (n=9), D - Desnutrido (n=9) e HL - Hiperlipídico (n=9); C+, D+ e HL+ = grupos estimulados com LPS (1,25pg/mL) *Valores significativos para p<0,05. n representa número de animais avaliados.

4.5.7.1 Produção de citocinas no tecido adiposo (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10)

Fizemos também a avaliação de TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 no sobrenadante de cultura de adipócitos dos animais após 2h.

Os grupos Controle ($23,23 \pm 3,0$ pg/mL), Desnutrido ($15,04 \pm 2,8$ pg/mL) e Hiperlipídico ($21,83 \pm 3,4$ pg/mL) sem estímulo tiveram produção semelhante de TNF α . No entanto ao estimular os grupos, notamos que o grupo Hiperlipídico ($44,13 \pm 2,9$ pg/mL) teve um aumento da produção dessa citocina em relação ao grupo não estimulado, enquanto que os grupos Controle ($33,71 \pm 6,3$ pg/mL) e Desnutrido ($29,83 \pm 3,9$ pg/mL) não apresentaram diferença significativa (Figura 34B).

A dosagem de IL-1 β e ao compararmos os grupos não estimulado e estimulado, notamos que os grupos Controle ($16,7 \pm 2,3$ pg/mL e $18,8 \pm 0,91$ pg/mL), Desnutrido ($11,5 \pm 2,1$ pg/mL e $14,6 \pm 1,7$ pg/mL) e Hiperlipídico ($20,0 \pm 3,1$ pg/mL e $24,7 \pm 1,5$ pg/mL) não apresentaram diferença significativa após o estímulo. No entanto, encontramos uma maior produção de IL-1 β no grupo Hiperlipídico estimulado, em relação ao Controle e Desnutrido também estimulados (Figura 34B).

A dosagem de IL-6 mostrou resultados muito semelhantes entre os três grupos, não sendo encontrado diferenças significativas entre os grupos não estimulado e estimulado do Controle ($242,5 \pm 12,0$ pg/mL e $278,0 \pm 27,5$ pg/mL), Desnutrido ($229,0 \pm 19,2$ pg/mL e $239,2 \pm 19,1$ pg/mL) e Hiperlipídico ($325,5 \pm 9,4$ pg/mL e $340,3 \pm 5,2$ pg/mL). A única diferença foi encontrada entre o grupo Desnutrido estimulado e o grupo Hiperlipídico igualmente estimulado (Figura 34C).

Por fim, realizamos a dosagem de IL-10, onde encontramos dados semelhantes nos grupos não estimulado e estimulado do Controle ($67,25 \pm 15,7$ pg/mL e $82,25 \pm 23,1$ pg/mL) e Hiperlipídico ($64,25 \pm 27,0$ pg/mL e $85,50 \pm 25,2$ pg/mL). Mas encontramos um aumento dessa citocina nos grupos desnutrido não estimulado ($133,0 \pm 19,5$ pg/mL) e estimulado ($213,7 \pm 24,1$ pg/mL) conforme Figura 34D.

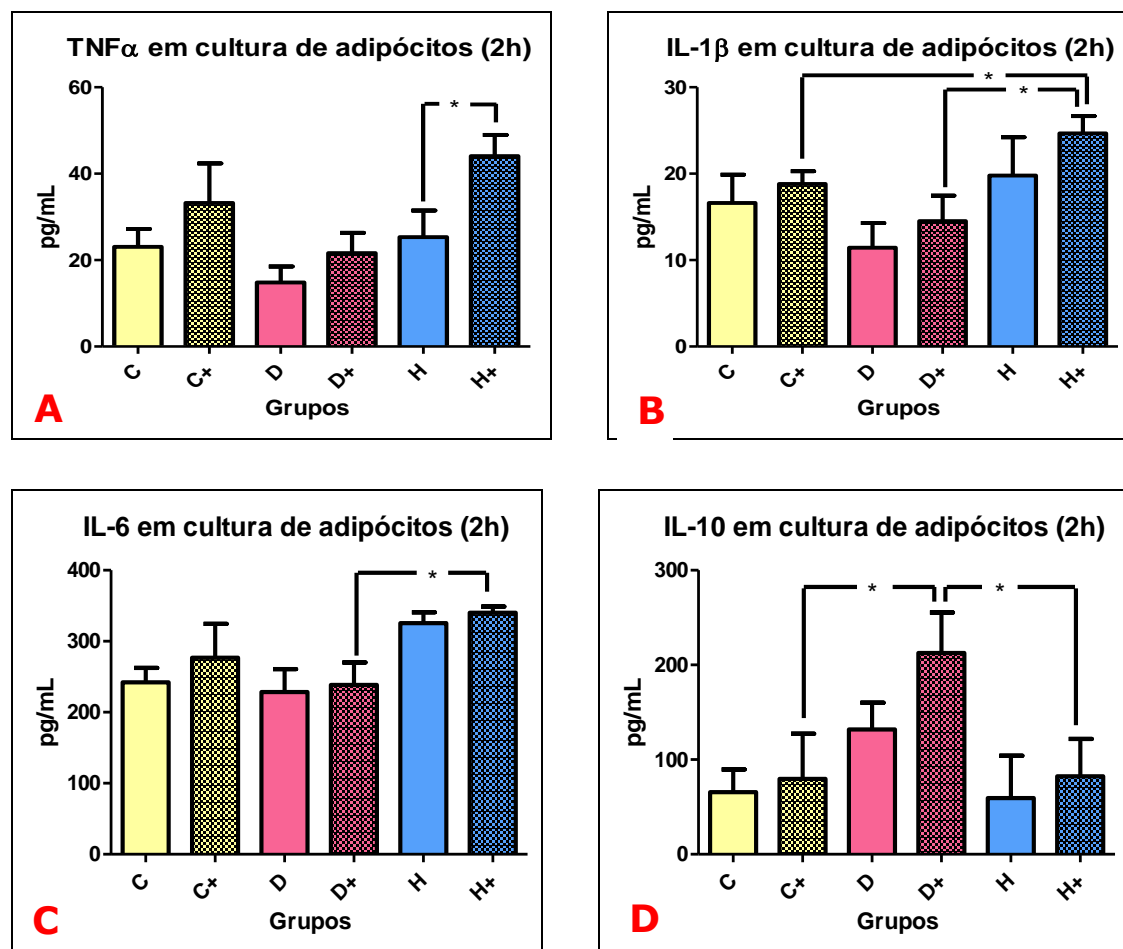


Figura 34. Resultados, em valores médios \pm SDM, da concentração de citocinas (TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) em cultura de adipócitos após 2h dos grupos C - Controle (n=9), D - Desnutrido (n=9) e HL - Hiperlipídico (n=9); C+, D+ e HL+ = grupos estimulados com LPS (1,25pg/mL) *Valores significativos para p<0,05. n representa número de animais avaliados.

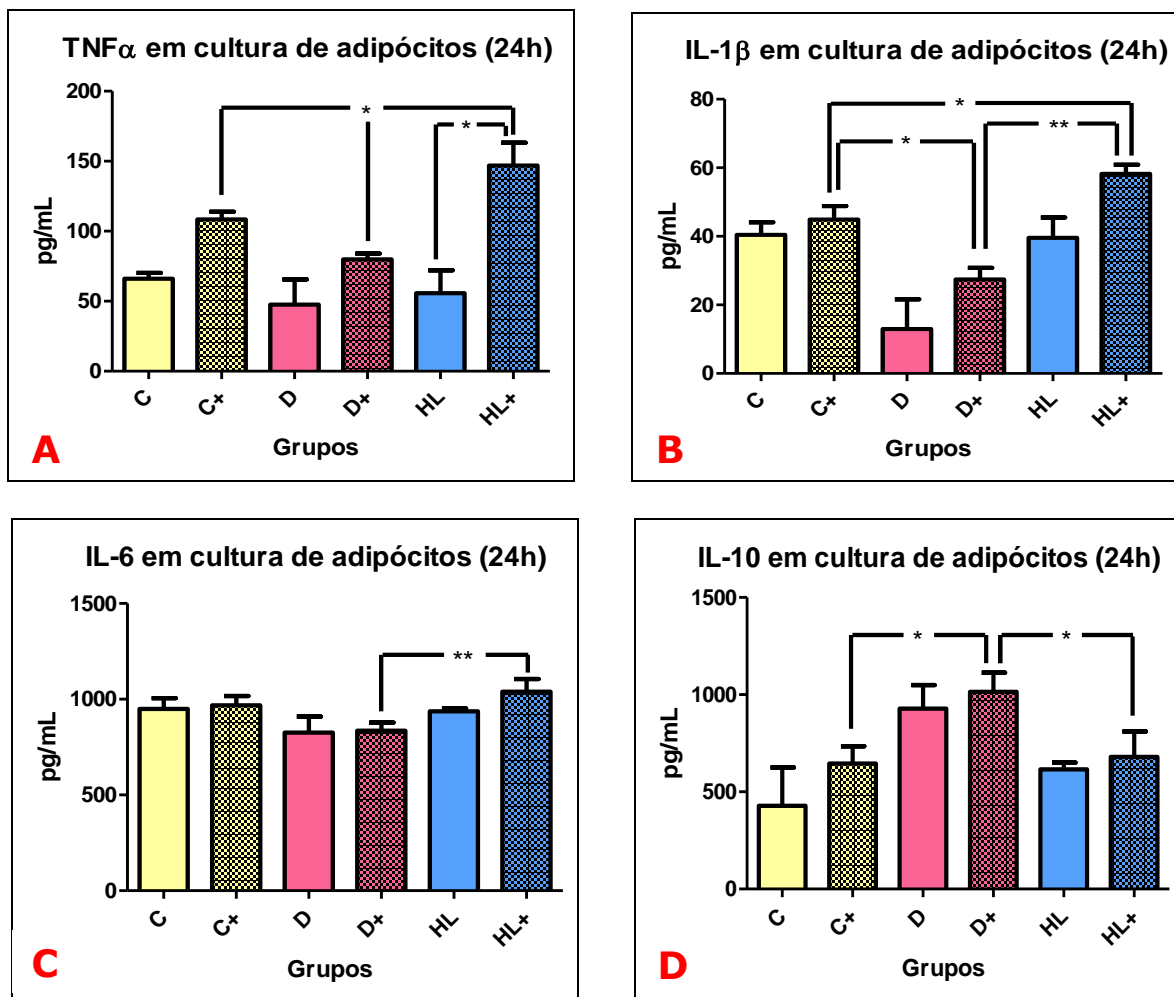


Figura 35. Resultados, em valores médios \pm SDM, da concentração de citocinas (TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) em cultura de adipócitos após 24h dos grupos C - Controle (n=8), D - Desnutrido (n=8) e HL - Hiperlipídico (n=8); C+, D+ e HL+ = grupos estimulados com LPS (1,25pg/mL) *Valores significativos para p<0,05. n representa número de animais avaliados.

