Universidade de São Paulo
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Avaliação da via sinalizadora do fator de transcrição NF κ B ativada pelo
TNF- α em um modelo de carência protéica.

Dalila Cunha de Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo

2013

Universidade de São Paulo
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Avaliação da via sinalizadora do fator de transcrição NF κ B ativada pelo
TNF- α em um modelo de carência protéica.

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

Dalila Cunha de Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo

2013

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

O48a	<p>Oliveira, Dalila Cunha de</p> <p>Avaliação da via sinalizadora do fator de transcrição NFkB ativada pelo TNF-α em um modelo de carência protéica / Dalila Cunha de Oliveira. -- São Paulo, 2013. 62p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: Fock, Ricardo Ambrósio</p> <p>1. Hematologia 2. Macrófago : Imunologia : Medicina 3. Proteína : Desnutrição : Medicina I. T. II. Fock, Ricardo Ambrósio, orientador.</p> <p style="text-align: right;">616.15 CDD</p>
------	---

Dalila Cunha de Oliveira

Avaliação da via sinalizadora do fator de transcrição NF κ B ativada pelo
TNF- α em um modelo de carência protéica.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock
orientador/presidente

1° examinador

2° examinador

São Paulo, Outubro de 2013.

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que me apoiaram durante a realização dessa jornada.

Em especial à minha família que me apoiou incondicional e incansavelmente na realização desse sonho, e porque nunca duvidaram da minha capacidade, e entenderam a minha vontade de ser pesquisadora.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, é por meio dele que tudo se torna possível.

À minha família pelo apoio e incentivo na minha busca pelo conhecimento. A minha querida mãe, Ana Cunha de Oliveira, que foi que me ensinou que para realizar sonhos é preciso ter fé, à Débora Cunha de Oliveira e Antônio Rodrigues por toda ajuda. Ao Enzo Ozawa que chegou ao final, no entanto fez muita diferença, e com quem estou aprendendo muito.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock, pela oportunidade e por todos os ensinamentos pessoais e profissionais durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Hematologia, Jackeline de Oliveira Beltran, Ed Wilson Santos, Graziela Batista, Alexandra Siqueira de Mello, por todos os momentos de aprendizado e convivência e por tornarem os meus dias melhores durante essa jornada.

À Professora Primavera Borelli pelo exemplo de dedicação profissional.

À Amanda Rabello Crisma, por todas as contribuições, ensinamentos, conversas e por sempre oferecer palavras de apoio.

À todas as moradoras do apartamento 500, em especial a Gabriela Hizume por dividir as alegrias e os momentos difíceis.

Aos técnicos, Mariana Ferreira Cristina e Edson Makyama pelo apoio no desenvolvimento da parte experimental do trabalho.

Ao Professor Julio Tirapegui e a técnica Ivanir Pires do laboratório de Bioquímica da Nutrição pela colaboração.

À secretária da Pós Graduação Ana Dantas.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de mestrado.

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

O SENHOR é o meu pastor, nada me faltará.

Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranquilas.
Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome.
Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum,
porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.
Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges a minha
cabeça com óleo, o meu cálice transborda.
Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha
vida; e habitarei na casa do Senhor por longos dias.

Salmos 23:1-6

Resumo

Oliveira, D.C. Avaliação da via sinalizadora do fator de transcrição NF κ B 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.