4.6 Produção de Adipocinas

Realizamos a dosagem das seguintes adipocinas no soro dos animais: Leptina, Resistina, Adiponectina.

A leptina (Figura 36A) foi encontrada em níveis mais elevados no grupo Hiperlipídico ($8,4 \pm 6,8$ pg/mL) e em níveis mais reduzidos no grupo Desnutrido ($2,9 \pm 1,6$ pg/mL) em relação ao grupo Controle ($5,8 \pm 4,7$ pg/mL).

A produção de resistina (Figura 36B) não apresentou diferenças significativas entre os grupos Controle (2184 ± 861 pg/mL) e o grupo Desnutrido (1814 ± 664 pg/mL), no entanto apresentou uma maior produção no grupo Hiperlipídico (3424 ± 1811 pg/mL).

A adiponectina (Figura 36D), uma adipocina associada a ação anti-inflamatória, foi encontrada em níveis mais elevados no grupo Desnutrido ($18,9 \pm 6,6$ ug/mL) e em menor quantidade no grupo Hiperlipídico ($8,8 \pm 2,1$ ug/mL) em relação ao grupo Controle ($12,4 \pm 5,7$ ug/mL).

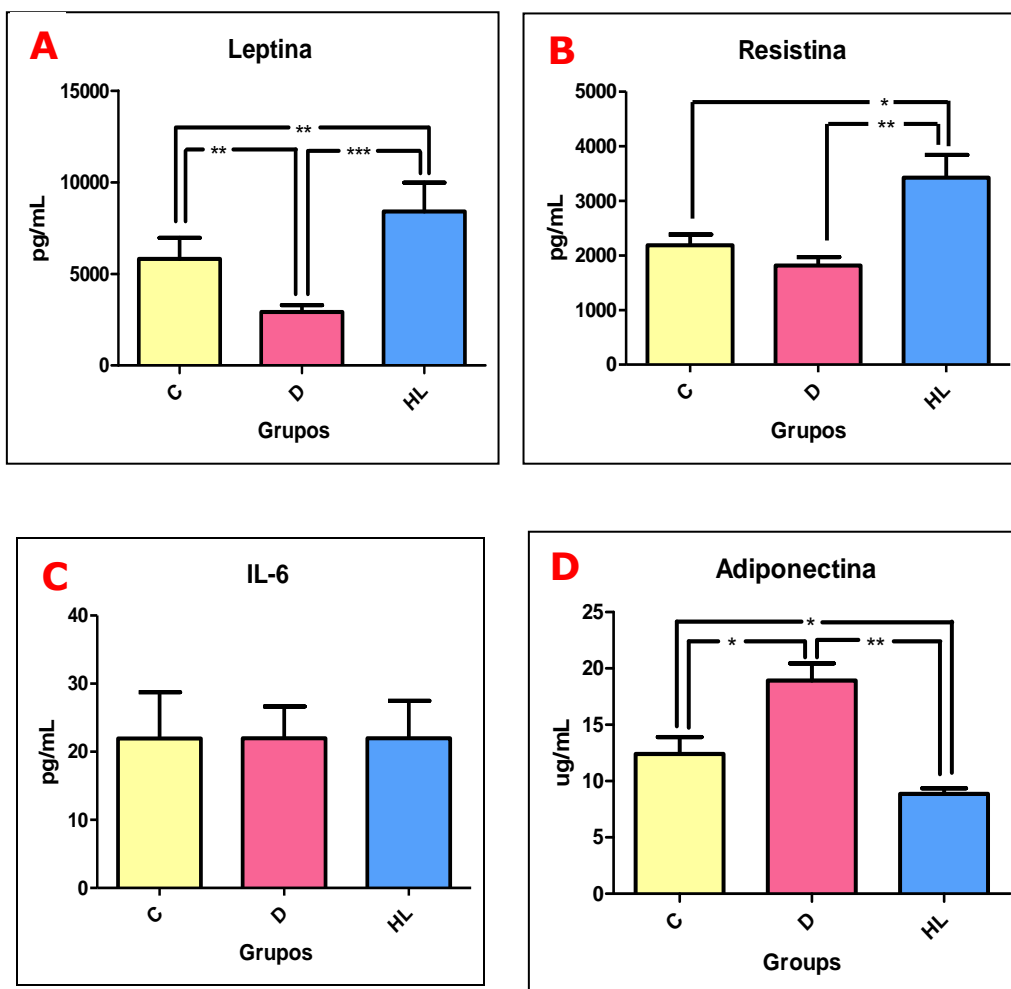


Figura 36. Resultados, em valores médios \pm SDM, da concentração sérica de adipocinas (Leptina, Resistina, IL-6 e Adiponectina) no soro, dos grupos C - Controle (n=18), D - Desnutrido (n=19) e HL - Hiperlipídico (n=19); *Valores significativos para $p < 0,05$. n representa número de animais avaliados.

4.7 Produção de Proteína C reativa e MCP-1

A Proteína C reativa (Figura 33A) dosada no soro dos animais mostrou-se significativamente aumentada ($15,38 \pm 6,7$ ng/mL) no grupo Hiperlipídico em relação ao grupo Desnutrido ($8,98 \pm 3,7$ ng/mL) e ao grupo Controle ($11,73 \pm 5,5$ ng/mL).

A Proteína Quimiotática dos Monócitos (MCP-1) (Figura 33B) foi encontrada em concentrações semelhantes no soro dos animais de todos os grupos, não apresentando diferença significativa entre os grupos Controle ($40,9 \pm 17,7$ pg/mL), Desnutrido ($39,8 \pm 30,0$ pg/mL) e Hiperlipídico ($43,8 \pm 39,5$ pg/mL).

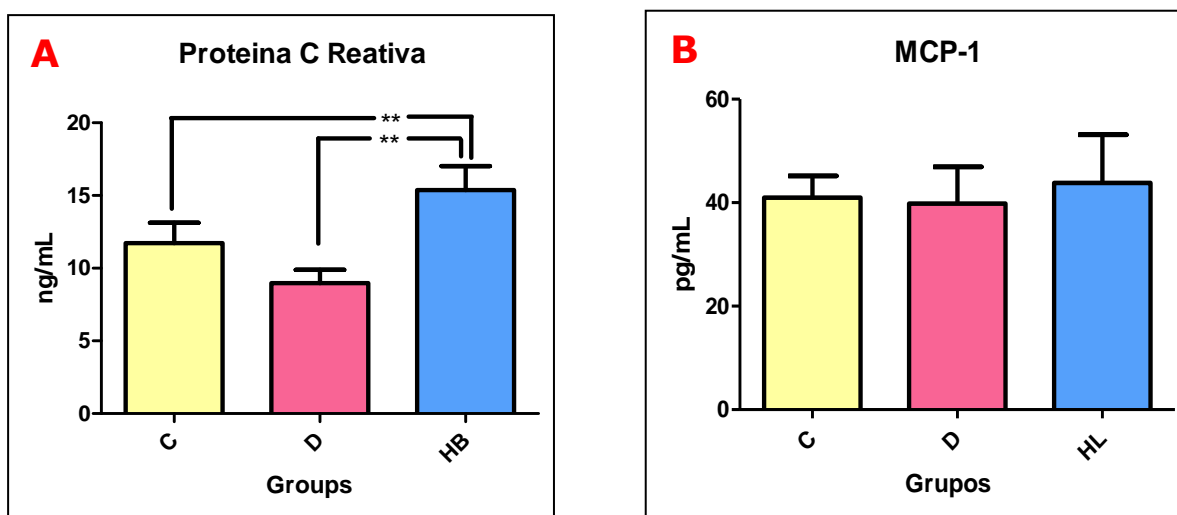


Figura 37 – Resultados, em valores médios \pm SDM, da concentração sérica de Proteína C Reativa dos grupos C - Controle (n=18), D - Desnutrido (n=19) e HL - Hiperlipídico (n=19); *Valores significativos para $p < 0,05$. n representa número de animais avaliados.

5. DISCUSSÃO

Alterações em componentes da dieta podem influenciar importantes mecanismos de defesa frente a patógenos. Neste trabalho comparamos, em modelo murino, o efeito da dieta hipoprotéica e da dieta hiperlipídica tendo como controle uma ração normoprotéica e normocalórica, sobre alguns aspectos da imunidade inata, incluindo-se aqui a resposta do tecido hemopoiético, a fisiologia e parâmetros hematológicos. Com a ração hiperlipídica tentamos induzir uma situação de obesidade, sendo que a ração utilizada apresenta teores adequados de nutrientes com exceção do teor de lipídios que foi modificado acrescentando-se banha de porco (30% da composição da ração) em substituição a parte do amido de milho como fonte energética e, dessa maneira, favorece o ganho de massa corporal. Já a ração hipoprotéica teve como finalidade induzir uma situação de desnutrição e para tanto utilizamos uma ração contendo 2% de proteína, sendo que a ração normoprotéica contém 12% de caseína (REEVES et al., 1993).

O camundongo *Swiss webster* é uma espécie não isogênica frequentemente utilizado para caracterizar a diversidade imunológica dentro de uma população. Foram utilizados animais machos para evitar alterações hormonais características de fêmeas durante o ciclo estral e que podem interferir no perfil hematológico. Usamos animais de 2 a 3 meses de vida por já estarem em fase adulta e com sua maturidade hematopoética concluída, evitando variáveis pela baixa ou avançada idade (FOCK, 2005; WU et al., 2013). O procedimento de indução utilizado em nosso trabalho tem duração de cinco semanas (35 dias). Traçando um paralelo com humanos, este período num camundongo equivaleria, aproximadamente, a dois anos no período de vida do ser humano (QUINN, 2005). Ou seja, o processo de indução à desnutrição ou de dieta hiperlipídica por 35 dias equivaleria a dois anos de alterações na dieta, sendo o nosso modelo considerado de crônico e grave.

É importante lembrar que há diversos tipos de dietas hiperlipídicas. Alguns pesquisadores tem utilizado a chamada “dieta de cafeteria” que contém uma diversidade de alimentos calóricos, como biscoitos, balas, queijo, doces e chegam inclusive a colocar açúcar na água. Essa dieta é bem mais palatável e mais

energética, o que leva a alterações metabólicas mais pronunciadas que a nossa dieta hiperlipídica, pois leva à hiperfagia. A comparação entre a “dieta de cafeteria” e a dieta utilizada nesse trabalho, com banha de porco, foi observada num grupo de ratos *Wistar* de 7-8 semanas de vida durante 15 semanas. Ambas aumentaram a adiposidade e a produção de insulina, mas a intolerância a insulina e acúmulo de gordura foram mais pronunciados no grupo submetido à dieta de cafeteria (SAMPEY *et al.*, 2011). O consumo de calorias foi 40% maior nos animais submetidos à “dieta de cafeteria” enquanto que o outro grupo teve consumo calórico semelhante ao controle.