A desnutrição é uma condição nutricional que ainda constitui um grande problema de saúde pública e acomete grande parte da população mundial. Atualmente, sabe-se que vários aspectos da resposta imunológica podem estar alterados na decorrência da desnutrição, dentre eles alterações funcionais como redução da migração celular, fagocitose, atividade bactericida, bem como alterações na produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, além de comprometimento da expressão de importantes receptores de reconhecimento de patógenos e alteração na produção de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o TNF- α . O TNF- α é uma citocina, produzida principalmente por macrófagos, que participa de uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo os processos de inflamação, crescimento, diferenciação e apoptose, essa citocina exerce seus efeitos através da ligação a dois receptores distintos, TNFR-I e TNFR-II. A ativação via receptor TNFR-I, no entanto, é responsável pela maioria dos efeitos do TNF- α , e desencadeia uma série de eventos intracelulares que resultam, principalmente, na ativação do fator de transcrição NF κ B. Considerando a relevância dessa via de sinalização mediada por TNF- α , avaliamos em um modelo de desnutrição protéica a via de sinalização de ativação do fator de transcrição NF κ B mediada pelo TNF- α via TNFR-I. Sendo assim, utilizamos camundongos Balb/c, machos adultos, submetidos à desnutrição protéica, após perda de aproximadamente 20% do peso corpóreo, foram coletadas macrófagos peritoneais e cultivados ou não com TNF- α , o sobrenadante foi utilizado para avaliação da produção de citocinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-10) e as células utilizadas para avaliação da expressão do TNFR-I, bem como a expressão de proteínas da via de sinalização (TRADD, TRAF, RIP, IKK, IKB α , p IKB α , NF κ B e p NF κ B). Os resultados obtidos mostraram que os animais desnutridos apresentaram anemia, leucopenia, diminuição da celularidade medular e da cavidade peritoneal. Os resultados demonstraram redução da expressão de TNFR-I, além de diminuição da expressão das porções fosforiladas de IKB α e NF κ B, associado a uma diminuição na produção de IL-1 β e IL-12. Nesse trabalho compreendemos aspectos relacionados a resposta imune inata e nossos dados permitem inferir que o estado nutricional interfere no estado de ativação de macrófagos e na capacidade de resposta dessas células.

Palavras-chave: Desnutrição, Desnutrição proteica, Imunidade Inata, Macrófagos, Citocinas, TNF- α , TNFR, NF κ B

Abstract

Oliveira, D.C. Evaluation of the transcription factor NF κ B signaling pathway activated by TNF- α in a protein malnutrition model. 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Malnutrition is a nutritional condition that consists in a major public health issue and affects a considerable part of the global population. Currently, It is known that many aspects of the immunological response can be altered due to the malnutrition impairment, among them functional changes, for instance, cell migration reduction, phagocytosis, bactericidal response, as well as changes in the reactive oxygen and nitrogen species production, besides, substantially cell receptors expression impaired, responsible for the recognition of pathogens and changes in the production of proinflammatory cytokines, such as TNF- α . This cytokine is primarily produced by macrophages, and it is associated to a wide range of biological activities, including the inflammation processes, growing, differentiation, and apoptosis. The TNF- α act through the linkage to distinct receptors, TNFR-I and TNFR-II. The TNFR-I receptor activation, however, is responsible for most TNF- α effects, and triggers a series of intracellular events that mainly result in the activation of the NF κ B transcription factor. Regarding the relevance of this signaling pathway mediated by the TNF- α , we evaluated through a protein malnutrition model the signaling pathway for the NF κ B transcription factor mediated by the TNF- α through TNFR-I. Adult male Balb/c mice, were submitted to a protein malnutrition and after a loss of nearly 20% body weight, peritoneal macrophages were collected and cultivated, or not with TNF- α . The supernatant was collected for cytokine production evaluation (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, and IL-10) and the cell for TNFR-I expression evaluation, as well as the proteins of the signaling pathway (TRADD, TRAF, RIP, IKK, IKB α , p IKB α , NF κ B, and p NF κ B). The compiled results highlights that the malnourished animals present signs of anemia, leukopenia, and decrease of bone marrow cellularity and peritoneal cavity. The results presented reduction of the TNFR-I expression, in addition to the phosphorylated portions of the IKB α and the NF κ B expression, associated to a decrease in the production of IL-1 β and IL-12. In this essay we perceive the aspects related to the innate immune response, and the outcome data allowed us to conclude that the nutritional status interferes on the macrophages activation and the response capabilities of these cells.

Keywords: malnutrition, protein malnutrition, innate immunity, macrophages, cytokines, TNF- α , TNFR, NF κ B.

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1: Activator Protein 1, Proteína Ativadora 1

CFU-GM: Colony-Forming Unit Granulocyte-Monocyte, Unidade Formadora de Colônia Grânulo-Monocítica

CD14: Marcador Mielomonocítico, Receptor de Lipopolissacarídeo

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FADD: Fas-Associated Death Domain, Fator Associado ao Domínio de Morte

FAO: Food and Agriculture Organization, Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN- γ : Interferon Gama

Ikk : Inhibitor of Kappa B Kinase

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-1 α : Interleucina 1 α

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

LPS: Lipopolissacarídeo

NF κ B: Nuclear Factor kappa B, Fator Nuclear kappa B

NK: Natural Killer

PBS: Phosphate Buffered Saline

RIP: Receptor Interacting Protein

RNA: Ribonucleic Acid, ácido Ribonucleico

RNA_m: Ribonucleic Acid Messenger, Ácido Ribonucleico Mensageiro

TBS: Tris Buffered Saline

TLR4: Toll Like Receptor 4 , Receptor Toll like 4

TNF- α : Tumor Necrosis Factor-Alfa, Fator de Necrose Tumoral Alfa

TNFR-I: Tumor Necrosis Factor Receptor 1, Receptor de Fator de Necrose Tumoral 1

TNFR-II: Tumor necrosis Factor Receptor 2, Receptor de Fator de Necrose Tumoral 2

TRADD: TNF Receptor Associated Death Domain, Receptor de TNF Associado ao Domínio de Morte

TRAF2: TNF Receptor Associated Factor 2, Fator Associado ao Receptor de TNF

WHO: World Health organization, Organização mundial de Saúde

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1: Resultados do consumo de ração, proteína e variação do peso	26
Gráfico 2: Resultados de proteínas totais e albumina total sérica.	27
Gráfico 3: Resultados do número de leucócitos, segmentados, Infócitos e monócitos do sangue periférico	28
Gráfico 4: Resultados do número de leucócitos, segmentados, linfócitos, e monócitos do lavado da cavidade peritoneal,	30
Gráfico 5: Resultados do número de células que apresentaram os marcadores CD11b ⁺ e TNFR-I ⁺ no lavado da cavidade peritoneal por citometria de fluxo	32
Gráfico 6: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão da expressão de RNAm do TNFR-I em células da cavidade peritoneal	33
Gráfico 7: Expressão do Receptor de TNF em macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulados com TNF- α	33
Gráfico 8 : Resultados da expressão de TRAF2 em macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulados com TNF- α ,	34
Gráfico 9: Resultados da expressão de TRADD em macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulados com TNF- α	34
Gráfico 10: Resultados da expressão de RIP em macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulados com TNF- α ,	35
Gráfico 11: Gráfico 10: Resultados da expressão de IKK em macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulados com TNF- α	35
Gráfico 12: Resultados da expressão de IKB α em macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulados com TNF- α ,	36
Gráfico 13: Resultados da expressão de p IKB α em macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulados com TNF- α .	36
Gráfico 14: Resultados da expressão de NF κ B em macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulados com TNF- α	37
Gráfico 15: Resultados da expressão de p NF κ B em macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulados com TNF- α ,	37
Gráfico 16: Resultados da produção de IL-1 α por macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulado com TNF- α	38
Gráfico 17: Resultados da produção de IL-1 β por macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulado com TNF- α	39
Gráfico 18: Resultados da produção de IL-6 por macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulado com TNF- α ,	39
Gráfico 19: Resultados da produção de IL-12 por macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulado com TNF- α	40
Gráfico 20: Resultados da produção de IL-10 por macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulado com TNF- α	40

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Composição das Rações	15
Tabela 2: Composição da Mistura Vitamínica	16
Tabela 3: Composição da Mistura Salínica	16
Tabela 4: Valores de hemácias, hematócrito e hemoglobina	27
Tabela 5: Mielograma	30

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Ação Biológica do Fator de Necrose Tumoral Alfa	9
Figura 2: Transdução de sinal mediada pelo TNF	12
Figura 3: Fotomicrografia da imunofluorescência para marcação anti MAC-1 e F4/80	32

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1: Características dos ensaios TaqMan [®] utilizados para avaliação da expressão dos genes selecionados pela técnica de PCR em tempo real.	21
Quadro 2: Anticorpos utilizados, concentração, fornecedor, número catálogo e lote.	25