Por apresentar uma dieta muito mais parecida com a utilizada atualmente por grande parte da população, com alimentos processados, ricos em gordura saturada, gordura trans, açúcar, sódio e poucas fibras, o estudo da dieta de cafeteria é importante. No entanto, essa dieta apresenta uma variedade muito grande na quantidade dos micro e macronutrientes, sendo difícil interpretar qual ou quais nutrientes são agentes causais das alterações e se é a falta de micronutrientes ou excesso de macronutrientes que está ocasionando as alterações metabólicas, por isso optamos por não adotá-la nesse trabalho.

O consumo de ração, em nosso modelo, mostrou-se heterogêneo, com um consumo discretamente maior dos animais do grupo desnutrido em relação ao controle. Os camundongos jovens são capazes de se adaptar a desnutrição crônica ocasionada por restrição moderada de proteínas (HUANG & FRAKER, 2003). Além de aumentar a absorção de aminoácidos provenientes da dieta, aumentam também a reabsorção de aminoácidos endógenos originários do catabolismo protéico em consequência da diminuição da proteína na ração. Outra forma de adaptação também seria o aumento do consumo de ração para compensar a falta de proteínas provenientes da dieta. Esse mecanismo ocorre através de uma sinalização ocasionada pela redução da ingestão de aminoácidos essenciais, o que leva o animal a aumentar a ingestão de ração para tentar estabilizar a massa corpórea (WHITE *et al.*, 2000) e equilibrar as necessidades protéicas do animal (WEBSTER, 1993).

Já os animais do grupo hiperlipídico, em nosso modelo, apresentaram consumo 33% menor que os animais do grupo controle. Animais submetidos à dieta

hiperlipídica apresentam tendência a diminuir a quantidade de ração ingerida na tentativa de controlar o ganho energético (CARMO, 2012). A diminuição no consumo de ração fez com que mudássemos a quantidade dos componentes da ração para que pudéssemos equiparar o consumo de nutrientes entre os grupos (BORGES, 2011; CARMO *et al.*, 2013). A quantidade de nutrientes foi aumentada em 33% na ração hiperlipídica (como demonstrado na Tabela 1) de modo a dar a cada animal a mesma quantidade diária de nutrientes em ambos os grupos. Ao final do experimento, constatamos que a ingestão calórica apresentou-se semelhante, sem diferença significativa entre os três grupos.

Nos animais do grupo hiperlipídico, não foi observado nenhum sintoma de intolerância à ração hiperlipídica, tais como fezes volumosas, mal cheirosas ou de aspecto oleoso (ROBERTSON, 2013). Também não foi identificada mudança de comportamento nos animais dos diferentes grupos.

Ao final do período de cinco semanas, usado para indução à desnutrição e à obesidade, constatamos que o grupo desnutrido teve uma perda de peso de cerca de 16% e o grupo hiperlipídico aumentou seu peso em 20% em relação ao primeiro dia de dieta. A queda de peso do grupo desnutrido pode estar ligada ao fato do músculo esquelético ser um importante reservatório de proteínas, que será depletado quando ocorrer um déficit deste nutriente, reduzindo significativamente a massa corpórea (ALVES *et al.*, 2008; MALAFAIA *et al.*, 2010).

Alguns animais do grupo hiperlipídico não apresentaram um ganho de peso tão elevado em relação ao grupo controle, provavelmente pela menor ingestão de ração, no entanto, notamos significativo aumento da gordura depositada nos coxins adiposos (retroperitoneal e epididimal) indicando aumento na adiposidade central e visceral, como demonstrado por outros trabalhos da literatura (DUARTE *et al.*, 2006; ESTADELLA *et al.*, 2004). Isso se deve ao fato do animal estar consumindo uma grande quantidade de gordura. Outro aspecto que também pode contribuir para o aumento da gordura visceral seria o gasto energético ligado ao efeito térmico dos alimentos. Este fator aponta o gasto energético dos processos de digestão, absorção e armazenamento dos nutrientes. Os lipídios apresentam eficiência de utilização de até 98%, enquanto que proteínas variam de 70 a 75% e os

carboidratos entre 92 e 94% (HARIRI e THIBAUT, 2010). Apesar dos animais consumirem quantidades semelhantes de calorias nos três grupos, a composição das rações varia em relação aos macronutrientes, o que resulta na diferença da eficiência de utilização dessas calorias ingeridas. No entanto, os micronutrientes foram ajustados para serem consumidos em quantidades semelhantes, para que não tivéssemos mais variáveis que possam influenciar nos aspectos observados.

Com uma menor ingestão de proteínas no grupo desnutrido constatamos, como esperado, a redução de proteínas totais e albumina no soro. A albumina sérica é uma das principais proteínas associadas ao estado nutricional. A queda na concentração de albumina pode indicar uma diminuição na biossíntese hepática decorrente de um suprimento limitado de substrato protéico (CUPPARI, 2009). A diminuição de albumina também pode estar relacionada a um quadro inflamatório, visto que temos uma diminuição da produção de albumina, para produzir proteínas pró-inflamatórias, como a proteína C reativa, mas, nessa situação, não é acompanhada de uma diminuição da quantidade de proteínas totais (HARIRI & THIBAUT, 2010).

A dosagem de glicose e insulina plasmática demonstrou níveis mais baixos nos animais do grupo desnutrido e semelhante entre os animais dos grupos controle e hiperlipídico. Acreditamos que essa hipoglicemia possa estar relacionada à redução da concentração sérica de insulina encontrada em animais desnutridos (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Mas apesar do grupo hiperlipídico apresentar taxa glicêmica e insulínica semelhante ao controle, mostra uma redução da sensibilidade a este hormônio, demonstrado pelo índice HOMA-IR (KOLEVA *et al.*, 2013; RICCARDI *et al.*, 2004).

O colesterol sérico apresentou-se significativamente elevado em animais do grupo hiperlipídico em relação ao grupo controle e desnutrido. Isso se deve a quantidade e qualidade de gordura ingerida diariamente. Dietas ricas em ácidos graxos saturados elevam os níveis séricos de colesterol total, aumentando a incidência de dislipidemias e problemas cardiovasculares (DUVILLARD, 1997).

A formação de triacilglicerol está ligada não só a quantidade de lipídios ingerida, mas fundamentalmente à ingestão de carboidratos complexos, como o amido. A ração hiperlipídica utilizada apresenta uma quantidade pequena de amido (19%) em relação

ao grupo controle (64%) e desnutrido (74%), isso pode explicar o fato de termos uma diminuição dos depósitos de triacilglicerol no grupo hiperlipídico, mesmo ingerindo uma quantidade maior de lipídios. A redução de triacilglicerol no grupo desnutrido pode estar ligada a inibição da lipase lipoprotéica tecidual (FERNANDES & BEZERRA, 2006; SILVA, 2006).

O grupo hiperlipídico apresentou, além do aumento de adiposidade visceral e colesterol, uma maior produção de proteína C reativa e MCP-1, citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF α), adipocinas (leptina e resistina). As alterações encontradas são compatíveis com a Síndrome Metabólica, observada em humanos (BREMER & JIALAL, 2013; RICCARDI *et al.*, 2004; ROMEO *et al.*, 2013).

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda, sendo produzida em maior quantidade em momentos de inflamação. Sua regulação é realizada pelas citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF α . Embora o fígado seja a principal fonte de PCR, os adipócitos e as células endoteliais também a sintetizam. Seus níveis estão aumentados em resposta às infecções ativas ou ao processo inflamatório agudo (VOLP *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2003). Estudos com ratos *Wistar* submetidos à dieta hiperlipídica, encontraram um aumento das concentrações de proteína C reativa (CARMO, 2012). Em nosso trabalho não encontramos diferença entre os grupos controle e desnutrido, mas há aumento significativo de sua produção nos animais submetidos a dietas hiperlipídicas, o que poder caracterizar um processo inflamatório nesses animais. A leptina e o TNF α , aumentados na obesidade, podem induzir a produção de PCR (PATEL *et al.*, 2013; SILVEIRA *et al.*, 2009), parâmetros estes que encontramos elevados nos animais do grupo hiperlipídico em relação aos animais do grupo controle.

A MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) chamada Proteína Quimiotática de Monócitos ou CCL1, é produzida por uma variedade de células, tais como leucócitos, células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos, em resposta a LDL oxidada e citocinas pró-inflamatórias, sendo, desse modo, também um produto da reação inflamatória. Ela é expressa e secretada no tecido adiposo e atua na quimiotaxia de monócitos e macrófagos para os sítios de inflamação, favorecendo a infiltração de macrófagos no tecido adiposo de indivíduos obesos (KANDA *et al.*, 2006). Uma vez ativados, os macrófagos secretam fatores inflamatórios como TNF α e IL-6,

umentando a resposta inflamatória e a resistência insulínica. Dessa forma, a MCP-1 contribui para resistência insulínica e diminuição da captação de glicose. Além disso, a MCP-1 também estimula a secreção de leptina por mecanismos pós-transcricionais. (GUSTAFSON, 2010; SARTIPY & LOSKUTOFF, 2003). Níveis aumentados de MCP-1 têm sido encontrados em pacientes hiperlipidêmicos, visto que suas concentrações foram correlacionadas com o LDL-colesterol (VOLP *et al.*, 2008).

O TNF α é uma citocina pró-inflamatória que pode atuar na ativação de neutrófilos, síntese de proteínas de fase aguda, estimulando a secreção de quimiocinas, além de estimular a atividade microbicida, a produção de IL-1 α e a apoptose (OLEFSKY & GLASS, 2009). A produção de TNF α foi avaliada em diversos trabalhos de nosso grupo e foi constatado que se encontra diminuída em casos de desnutrição protéica (FOCK *et al.*, 2007; CORTEZ *et al.*, 2013; CRISMA, 2010). No entanto, numa condição de consumo elevado de lipídios há dados controversos, onde encontramos estudos que apontam para o aumento dessa citocina (CORTEZ *et al.*, 2013; WARNE, 2003) e outros mostrando que ela não apresenta-se alterada (CARMO *et al.*, 2013; BORGES, 2011, JACOB *et al.*, 2013).