SUMÁRIO

	Página
Resumo	I
Abstract	II
Lista de Abreviaturas	III
Lista de Gráficos	IV
Lista de Tabelas	V
Lista de Figuras	V
Lista de Quadros	V
1.0 Introdução	1
2.0 Revisão de literatura	4
2.1 Desnutrição proteica	4
2.2 Macrófagos e TNF- α	6
2.3 Ativação do fator de transcrição NF κ -B mediada por TNF- α	10
3.0 Objetivos	14
4.0 Materiais e Métodos	14
4.1 Animais	14
4.2 Rações	15
4.3 Indução a desnutrição	17
4.4 Avaliação do estado nutricional dos animais	17
4.5 Avaliação da concentração protéica das rações	17
4.6 Obtenção de sangue total e soro	17
4.7 Avaliação da desnutrição: determinação de proteínas totais, albumina, pré-albumina séricas e hemograma.	18
4.8 Obtenção de células da medula óssea e realização do mielograma	18
4.9 Obtenção de células mononucleares peritoniais	19
4.10 Citometria de Fluxo	19
4.11 Imunofluorescência	20
4.12 Biologia Molecular	20
4.12.1 Extração e análise de RNA total	20
4.12.2 Síntese do DNA complementar	20
4.12.3 Determinação da expressão dos genes de interesse	21
4.13 Cultura de Células mononucleares peritoniais	22
4.14 Avaliação da síntese de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, <i>in vitro</i>	23
4.15 Avaliação da expressão das proteínas da via de sinalização do NF κ B ativada por TNF- α	23
4.15.1 SDS-PAGE e “Western blotting”	23
4.15.1.1 Preparo do Gel de Poliacrilamida	23
4.15.1.2 Preparo de Lisado de Proteínas Para SDS-PAGE e “Western blotting”	24
4.15.1.3 Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose)	24

	4.15.1.4 Sondagens das Proteínas com Anticorpos	25
	4.15.1.5 Revelação com sistema Quimioluminescente	26
	4.16 Análises estatísticas	26
5.0	Resultados	26
	5.1 Avaliação do consumo de ração, consumo de proteínas e variação do peso corpóreo	26
	5.2 Análises das concentrações séricas de proteínas totais e albumina serica	27
	5.3 Hemograma	27
	5.3.1 Eritrograma	27
	5.3.2 Leucograma	28
	5.4 Número de células totais da medula óssea	29
	5.5 Células do lavado peritoneal	30
	5.6 Ensaio de imunofluorescência em células peritoneais	31
	5.7 Citometria	32
	5.8 Biologia Molecular	33
	5.9 Avaliação da Expressão das proteínas, da via de sinalização do NFκB, ativada por TNF-α.	33
	5.10 Citocinas	38
6.0	Discussão	41
7.0	Conclusão	50
8.0	Referencias Bibliográficas	51
9.0	Anexo I: Certificado Comitê de Ética de Experimentação Animal	62

1. INTRODUÇÃO

Os termos desnutrição e subnutrição são frequentemente utilizados livremente e indistintamente. Subnutrição refere-se a todos os desvios do estado nutricional do ótimo ao adequado, incluindo desnutrição energética até supernutrição (a obesidade também é considerada uma forma de subnutrição). Esse termo é usado geralmente para se referir ao estado nutricional, mas também implica subalimentação (SHETTY, 2006). A Subnutrição é causada primariamente por ingestão inadequada de calorias, independentemente de qualquer outro nutriente específico ser um fator limitante (SHETTY, 2006). Já a Desnutrição surge à partir da deficiência de nutrientes específicos ou numa dieta baseada em alimentos com combinações ou proporções inadequadas. A desnutrição também pode ser resultado de perda ou utilização excessiva de nutrientes (SHETTY, 2006).

Vários estudos demonstram a importância dos nutrientes como moduladores do sistema imunológico e estabelecem, portanto, uma relação entre estado nutricional e imunidade. A depressão da imunidade (celular e humoral) é facilmente observada à medida que a desnutrição progride. Sabe-se que uma alimentação desprovida dos nutrientes necessários (em qualidade e quantidade adequadas) provoca a diminuição do substrato para produção de imunoglobulinas e células de defesa, que também apresentam sua síntese diminuída proporcionalmente à condição nutricional, podendo o indivíduo tornar-se anérgico (CUPPARI, 2009).