Neste trabalho, não detectamos concentração sérica significativa de TNF α . Contudo essa resposta difere quando avaliamos a produção dessas citocinas em sobrenadante de cultura de macrófagos peritoniais e de adipócitos. Enquanto os animais desnutridos produzem menor quantidade de TNF α , as culturas celulares de animais tratados com dieta hiperlipídica apresentaram valores significativamente maiores.

O TNF α age no adipócito regulando o acúmulo de gordura, além de atuar em processos dependentes de insulina, como a homeostase glicêmica e o metabolismo de lipídios (WARNE, 2003). JELLEMA e colaboradores (2004) apontam uma correlação entre o TNF α e o IMC (índice de massa corporal), ou seja, a redução da massa corporal estaria ligada a diminuição da concentração dessa citocina, o que explicaria no fato de estar aumentada em obesos e diminuída em desnutridos. O aumento da lipólise decorreria do estímulo proporcionado pelo TNF α na expressão da enzima lipase hormônio sensível, levando à diminuição da atividade da lipase lipoprotéica (GUIMARAES *et al.*, 1995).

A IL-1 β também é uma citocina pró-inflamatória e age sinergicamente com o TNF α na imunidade natural e na inflamação. A produção dessa citocina se dá pela via de sinalização TLR4 que culmina na ativação do fator de transcrição NF-kB. Suas principais ações biológicas são aumentar a expressão de moléculas de superfície, síntese de proteínas de fase aguda, produção de plaquetas e neutrófilos pela medula óssea (OLEFSKY & GLASS, 2009).

Neste trabalho não encontramos níveis séricos significativos de IL-1 β . No entanto, ao avaliar o sobrenadante de cultura de macrófagos peritoniais encontramos produção, mas sem diferenças entre os grupos. Ao estudarmos a produção dessa citocina pelo tecido adiposo, encontramos uma menor produção de IL-1 β em desnutridos e nos animais hiperlipídicos encontramos uma elevação da produção dessa citocina, principalmente após 24 horas. Acreditamos que a diminuição de IL-1 β na desnutrição se deva ao fato de apresentar uma menor ativação da via de transcrição NF-kB (FOCK *et al.*, 2007; CRISMA, 2010).

A IL-6 é uma citocina atuante tanto na imunidade natural como adquirida. Sua produção é estimulada pela presença de microorganismos e também pelas citocinas IL-1 β e TNF α . A IL-6 estimula a produção de proteínas de fase de fase aguda, bem como a produção de leucócitos, como neutrófilos e linfócitos B, que se diferenciam para produção de anticorpos. No tecido adiposo está presente em grande quantidade e podem atuar, além da inflamação, como agentes de lipólise (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006; TILG & MOSCHEN, 2006).

Encontramos produção significativa de IL-6 no plasma de maneira homogênea em todos os grupos. No sobrenadante de cultura de macrófagos peritoniais encontramos também produção muito semelhante nos grupos não estimulados. Apesar disso, o desnutrido não respondeu ao estímulo, diferente do controle e hiperlipídico. Acreditamos que esse comportamento pode ser decorrente de uma menor expressão de IL-1 β e TNF α , produzidas em menor quantidade nos desnutridos (CRISMA, 2010; FOCK *et al.*, 2007).

Ao analisarmos a produção de IL-6 no tecido adiposo, encontramos uma maior produção no grupo hiperlipídico. Essa maior produção pode ser ligada ao fato dessa citocina estar sendo produzida em maior quantidade pelo aumento de outras

adipocinas, como a leptina, IL-1 β e TNF α que estimulam sua produção (PATEL *et al.*, 2013; SILVEIRA *et al.*, 2009).

A produção de IL-10 pode encontrar-se elevada em decorrência de uma desnutrição protéica (CRISMA, 2010; HILLYER *et al.*, 2006; RODRÍGUEZ *et al.*, 2007), enquanto que em animais hiperlipídicos encontramos estudos que mostram uma queda na produção dessa citocina (BORGES, 2011) e outros que mostram que ela não estaria alterada (CARMO *et al.*, 2013). Nosso trabalho encontrou um aumento de IL-10 em casos de desnutrição e uma produção normal nos animais hiperlipídicos. Como a adiponectina está elevada em casos de desnutrição, ela eleva a produção de IL-10 para potencializar o efeito anti-inflamatório (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006; PRADO *et al.*, 2009; RODINA & SEVERIN, 2013; WOLF *et al.*, 2004).

Após avaliar a produção de citocinas séricas e as produzidas por macrófagos peritonais, notamos que o grupo desnutrido apresenta uma queda de citocinas pró-inflamatórias e aumento de IL-10 (citocina que inibe o eixo Th1 da resposta imune inespecífica), mas o grupo hiperlipídico não apresentou o aumento de citocinas inflamatórias sistemicamente, apenas de proteína C reativa. Contudo, nos parece, pelos resultados obtidos, que a dieta hiperlipídica leva a um processo inflamatório localizado em determinados tecidos.

O presente trabalho encontrou uma maior produção de leptina em animais hiperlipídicos o que é explicado pelo aumento da adiposidade. O alto consumo de lipídios estimula a maior produção de leptina. A menor produção de leptina em animais desnutridos pode estar ligada a diminuição do tecido adiposo, pois os teores circulantes são proporcionais à massa adiposa (HALAAS *et al.*, 1995). A leptina atua no sistema imune estimulando a produção de leucócitos na medula óssea, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF α e IL-6, adesão e fagocitose de macrófagos, além de estimular a proliferação das células T, levando ao aumento da competência imunológica (SILVEIRA *et al.*, 2009; YOUSSEF *et al.*, 2013). Estudos com ratos *Wistar* submetidos à dieta hiperlipídica, encontraram um aumento das concentrações de leptina (CARMO, 2012). Portanto os resultados encontrados no perfil hematológico e de resposta inespecífica estão coerentes com a maior produção de

leptina nos animais submetidos à dieta hiperlipídica e menor produção da mesma nos animais desnutridos.

A adiponectina é uma adipocina regulatória, atuando no aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, que possui efeito anti-inflamatório (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). A adiponectina foi também associada a uma supressão da capacidade fagocitária em macrófagos (WOLF *et al.*, 2004). No entanto, a produção da adiponectina pode ser inibida pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF α (ALVEZ, 2006; GUIMARAES *et al.*, 2007; RODINA & SEVERIN, 2013; TILG & MOSCHEN, 2006). Estudos de nosso grupo com ratos *Wistar* não encontraram diferenças significativas na produção de adiponectina em relação a grupo controle (BORGES, 2011; CARMO *et al.*, 2013). No entanto, em nosso trabalho encontramos uma produção significativamente menor de adiponectina no grupo hiperlipídico e um aumento dessa adipocina em animais desnutridos, o que corrobora o aumento da produção de IL-10 nos desnutridos, citocina regulada positivamente pelo aumento da adiponectina (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006; WOLF *et al.*, 2004) e demais resultados do perfil de resposta imune inata.

A resistina é uma adipocina expressa especificamente no tecido adiposo e sua secreção está fortemente relacionada à resistência à insulina, verificando-se aumento nas concentrações de resistina em animais obesos e diabéticos. Há ainda evidências de que a obesidade induzida por dietas hiperlipídicas está associada a elevadas concentrações circulantes de resistina. O envolvimento da resistina no processo inflamatório crônico, associado à obesidade, constitui hipótese alternativa capaz de justificar a presença dessa proteína (GUIMARAES *et al.*, 2007).

O presente estudo encontrou produção de resistina semelhante entre os grupos controle e desnutrido e um aumento no grupo hiperlipídico. Esse aumento seria ligado ao fato de termos uma maior resistência à insulina, evidenciada pelo aumento do índice HOMA-IR e pelo aumento da adiposidade, que estimula a produção desta adipocina (GUIMARAES *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2013). A ativação do fator de transcrição NF- κ B é fundamental para a resposta inflamatória, promovendo a produção de citocinas como TNF α e IL-1 β , IL-6 e MCP-1. As alterações na produção de citocinas observadas no grupo desnutrido sugeriram comprometimento da via de sinalização ativada por

LPS. Estudos do nosso grupo encontraram uma menor expressão das proteínas dessa via de sinalização em desnutridos (CRISMA, 2010; LIMA *et al.*, 2013; OLIVEIRA, 2013; FOCK *et al.*, 2010).

Corroborando o perfil pró-inflamatório dos animais submetidos à dieta hiperlipídica, esses animais apresentaram significativa neutrofilia em relação aos demais grupos, o que pode ser explicado pela produção de TNF α , IL-6 e IL-12, que aumenta a expressão de moléculas de adesão endotelial, mediando a migração de neutrófilos (BOU GHOSN *et al.*, 2010). Por outro lado, a leucopenia observada nos animais desnutridos é reflexo, em parte das alterações medulares já descritas na literatura e pelo nosso grupo, onde se encontra hipoplasia medular, que ao nosso ver está relacionada a maior permanência das células tronco/progenitoras hemopoéticas na fase G0/G1 do ciclo celular (NAKAJIMA, 2010) e alterações no processo autofágico (BELTRAN, 2013) e na matriz extracelular (SILVA, 2012; VITURI *et al.*, 2001; XAVIER *et al.*, 2007).

Esse quadro é confirmado pelos dados do mielograma dos animais utilizados nesse modelo, que mostrou na contagem absoluta redução de praticamente todas as linhagens dos animais do grupo desnutrido. No entanto não houve diferenças significativas dos animais do grupo hiperlipídico em relação ao grupo controle, demonstrando que a dieta hiperlipídica não alterou a produção medular. Ao avaliar a contagem relativa do mielograma, encontramos um aumento significativo das formas jovens de granulócitos (promielócitos, mielócitos e metamielócitos), o que pode estar associado a uma tentativa de aumentar a resposta inflamatória (STRAUSS-AYALI *et al.*, 2007).

A adesão de macrófagos foi prejudicada pela desnutrição. Acreditamos que a diminuição de proteínas específicas pode ser a causa dessa diminuição. A maior adesão de macrófagos, identificada em animais hiperlipídicos, pode ser explicada pela ação da leptina que estimula a adesão (SILVEIRA *et al.*, 2009) além da produção de citocinas inflamatórias que estimulam a atividade macrofágica (MILNER & BECK, 2012). No desnutrido a diminuição da capacidade adesiva deve-se a alterações da atividade do macrófago (MARCO *et al.*, 2003).

Poucos estudos têm sido feitos em relação à adesão e espraiamento de macrófagos em desnutridos e obesos. Alguns trabalhos de nosso grupo mostraram que em animais desnutridos há uma redução do espraiamento de macrófagos (CRISMA, 2010, SOUZA *et al.*, 2001). Em nosso trabalho, pudemos observar uma diminuição do espraiamento de macrófagos em animais desnutridos, tanto no tempo de 2 horas quanto em 24 horas. Também foi observado que o estímulo com LPS não surtiu efeito em nenhum dos tempos nas células oriundas de animais desnutridos. Essa redução de atividade pode estar ligada ao comprometimento da atividade macrofágica, caracterizada pela diminuição da produção de citocinas estimuladoras da ativação dos macrófagos, como IL-6 e TNF α (FOCK *et al.*, 2007; RAMALHO & GUIMARAES, 2008).