Atribui-se à deficiência protéica o enfraquecimento de muitos aspectos da resposta imunológica específica e não específica, levando a um aumento da suscetibilidade às infecções (KOMATSU *et al.*, 2007). Com o passar dos anos estudos têm demonstrado que a desnutrição protéica diminui a função das células do sistema imune (CHANDRA, 1997, NÁJERA *et al.*, 2004). Diante de estímulos inflamatórios, os macrófagos de animais desnutridos não respondem com a mesma intensidade ou da mesma maneira que os macrófagos oriundos dos

animais nutridos. Sendo assim, o estado de desnutrição favorece, ou permite o desenvolvimento dos processos inflamatórios e/ou infecciosos (SOUZA *et al.*, 2001, FOCK, *et al.*, 2007).

O binômio desnutrição-infecção pode ser visto sob dois aspectos:

I. A desnutrição alterando os mecanismos de defesa do indivíduo;

II. A infecções agravando o estado carencial previamente instalado ou ainda, a doença desencadeando o estado de desnutrição. (KEUSCH, *et al.*, 1986; POWANDA & BEISEL, 2003; SCRIMSHAW, 2003).

Nessas condições a desnutrição pode facilitar a invasão do agente infeccioso, favorecer sua proliferação no organismo, facilitar infecções secundárias e modificar o curso e a evolução da enfermidade (LAMUS, 1975; BRUNDTLAND, 2000). Dessa forma, elucidar os mecanismos celulares, do sistema imunológico, subjacentes a imunossupressão desenvolvida em condição de desnutrição, vem sendo o assunto de interesse para pesquisadores.

Dados da literatura e do nosso grupo evidenciaram que a desnutrição compromete órgãos linfo-hemopoéticos e modifica a resposta imune. Nossos trabalhos demonstram alterações estruturais e ultra-estruturais da medula óssea, baço e timo; alterações funcionais como redução da migração celular, do espraiamento, fagocitose, atividade bactericida e fungicida bem como alterações na produção de espécies reativas do oxigênio (KEUSCH, 1994; BORELLI, *et al.*, 1995; NARDINELLI & BORELLI, 2001; VITURI, *et al.*, 2001) e nitrogênio (FOCK, *et al.*, 2003). Também observamos em um modelo de desnutrição intra-uterina diminuição da migração celular com menor expressão de moléculas como L-selectina, colágeno tipo IV, além da diminuição de leucotrieno B4 após ativação com TNF- α (LANDGRAF, *et al.*, 2007).

Nossos dados também revelam diminuição na síntese de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e IL-6 (FOCK, *et al.*, 2007), porém os

mecanismos que levam a este quadro ,ainda não estão totalmente esclarecidos. Nos últimos anos muitos esforços têm sido empregados para elucidar os mecanismos envolvidos na regulação da transcrição gênica. Moléculas que participam desses processos regulatórios, como os fatores de transcrição, têm recebido atenção especial. A participação desses fatores em diversas funções da resposta inflamatória enfatiza sua importância para a compreensão de distúrbios relacionados a resposta inflamatória e talvez delinear novos caminhos terapêutico. O fator de transcrição NF κ B destaca-se pela sua vasta gama de ações e pelo fato de diversas proteínas estarem integradas na dinâmica de sua ativação. Há crescentes evidências de que a sinalização intracelular das células envolvidas na resposta inflamatória fornece novas perspectivas para a compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos inflamatórios. Vários fenômenos como a plasticidade, migração celular, aumento da taxa de renovação celular, aumento da síntese de enzimas, peptídeos, receptores, neurotrofinas, moléculas de adesão, entre outros, são caracterizados pela alteração na expressão de múltiplos genes. Os fatores de transcrição levam a uma expressão coordenada desses genes, sendo que a interação entre esses fatores conduz a um padrão de resposta específico.

Sabendo-se que animais desnutridos apresentam hipoplasia severa de órgãos linfo-hemopoéticos, com comprometimento na resposta inflamatória, alterações funcionais em macrófagos, com menor síntese de citocinas pró-inflamatórias, entre elas TNF- α , e que células de animais desnutridos apresentam comprometimento de receptores importantes para a ativação da cascata de sinalização do NF κ B mediada por LPS (FOCK, *et. al.*, 2007, FOCK, *et. al.*, 2010). Propõe-se neste trabalho avaliar a via de sinalização do TNF- α e a sua importância para a ativação do fator de transcrição NF κ B em um modelo desnutrição protéico.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESNUTRIÇÃO PROTÉICA