O espraiamento em macrófagos de animais hiperlipídicos mostrou-se também diminuído após 2 horas, mas não apresentou alterações em relação ao controle após 24 horas. Em todos os tempos, as células responderam ao estímulo, espraiando significativamente.

A fagocitose é um processo de englobamento de partículas que excedam 1 μ m. Seu principal objetivo é a morte e/ou inativação dos patógenos (ADEREM & UNDERHILL, 1999). A diminuição da fagocitose nas células dos animais desnutridos pode estar relacionada com a menor produção de citocinas pró-inflamatórias que estimulam a ativação de macrófagos (GREENBERG & GRINSTEIN, 2002; REDMOND *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2001). Já o aumento da fagocitose nas células oriundas dos animais do grupo hiperlipídico pode ser decorrente da amplificação da produção de citocinas pró-inflamatórias, que estimulam a ativação macrofágica (FLANNAGAN *et al.*, 2010; SILVEIRA *et al.*, 2009).

Os processos fagocíticos são acionados por um rearranjo finamente controlado do citoesqueleto. Uma variedade de sinais pode convergir para reorganizar o citoesqueleto de actina em um fagossoma. Avanços recentes demonstraram a complexidade da sinalização fagocítica, tais como o envolvimento de lipídios complexos e sinalização na transdução de sinais a partir de receptores fagocíticos ao citoesqueleto (MAY & MACHESKY, 2001).

A opsonização é um mecanismo importante que visa aumentar a eficiência da fagocitose, através da fixação do complemento ou de anticorpos (ADEREM &

UNDERHILL, 1999). Neste trabalho pudemos ver claramente que a opsonização foi fundamental para o aumento do processo fagocítico. Observamos que as células dos animais que foram colocadas em contato com a *Candida albicans* não opsonizada não tiveram diferenças entre si, demonstrando que a desnutrição e a obesidade não apresentam comprometimento do receptor de manose, responsável pelo reconhecimento de fungos pelos macrófagos (PRESTES-CARNEIRO *et al.*, 2006). Já nos grupos cujas células foram colocadas em contato com a *Candida albicans* opsonizada, encontramos aumento significativo da atividade fagocítica nos grupos controle e hiperlipídico, mas não no grupo desnutrido, que permanece com a atividade fagocítica baixa, o que pode caracterizar uma alteração no sistema complemento, visto ser ele o responsável pelo reconhecimento do fungo (GREENBERG & GRINSTEIN, 2002).

A atividade fungicida encontra-se diminuída no grupo desnutrido. Isso pode ser decorrente da diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, fundamentais para este processo (BORELLI & NARDINELLI, 2001; FOCK *et al.*, 2007; REDMOND *et al.*, 2005). O grupo hiperlipídico apresentou um aumento na atividade fungicida. Como temos uma maior produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nos hiperlipídicos, isso pode potencializar o processo fungicida.

O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa de nitrogênio fundamental para várias atividades metabólicas, como vasorrelaxamento, citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária, regulação da pressão sanguínea basal, entre outras (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002; DUSSE *et al.*, 2003). Estudos tem demonstrado que a deficiência de proteínas ou de nutrientes específicos levam à redução da produção de óxido nítrico (ANSTEAD *et al.*, 2003; FOCK *et al.*, 2003; REDMOND *et al.*, 2005). Nosso estudo mostrou que os animais desnutridos tiveram diminuição na produção de óxido nítrico. Esse resultado pode ser devido a menor disponibilidade de arginina (Tabela 5), substrato fundamental para a produção do óxido nítrico (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002) ou ainda de alterações no sistema enzimático de iNOS (PETRI *et al.*, 2010). Em animais submetidos à dieta hiperlipídica, encontramos uma maior produção de óxido nítrico, dado ligado à maior

ativação macrofágica decorrente de estímulos como MCP-1 (KANDA *et al.*, 2006; MILNER & BECK, 2012).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma espécie reativa de oxigênio fundamental na lise dos microorganismos fagocitados, oxidando a membrana da célula para formar pontes dissulfeto entre os aminoácidos cisteína de diversas proteínas estruturais da bactéria, levando à morte da mesma (ALMEIDA *et al.*, 2005). Em nosso trabalho, encontramos uma menor produção de peróxido de hidrogênio em culturas de 2 horas de macrófagos peritoniais de animais desnutridos (BORELLI & NARDINELLI, 2001; CRISMA, 2010). Ao estimular os macrófagos em cultura, com PMA (phorbol-miristatoacetato), notamos que os animais do grupo desnutrido foram os únicos a não responder ao estímulo. Esse pode ser um resultado da deficiência de proteínas que gera alterações no sistema enzimático que desencadeia o estresse oxidativo, através do NADPH oxidase (PAIXAO E SILVA *et al.*, 2011; PETRI *et al.*, 2010; REDMOND *et al.*, 2005).

Em relação aos animais hiperlipídicos, encontramos uma maior produção de peróxido de hidrogênio (após 2 horas) em sobrenadante de cultura de macrófagos, o que pode ser explicado pela maior ativação de macrófagos por citocinas pró-inflamatórias, estimulando a atividade fagocítica e conseqüente atividade bactericida ou fungicida, através das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006; MATSUDA & SHIMOMURA, 2013; MILNER & BECK, 2012).

Os dados encontrados ao longo do estudo e realização desse trabalho evidenciaram que os animais desnutridos apresentam comprometimento da resposta imune. Os animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentam aumento da atividade macrofágica com quadro inflamatório semelhante à síndrome metabólica. Esses dados estão de acordo com a literatura.

6. CONCLUSÃO

A desnutrição proteica prejudica a resposta imune inata, diminuindo a quantidade e funcionalidade de macrófagos, que passam a responder de maneira deficiente à ativação e produção de substâncias. No modelo murino com dieta hiperlipídica, não observamos alterações qualitativas e quantitativas na produção de células sanguíneas, verificando aumento do tecido adiposo visceral e a presença de um processo inflamatório desses tecidos, com elevação da atividade macrofágica e repercussões sistêmicas similares à síndrome metabólica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS, K.A., LICHTMAN, A.H., PILLAI, S., Imunidade natural. In: *Imunologia Celular e Molecular*, 7:19-46, 2012.
2. ADEREM, A. & UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, 17:593-623, 1999.
3. AHIMA, R.S. & FLIER, J.S. Leptin. *Annual Review of Physiology*, (62):413-37, 2000.
4. AKIRA S, MISAWA T, SAITOH T. Macrophages control innate inflammation. *Diabetes Obes Metab*. 3:10-8. 2013.
5. AKIRA, S. & TAKEDA, K. Toll like receptor signalling. *Nature reviews immunology*, (4):499-511, 2004.
6. ALMEIDA, A.S., FALEIROS, A.C.G., TEIXEIRA, D.N.S., COTA, U.A., CHICA, J.E.L. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 44(6):429-32, 2008.
7. ALMEIDA, C.A. & RICO, N. Avaliação do estado nutricional com ênfase à antropometria. *Pediatria*, 20(4): 385-98, 1998.
8. ALMEIDA, E.T., MAURO, A.E., SANTANA, A.M., GODOY NETTO, A.V., & CARLOS, I.Z. Emprego de compostos organometálicos mononucleares de paládio na ativação de macrófagos peritoneais de camundongos. *Química Nova*, 28(3):405-8, 2005.
9. ALVES, A.P., DAMASO, A.R., DAL PAI, A.R.V. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats, *Jornal de Pediatria*, 84(3), 2008.
10. ALVEZ, M.N.R. Os efeitos da obesidade na resposta imune. *Rev. Bras. Nutr. Clin*. 21(4):316-9, 2006.
11. AMUNA, P. & ZOTOR, F.B., Epidemiological and nutrition transition in developing countries: impact on human health and development. *Proc Nutr Soc.*, 67(1):82-90, 2008.

12. ANSTEAD, G.M., CHANDRASEKAR, B., ZHANG, Q., MELBY, P.C. Multinutrient undernutrition dysregulates the resident macrophage proinflammatory cytokine network, nuclear factor-kappaB activation, and nitric oxide production. *J Leukoc Biol.*, 74(6):982-91, 2003.
13. ANTUNES, F. & HAN, D. Redox Regulation of NF-kB: from basic to clinical research. *Antioxid. & Redox signaling*, 11(9), 2009.
14. ARAI, K., LEE, F., MIYAJIMA, A., MIYATAKE, S., ARAI, N., YOKOTA, T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annual Review of Biochemistry*, (59):783-836, 1990.
15. ARANCIBIA, S., BELTRAN, C., AGUIRRE, I., SILVA, P., PERALTA, A.L., HERMOSO, M.A. Toll like Receptors are key participants in innate immune responses. *Biol. Res.*, 40:97-112, 2007.
16. BADALOO A.V., FORRESTER T., REID M., JAHLOOR F. Lipid kinetic differences between children with kwashiorkor and those with marasmus. *Am J Clin Nutr.* 2006 Jun;83(6):1283-8.
17. BATISTA FILHO, M. & RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 2003.
18. BATISTA FILHO, M. & RISSIN, A. Desnutrição energético-protéica. In: TADEI, J. A. A. *Nutrição em Saúde Pública*, Rio de Janeiro, Rubio, 2011.
19. BEHAN J.W., EHSANIPOUR E.A., SHENG X., PRAMANIK R., WANG X., HSIEH Y.T., MITTELMAN, S.D. Activation of adipose tissue macrophages in obese mice does not require lymphocytes. *Obesity (Silver Spring)*;21(7):1380-8. 2013.
20. BEUTLER B. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40(12):845-59, 2004.
21. BORELLI, P. & NARDINELLI, L. Protein-calorie malnutrition is decreased in the macrophage's respiratory burst capacity. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 37:51-60, 2001.

22. 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.*, 42(6):523-530, 2009.
23. BORELLI, P., BLATT, S. L., ROGERO, M. M., FOCK, R. A. Haematological alterations in protein malnutrition. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, 26(1):49-56, 2004.
24. 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.
25. BORELLI, P., KHANG, H.C., BOROJEVIC, R., DAGLI, M.L.Z. Protein malnutrition: some aspects of in vitro adhesion of mouse peritoneal macrophages. *Ann. Nutr. Metab.*, Basel, 42:367-73, 1998.
26. BORELLI, P., MARIANO, M., BOROJEVIC, R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. *Nutrition Research*, N.Y. 15(10):1477-85, 1995.
27. BORGES, M.C., VINOLO, M.A., CRISMA, A.R., FOCK, R.A., BORELLI, P., TIRAPEGUI, J., CURI, R., ROGERO, M.M. High-fat diet blunts activation of the nuclear factor- κ B signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages of Wistar rats. *Nutrition*. 29(2):443-9, 2013.
28. BORGES M.C. Efeito da ração hiperlipídica e do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a composição corporal e sobre a resposta inflamatória de macrófagos peritoniais de ratos *Wistar* [dissertação de mestrado]. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2011.
29. BOU GHOSN, E.E, CASSADO, A.A, GOVONI, G.R, FUKUHARA, T, YANG, Y, MONACK, D.M, BORTOLUCI, K.R, ALMEIDA, S.R, HERZENBERG, L.A. Two physically, functionally and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *PNAS*, 6(107):2568-73, 2010.

30. BOWIE A. & O'NEILL L.A.J. Oxidative Stress and Nuclear Factor- κ B Activation. *Biochemical Pharmacology*, 59:13-23, 2000.
31. BRECHER, G. New methylene blue as a reticulocyte stain. *Am J Patol.*, 19, 1949.
32. BREMER, A.A. & JIALAL, I. Adipose tissue dysfunction in nascent metabolic syndrome. *J Obes.*, 2013:393192, 2013.
33. BRUNDTLAND, G.H. Nutrition and infection: malnutrition and mortality in public health. *Nutr. Ver.*, 58:51-54, 2000.
34. CARLSEN, H., HAUGEN, F., ZADELAAR, S., KLEEMANM, R., KOOISTRA, T., DREYFUS, C.A., BLOMHOFF, R. Diet-induced obesity increases NF- κ B signaling in reporter mice. *Genes Nutr.* 4(3): 215–22, 2009.
35. CARMO, L.S., ROGERO, M.M., CORTEZ, M., YAMADA, M., JACOB, P.S., BASTOS, D.H.M., BORELLI, P., FOCK, R. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 83:1-10, 2013.
36. CARMO, L.S. Proliferação e diferenciação *in vitro* de células mononucleares medulares após estímulo com fatores de crescimento em ratos *Wistar* submetidos à dieta hiperlipídica. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
37. CARRILLO-ESPER R. Inmunidad innata, receptores toll y sepsis. *Cir. Ciruj.*, 71:252-8, 2003.
38. CATHCART, M. Regulation of Superoxide Anion Production by NADPH Oxidase in Monocytes/Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 24:23-28, 2004.
39. CERQUEIRA, N.F & YOSHIDA, W.B. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cir. Bras.*, 17(6):417-423, 2002.
40. CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66(2): 460-3, 1997.
41. CHANDRA, R.K. *Heath Clarke Lecture. Immune responses in undernutrition and overnutrition. Basic considerations and applied significance. Nutrition*, 5: 297-302, 1989.

42. CHANDRA, R.K. Protein-energy malnutrition and immunological responses. *J nutr.*, Bethesda. 122: 597–600, 1992.
43. COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420(19/26):885-9, 2002.
44. CORAZZINI, R. *Avaliação morfo-fisiológica de macrófagos peritoneais de camundongos submetidos ao choque térmico*. [Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo]. São Paulo, 156, 1993.
45. CORTEZ, M., CARMO, L.S., ROGERO, M.M., BORELLI, P., FOCK, R.A. A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF- α production by increasing NF- κ B and attenuating PPAR- γ expression in bone marrow mesenchymal stem cells. *Inflammation*. 36(2):379-86, 2013.
46. COUTINHO, J.G., GENTIL, P.C., TORAL N. A desnutrição e obesidade no Brasil: o enfrentamento com base na agenda única da nutrição. *Casa de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 24(2):332-40. 2008.
47. CRISMA, A.R. Avaliação da hemopoese e da resposta imune inata mediada por macrófagos em camundongos submetidos à recuperação nutricional após desnutrição protéica. 2010. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
48. CRUZ-MACHADO, S.S. Lipopolissacarídeo (LPS): Ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NF- κ B. *Revista da Biologia*, v.4, 2010.
49. CUPPARI, L., Coord. *Nutrição: nas doenças crônica não-transmissíveis*. Barueri: Manole. p. 512, 2009.
50. CUTLER, R.L., METCLF, D., NICOLA, N.A., JOHNSON, G.R. Purification of a multipotential colony-stimulating factor from pokeweed mitogen-stimulated mouse splenn cell. *Journal of Biological Chemistry*, 260(11):6579-87, 1985.
51. DU, F., HIGGINBOTHAN, A., WHITE, B.D. Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J. Nutr.*, 30:514–52, 2000.

52. DUARTE, A.C.G.O., FONSECA, D.F., MANZONI, M.S.J., SOAVE, C.F., SENE-FIORESE, M., DÂMASO, A.R., CHEIK, N.C. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. *Revista de Nutrição*, 19(3):341-48, 2006.
53. DUVILLARD, S.P.V. Lipids and lipoproteins in diet and exercise: introduction. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 29(11):1414-15, 1997.
54. EL-BENNA J., DANG P.M., GOUGEROT-POCIDALO M.A., ELBIM C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 53(3):199-206, 2005.
55. ESTADELLA, D., OYAMA, L.M., DÂMASO, A.R., RIBEIRO, E.B., OLLER DO NASCIMENTO, C.M. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*, 20(2):218-24, 2004.
56. FAO (Food and Agriculture Organization). La seguridad alimentaria en crisis prolongadas. *El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo*, 2009.
57. FAO (Food and Agriculture Organization). La subnutricion en el mundo en 2010. *El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo*. Roma, 2010.
58. FAO, 2013. THE STATE OF FOOD AND AGRICULTURE 2013
59. FERNANDES, A.C. & BEZERRA, O.M.P.A. Terapia nutricional na doença pulmonar obstrutiva crônica e suas complicações nutricionais. *J. bras. pneumol.*, 32(5):461-71, 2006.
60. FERNANDEZ, M.L., DURAN, H.A., O'CONNOR, S.E., CABRINI, R.L., MOLINARI, B.L. Role of distinct subpopulations of peritoneal macrophages in the regulation of reactive oxygen species release. *Free Radic Biol & Medic.* 27(7/8):797-809, 1999.
61. FLIER, J.S. Lowered leptin slims immune response. *Nature Med.*, 4:1124-5, 1998.
62. FISHER, A.B. Redox Signaling Across Cell Membranes. *Antioxid. & Redox sinaling.* 11(6):1349-1356, 2009.

63. FLANNAGAN, R.S., HARRISON, R.E., YIP, C.M., JAQAMAN, K., GRINSTEIN, S. Dynamic macrophage “probing” is required for the efficient capture of phagocytic targets. *J. Cell Biol.* 191(6):1205-18, 2010.
64. FLOHÉ, L., BRIGERIUS-FLOHÉ, R., SALIOU, C., TRABER, M. G., PACKER, L. Redox Regulation of NK-Kappa B Activation. *Free Radical Biology e Medicine.* 22(6):1115-1126, 1997.
65. FOCK R. A. Avaliação de aspectos da resposta inflamatória desencadeada pelo lipopolissacarídeo (LPS) em desnutrição protéica experimental. Quantificação do receptor de LPS (CD14/TLR4) e do fator de transcrição NF-kB, São Paulo, 2005.
66. FOCK R.A., BLATT S.L., BEUTLER, B., PEREIRA, J., TSUJITA, M., BARROS, F.E.V., BORELLI, P. Study of lymphocyte subpopulations in bone marrow in a model of protein-energy malnutrition. *Nutrition*, 26(10):1021-8, 2010.
67. FOCK R.A., SILVA, O.P.P.S., BORELLI, P. Desnutrição protéica modifica a síntese de óxido nítrico em macrófagos, *Rev. Bras. Ciên. Farm.*, 39(3):115, 2003.
68. 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.
69. FONSECA-ALANIZ, M.H., TAKADA, J., ALONSO-VALE, M.I.C., LIMA, F.B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 50(2):216-29, 2006.
70. FORMAN, H.J. & TORRES, M. Signaling by the Respiratory Burst in Macrophages. *Life*, 51: 365-71, 2001.
71. FUJIHARA, M., MUROI, M., TANAMOTO, K., SUZUKI, T., AZUMA, H., IKEDA, H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacology & Therapeutics.* 100(2):171-94, 2003.

72. GHANIN, H., ALJADA, A., HOFMEYER, D., SYED, T., MOHANTY, P., DANDONA, P. Circulating Mononuclear Cells in the Obese are in a proinflammatory state. *Circulation*, 110:1564-71, 2004.
73. GORDON, S. The macrophage: Past, present and future. *Eur. J. Immunol.* 37:9-17, 2007.
74. GREENBERG, S. & GRINSTEIN, S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol.*, 14(1):136-45, 2002.
75. GRIESS, P. *Ber Deutsch Chem Ges*; 12:426-8, 1879.
76. GUHA, M. & MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signaling*, 13:85-94, 2001.
77. GUIMARÃES, D.E.D., SARDINHA, F.L.C., MIZURINI, D.M., CARMO, M.G.T. Adipocinas: uma nova visão do tecido adiposo. *Rev. Nutrição*, 20(5):549-59, 2007.
78. GUSTAFSON B. Adipose Tissue, Inflammation and Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.*17(4):332-41, 2010.
79. GUZIK, T.J., KORBUT, R., ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Phys. Pharm*, 54(4):469-87, 2003.
80. GWINN, M.R. & VALLYATHAN, V. Respiratory Burst: Role in Signal Transduction in Alveolar Macrophages, *J. Toxic. Envir. Health, Part B*, 9(1):27-39, 2006.
81. HALAAS, JL, GAJIWALA, KS, MAFFEI, M, COHEN, SL, CHAIT, BT, RABINOWITZ, D. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269(5223):543-6, 1995.
82. HARIRI, N. & THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr. Research Reviews*, 23:270-99, 2010.
83. HARLOW M.B. & LANE D. *Antibody*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988.