A desnutrição é um termo geral que significa a falta de alguns ou de todos os nutrientes necessários para a saúde. Pode ter origem na deficiência ou ausência de qualquer nutriente, sendo que sua instalação e gravidade dependem da causa, intensidade e duração da carência. Pode ser causada, primariamente, por dieta inadequada ou, secundariamente, por deficiência na absorção (ou ingestão deficiente) e, por um aumento da utilização de nutrientes ou de sua excreção excessiva. Assim, várias formas de desnutrição podem ocorrer simultaneamente e, desta maneira, tem-se quadros carências devidos a dietas quantitativa ou qualitativamente alteradas, originando diversos tipos de desnutrição (STINNETT, 1983).

Há dois tipos básicos de desnutrição: a primeira mais relevante é a desnutrição protéica e proteica-energética, caracterizada pela falta de quantidade suficiente de proteínas e de alimentos que fornecem energia. Este é o tipo usado como referência quando o assunto em discussão é a fome no mundo. O segundo tipo de desnutrição, não menos relevante, é a deficiência de micronutrientes como vitaminas e minerais. Há discussões para incluir a obesidade como o terceiro tipo de desnutrição, neste caso, não relacionado à falta de alimentos, mas sim como uma má nutrição, definida por pobres escolhas alimentares (BARON, 1997; MONTEIRO, 1995).

A Desnutrição é responsável por 55% das mortes de crianças no mundo inteiro e está associada a várias outras doenças, além de ser considerada uma das principais causas de mortes de crianças abaixo de cinco anos (SAWAYA, 2006).

Os índices de desnutrição levantados há alguns anos apresentavam irregularidades no comparativo entre as regiões brasileiras. No Norte e no Nordeste urbano e rural as estatísticas variavam de 36,2 a 48,3%. No Sul, Sudeste e Centro-Oeste esses índices eram menores (17%, 18,3% e 22,3%

respectivamente) (MONTEIRO, 2003). Aproximadamente 6,6% das crianças com até cinco anos de idade, habitantes do Semi-Árido (uma das regiões mais pobres do país), sofriam de desnutrição crônica (déficit de altura) (IICA, 2006). Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) se mostraram irregulares entre as regiões do país, porém no ano de 2008, evidenciou-se uma queda nos índices de desnutrição. Na região Norte e Nordeste os índices estavam entre 8,5% e 5,9%. Na região Sudeste e Sul o percentual de crianças desnutridas encontrava-se entre 6,1% e 3,9%, a região Centro-Oeste apresentou índice de 6,1% (POF, 2008-2009).

Os dados da FAO (2010) mostraram que, o maior número dos indivíduos subnutridos encontrava-se em países em desenvolvimento. Dois terços localizados em apenas sete países (Bangladesh, China, República Democrática do Congo, Etiópia, Índia, Indonésia e Paquistão) e mais de 40 por cento vivem na China e na Índia. A proporção de pessoas desnutridas continua maior na África sub-Sahariana, com 30% em 2010.

A FAO publicou estatísticas que evidenciaram um número de 868 milhões de pessoas sofrendo de desnutrição, sendo que a maioria se encontra na África Subsaariana e Oceania. Apesar da prevalência estar diminuindo nos últimos anos, as estatísticas ainda são dramáticas (FAO 2012).

As manifestações clínicas da desnutrição dependem do grau e severidade da deficiência dos nutrientes, e também da causa e duração da deficiência, bem como da idade do indivíduo e da associação ou não com outras doenças (RODRIGUEZ; *et al.*, 2011). Desta forma, a desnutrição compreende uma gama de síndromes clínicas. As formas clínicas características com manifestações mais severas são o Kwashiorkor (decorrente de uma carência protéica com ingestão normal de carboidratos) e o Marasmus (que decorre da deficiência prolongada de proteínas e carboidratos). Os quadros intermediários surgem pela combinação de vários graus de privação protéica com diversos graus de deficiência calórica total (DE ANGELIS, 1986; JAHOOOR *et. al.*, 2008).

Estas síndromes podem cursar com retardo no crescimento, alterações psicomotoras e alterações morfológicas e funcionais acentuadas em diversos órgãos e sistemas do corpo como coração