84. HAYLOCK, D.N., MAKINO, S., DOWSE, T.L., TRIMBOLI, S., NIUTTA, S., TO, L.B., JUTTNER, C.A., SIMMONS, P.J. *Ex vivo* hematopoietic progenitor cell expansion. *Immunology Methods*, 5(3):217-25, 1994.
85. HEDLEY, A.A., OGDEN, C.L., JOHNSON, C.L., CARROLL, M.D., CURTIN, L.R., FLEGAL, K.M. Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents and adults, 1999-2002. *JAMA*, 291:2847-50, 2004.
86. HERSCOWITZ, H.B., HOLDEN, H.T., BELANTL, J.A., GHAFFAR, A. *Manual of macrophage methodology*. M. Dekker, 531, 1981.
87. HUANG, Z.L. & FRAKER, P.J. Chronic consumption of a moderately low protein diet does not alter hematopoietic processes in young adult mice. *J Nutr*, 133(5):1403-8, 2003.
88. ILES K.E. & FORMAN, H.J. Macrophage Signaling and Respiratory Burst. *Immunologic Research*, 26(1-3):95-105, 2002.
89. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Coordenação de Índices de Preços. Pesquisa de orçamentos familiares 2002/2003: aquisição alimentar domiciliar *per capita*, Brasil e grandes regiões. Rio de Janeiro, 2004.
90. JACOB, P.S., FUJII, T.M., YAMADA, M., BORGES, M.C., PANTALEÃO, L.C. BORELLI, P., FOCK, R., ROGERO, M.M. Isocaloric intake of a high-fat diet promotes insulin resistance and inflammation in Wistar rats. *Cell Biochem Funct.*, 31(3):244-53, 2013.
91. JAMES, W.P.T., FERRO-LUZZI, A., ISAKSSON, B., SZOSTAK, W.B., GUALDA-VARGAS, P. Healthy nutrition: preventing nutrition-related diseases in Europe. *Copenhagen: World Health Organization*, 1988.
92. JELLEMA, A., PLAT, J., MENSINK, R.P. Weight reduction, but not a moderation intake of fish oil, lower concentrations of inflammatory markers and PAI-1 antigen in obese men during the fasting and postprandial state. *Eur. J. Clin. Invest.* 34:766-73, 2004.

93. KANDA, H., TATEYA, S., TAMORI, Y., KOTANI, K., HIASA, K., KITAZAWA, R., KITAZAWA, S., MIYACHI, H., MAEDA, S., EGASHIRA, K., KASUGA, M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 116(6):1494-505, 2006.
94. KAUL, N. & FORMAN, H.J. Activation of NF- κ B by the respiratory burst in macrophages. *Free Radical Biology & Medicine*, 21(3):401-405, 1996.
95. KAWAI, T. & AKIRA, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*, 17(4):338-44, 2005.
96. KAWAI, T. & AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunol.*, 11(5):373-84, 2010.
97. KEUSCH, G.T., DOUGLAS, S.D., BRADEN, K., GELLER, S.A. Antibacterial Functions of Macrophages in Experimental Protein-Calorie Malnutrition. I. Description of the Model, Morphologic Observations, and Macrophage Surface IgG Receptors. *J. Infec. Diseases*, 138(2):125-133, 1978.
98. LAHARRAGUE, P., OPPERT, J.M., BROUSSET, P., CHARLET, J.P., CAMPFIELD, A., FONTANILLES, A.M., GUY-BRAND, B., CORBERAND, J.X., PENICAUD, L., CASTEILLA, L. High concentration of leptin stimulates myeloid differentiation from human bone marrow CD34+ progenitors: potential involvement in leukocytosis of obese subjects. *International Journal of Obesity*, (24):1212-6, 2000.
99. LEE, MT & WARREN, MK. CSF-1 induced resistance to viral infection in murine macrophages. *J Immunol*, 138(9): 3019-22, 1987.
100. LEUSEN, J.H., FLUITER, K., HILARIUS, P.M., ROOS, D., VERHOEVEN, A.J., BOLSCHER, B.G. Interactions between the cytosolic components p47phox and p67phox of the human neutrophil NADPH oxidase that are not required for activation in the cell-free system. *J Biol Chem*, 270(19):1216-21, 1995.
101. LIMA, F.S.; ROGERO, M.M.; RAMOS, M.C.; BORELLI, P.; FOCK, R.A. Modulation of the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signalling pathway by glutamine in peritoneal

- macrophages of a murine model of protein malnutrition. *European Journal of Nutrition*, 52(4):1343–1351, 2013.
102. LIMA, A.L., SILVA A.C F., KONNO, S.C., CONDE, W.L., BENICIO, M.H.D., MONTEIRO, C.A. Causas do declínio acelerado da desnutrição infantil no Nordeste do Brasil (1986-1996-2006). *Rev. Saúde Pública*, 44(1):17-27, 2010 .
103. LOFFREDA, S., YANG, S.Q., LIN, H.Z., KARP, C.L., BRENGAMAN, M.L., WANG, D.J., KLEIN, A.S., BULKLEY, G.B., BAO, C., NOBLE, P.W., LANE, M.D., DIEHL, A.M. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB Journal*, (12):57–65, 1998.
104. MARCOS, A., NOVA, E, MONTEIRO, C.A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(1):66–9, 2003.
105. MATSUDA, M. & SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis and câncer. *Obesity Research & Clinical Practice*, 7(5):330-41, 2013.
106. MAY, R.C. & MACHESKY, L.M. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.*, 114(6):1061-77, 2001.
107. MENDONÇA C.P & ANJOS L.A. Aspectos das práticas alimentares e da atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, 20:3, 2004.
108. MILNER, J.J. & BECK, M.A. The impact of obesity on the immune response to infection. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71:298-306, 2012.
109. MIYAKE, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD2. *Intern Immunopharmacol.* 3:119-28, 2003.
110. MONDINI, L. & MONTEIRO, C.A. Mudanças no padrão de alimentação da população urbana brasileira (1962-1988). *Revista de Saúde Pública*, 28:433-9, 1994.

111. MONDINI, L. & MONTEIRO, C.A. The Stage of Nutrition Transition in Different Brazilian Regions. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 47(2):17-21, 1997.
112. MONTEIRO, C.A. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. *Estud. avançados*, São Paulo, 17(48):7-20, 2003.
113. MONTEIRO, C.A. Causes for the decline in child under-nutrition in Brazil, 1996-2007. *Rev. Saúde Pública*. 43(1):35-43, 2009.
114. MONTEIRO, C.A., LEVY, R.B., CLARO, R.M., DE CASTRO, I.R.R., CANNON, G. Increasing consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health: evidence from Brazil. *Public Health Nutrition*, 14(1):5-13, 2011.
115. MONTEIRO, C.A., MONDINI, L.; MEDEIROS DE SOUZA, A.L.; POPKIN, B.M. The nutrition transition in Brazil. *European Journal of Clinical Nutrition*, (49):105-13, 1995.
116. NAKAJIMA, K. Avaliação do ciclo celular de células tronco/progenitoras da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica. 2010. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
117. ODEGAARD, J.I & CHAWLA, A. Alternative Macrophage Activation and Metabolism. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 6:275–97, 2011.
118. OGAWA, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, (84):2844-53, 1993.
119. OGDEN, C.L., CARROLL, M.D., CURTIN, L.R., MCDOWELL, M.A., TABAK, C.J., FLEGAL, K.M. Prevalence of Overweight and Obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA*, 295(13):1549-55, 2006.
120. OLEFSKY J.M. & GLASS C.K. Macrophages, Inflammation and Insulin Resistance. *Annu. Rev. Physiol.*, 72:219-46. 2009.
121. OLIVEIRA, D.C. Avaliação da via sinalizadora do fator de transcrição NF-kB ativada pelo TNF α em um modelo de carência proteica. 2013. 79 f. Dissertação

- (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
122. OLIVEIRA, C.A.M., LATORRACA, M.Q., MELLO, M.A.R., CARNERIO, E.M. Mechanisms of insulin secretion in malnutrition: modulation by amino acids in rodent models. *Amino Acids*, 40(4):1027-34, 2011.
123. OLIVEIRA-MARQUES, V., MARINHO, H. S., CYRNE, L., ANTUNES, F. Role of Hydrogen Peroxide in NF- κ B Activation: From Inducer to Modulator. *Antioxid. & Redox signaling*, 11(9):2223-43, 2009.
124. ORR J.S., PUGLISI M.J., ELLACOTT K.L., LUMENG C.N., WASSERMAN D.H., HASTY A.H. Toll-like receptor 4 deficiency promotes the alternative activation of adipose tissue macrophages. *Diabetes*. 61(11):2718-27. 2012.
125. OZCAN, U., YILMAZ, E., OZCAN, L. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*, (313):1137-40, 2006.
126. PAIXAO E SILVA, O; FOCK, R.A; ROGERO, M.M; BORELLI, P. Peróxido de hidrogênio e enzimas antioxidantes em desnutrição protéico-energética. *Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.*, 36(3):1-14, 2011.
127. PANG, J.; CHOI, Y.; PARK, T. Ilex paraguariensis extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (476):178-185, 2008.
128. PAPADIMITRIOU, J.M. & Van BRUGGEN, I. The effects of malnutrition on peritoneal macrophages, *Exp Mol Pathol*, 49(2): 161-70, 1988.
129. PATEL P.S, BURAS E.D., BALASUBRAMANYAM A. "The Role of the Immune System in Obesity and Insulin Resistance," *Journal of Obesity*, 9, 2013.
130. PERES, C.M. & CURI, R. Obtenção de adipócitos. In: *Como cultivar células*. 1:83-88, 2005.

131. PETRI, A., WEITNAUER, C., GORLACH, A. Receptor Activation of NADPH Oxidases. *Antioxid. & Redox signaling*. 13(4):467-487, 2010.
132. PICK, E. & KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Meth.*, (38):161-70, 1980.
133. PICK, E. & MIZEL, D. Rapid microassays for measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Meth.*, (46):211-26, 1981.
134. POPKIN, B.M, ADAIR, L.S, NG, S.W. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutrition Reviews*, 70(1):3-21, 2012
135. POPKIN, B.M. The nutrition transition and obesity in the developing world. *Journal of Nutrition*, (22):355-75, 2001.
136. PRADO, W.L., LOFRANO, M.C., OYAMA, L.M., & DÂMASO, A.R. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 15(5), 378-83, 2009.
137. QUESENBERRY, P.J. Hemopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In: BEUTLER, E.; LICHTMSN, M.A.; COLLER, B.S.; KIPPS, T.J. *Williams hematology*, 5(22):211-228, 1995.
138. QUINN, M.T. & SCHEPETKIN, I.A. Role of NADPH Oxidase in formation and function of multinucleated Giant Cells. *J Innate Immun*; (1):509–526, 2009.
139. QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*, 21:775-7, 2005.
140. RABINOVITCH, M. & DESTEFANO, M.J. Macrophage spreading in vitro. Magnese and other metals as inducers or as co-factors for induced spreading. *Exper Cell Res*; 79:423-30, 1973.
141. RAETZ, C.R. & WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 71:635-700, 2002.

142. RAMALHO, R. & GUIMARAES, C. Papel do tecido adiposo e dos macrófagos no estado de inflamação crônica associada a obesidade. *Acta Med. Port.*, 21:489-96, 2008.
143. RANE, S.G. & REDDY, E.P.; JAKs/STAT/Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene*, (21):3295-358, 2002.
144. REDMOND H.P., GALLAGHER H.J., SHOU J., DALY J.M. Antigen presentation in protein-energy malnutrition, *Cell Immunol.* 163(1):80-7, 1995.
145. REDMOND H.P., LEON P., LIEBERMAN M.D., HOFMANN K., SHOU J., REYNOLDS J.V., GOLDFINE J., JOHNSTON R.B.JR, DALY J.M. Impaired macrophage function in severe protein-energy malnutrition. *Arch Surg.*, 126(2):192-6, 1991.
146. REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing. *J. Nutr.*, (1):1939-51, 1993.
147. RICCARDI, G., GIACCO, R., RIVELLESE, A.A. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr.*, 23(4):447-56, 2004.
148. ROMEO, G.R., LEE, J., SHOELSON, S.E. Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation--mechanisms and therapeutic targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32(8):1771-6, 2013.
149. ROBERTS, C.K., & BARNARD, R.J. Effects of exercise and diet on chronic disease. *J Appl Physiol.*, 98:3-30, 2005.
150. ROBERTSON, D.S. The biochemical basis of obesity. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 3:83-90, 2013.
151. ROGERS, P. & WEBB, G.P. Estimation of body fat in normal and obese mice. *Br. J. Nutr.* (43):83-86, 1980.

152. ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. *Mem. Inst. Butantã*, (20):315-28, 1947.
153. RUSSO, M., TEIXEIRA, H.C., MARCONDES, M.C. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 22:1271-73, 1989.
154. SAAMAN, M. C. *Diabetology & Meabolic Syndrome*, 3:23, 2011.
155. SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. In: *Molecular cloning*. New York: Cold Spring Harbor, (2):174-84, 1989.
156. SANTOS, E.W.C.O., OLIVEIRA, D.C., HASTREITER, A., BELTRAN, J.S., SILVA, G. FOCK, R.A., BORELLI, P. Effects of low protein or high fat diets in hematological and immunological parameters in murine model. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 49(1):10, 2013.
157. SANTOS, W.B., MESQUITA, E.T., VIEIRA, R.M.R., OLEJ, B., COUTINHO, M. AVEZUM, A. Proteína C reativa e doença cardiovascular. As bases da evidência científica. *Arq. Bras. Cardiol.*, 80(4):452-6, 2003.
158. SANTOS-ALVAREZ, J., GOBERNA, R., SANCHEZ-MARGALET, V. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cellular Immunology*, (194):6-11, 1999.
159. SARTIPY, P. & LOSKUTOFF D.J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*.100:7265-70, 2003.
160. SAWDEY, M.S. & LOSKUTOFF, D.J. Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression *in vivo*: tissue specificity and induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta. *Journal of Clinical Investigation*, (88):1346-53, 1991.
161. SCHAFFLER, A., SCHOLMERICH, J., SALZBERGER, B. Adipose tissue as an immunological organ: toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. *Trends in Immunology*, (28):393-9, 2007.

162. SEN, R. & BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46(5):705-16, 1986.
163. SHI, Z., CAI, Z., SANCHEZ, A., ZHANG, T. A Novel Toll-like Receptor That Recognizes Vesicular Stomatitis Virus. *J. Biol. Chem.*, 286:4517-24, 2011.
164. SHIBATA, N. & GLASS C.K. Regulation of macrophage function in inflammation. *J. Lipid Res.*, 50:277-81, 2009.
165. SILVA, M.P.N. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. *Rev. Bras. Cancerol.*, 52(1):59-77, 2006.
166. SILVEIRA, M.R., FROLLINI, A.B., VERLENGIA, R., CAVAGLIERI, C.R. Correlação entre obesidade, adipocinas e sistema imunológico. *Rev. Bras. Cineant. Desemp. Hum.* 11(4):466-72, 2009.
167. SMITH, C.M.D. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control*, 10(1):9-16, 2003.
168. SOUZA, I. P., KANG, H. C., NARDINELLI, L., BORELLI, P. Desnutrição protéica: efeito sobre o espriamento, fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoniais. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 37(2):143-51, 2001.
169. STAPLETON, P.P., FUJITA, J., MURPHY, E.M., NAAMA, H.A., DALY, J.M. The influence of restricted calorie intake on peritoneal macrophage function. *Nutrition*. 17(1):41-5, 2001.
170. STEIN, C.J. & COLDITZ, G.A. The Epidemic of Obesity. *J Clin Endoc & Metab*, 89(6):2522-5, 2004.
171. STEIN, K., VAZQUEZ-GARIBAY, E., KRATSCH, J., ROMERO-VELARDE, E., JAHREIS, G. Influence of nutritional recovery on the leptin axis in severely malnourished children. *Endocrinol Metab.*, 91:1021-6, 2006.
172. STINNET, JD. *Nutrition and the immune response*. CRC Press. 150, 1983.

173. STRAUSS-AYALI, D., CONRAD, S.M., MOSSER, D.M. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukocyte Biology*, 82(2):244-52, 2007.
174. TACKE, F. & RANDOLPH, G.J. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*, 211:609-18, 2006.
175. TAKEDA, K., KAISHO, T., AKIRA, S. Toll like receptors. *Annual Rev. Immunol.*, (21):335-76, 2003.
176. TARDIDO, A.P. & FALCÃO, M.C. O impacto da modernização na transição nutricional e obesidade. *Rev. Bras. Nutr. Clin.*, 21(2):117-24. 2006.
177. TESHIMA, S., ROKUTAN, K., TAKAHASHI, M., NIKAWA, T., KIDO, Y., KISHI, K. Alteration of the respiratory burst and phagocytosis of macrophages under protein malnutrition. *J Nutr Sci Vitaminol.*, 41(1):127-37, 1995.
178. TILG, H. & MOSCHEN, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature*, 6(10):772-83, 2006.
179. TRIANA, B.E.G., BERNABEU, A.S., PINEIRO, J.C.G., MILIAN, M.B. NADPH oxidasa: Componentes, ensablage y mecanismo de accion. *Rev. Cub. Inv. Biomed*, 20(1):59-63, 2001.
180. TSUNAWAKI, S., KAGARA, S., YOSHIKAWA, K., YOSHIDA, L. S., KURATSUJI, T., NAMIKI, H. Involvement of p40phox in activation of phagocyte NADPH oxidase through association of its carboxyl-terminal, not amino-terminal, with p67phox. *J Exp Med*. Sep 1;184(3):893-902, 1996.
181. VERMA, U.N., YAMAMOTO, Y., PRAJAPATI, S., GAYNOR, R. B. Nuclear Role of I κ B Kinase-k/NF-kB Essential Modulator (IKK γ /NEMO) in NF-kB-dependent Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 279(5): 3509–3515, 2004.
182. VOLP, A.C.P., ALFENAS, R.C.G., COSTA, N.M.B., MINIM, V.P.R., STRINGUETA, P.C., BRESSAN, J. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em predizer a síndrome metabólica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 52(3), 537-549, 2008.

183. VITURI, C.L., BORELLI, P., ALVAREZ-SILVA, M., TRETIN, A.Z. Alteration of the bone marrow in extracellular matrix in mice undernourished. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, (33):889-95, 2001.
184. WAITZBERG, D.L., PLOPPER, C., TERRA, R.M. Postoperative total parenteral nutrition. *World J Sur*, 23: 560-4, 1999.
185. WATERLOW, J.C., ALLEYNE, G.A.O. Protein malnutrition in children: advances in knowledge in the last ten years. *Adv Protein Che*, 25: 117, 1971.
186. WEBSTER, A.J.F. Energy partitioning, tissue growth and appetite control. *Proc Nutr Soc.*, 52: 69-76, 1993.
187. WHITE, B.D., PORTER, M.H., MARTIN, R.J. Protein selection, food intake, and body composition in response to the amount of dietary protein. *Physiol Behav.*, 69: 383-9, 2000.
188. WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Diet, nutrition and the prevention of chronic disease. Geneva: *World Health Nutrition*, 2003.
189. WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Disponível no site: http://apps.who.int/whosis/database/core/core_select_process.cfm?countries=bra&indicators=StuntedChild&indicators=UnderweightChild&indicators=OverweightChild. 2010.
190. WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Nutrition for Health and Development: A global agenda for combating malnutrition, World Health Organization, France, 2000.
191. WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). The world health report: 2002 reducing risks, promoting healthy life. Geneva: *World Health Organization*, 248, 2002.
192. WOLF, A.M., WOLF, D., RUMPOLD, H., ENRICH, B., TILG, H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323:630-5, 2004.

193. WU D., REN Z., PAE M., HAN S.N., MEYDANI S.N. Diet-induced obesity has a differential effect on adipose tissue and macrophage inflammatory responses of young and old mice. *Biofactors*. 39(3):326-33. 2013.
194. XAVIER, J.G., FAVERO, M.A., VINOLO, M.A., ROGERO, M.M., DAGLI, M.L., ARANA-CHAVEZ, V.E., BOROJEVIC, R., BORELLI, P. Protein-energy malnutrition alters histological and ultra-structural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. *Histol Histopathol.*, 22(6): 651-60, 2007.
195. YOUSSEF, D.M., ELBEHIDY, R.M., SHOKRY, D.M., ELBEHIDY, E.M. The influence of leptin on Th1/Th2 balance in obese children with asthma. *J. Bras. Pneumol.*, 39(3):562-8, 2013.
196. ZEYDA, M. & STULNIG, T.M. Adipose tissue macrophages. *Immunology Letters*, 112(2):61-7, 2007.
197. ZHANG J., JOHNSTON G., STEBLER B., KELLER E.T. Hydrogen Peroxide Activates NF-kB and the Interleukin-6 Promoter Through NF-kB-Inducing Kinase. *Antioxidants & Redox Sinaling*, 3(3):493-504, 2001.
198. ZIEGLER, E.E. & FILER, L.J. *Present knowledge in nutrition*. 7ed. Washington DC; Ilse Press, 1996.

8. ANEXO (Certificado do Comitê de Ética)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO


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

Ofício CEUA/FCF/69/2012

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "Avaliação comparativa da função celular de macrófagos peritoniais de camundongos 'Swiss' submetidos à dieta hipoprotéica e dieta hiperlipídica" (Protocolo CEUA/FCF/366), de responsabilidade do pesquisador **Ed Wilson Cavalcante Oliveira Santos**, sob a orientação da Profa. Dra. Primavera Borelli, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 06 de agosto de 2012.

São Paulo, 06 de agosto de 2012.


Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP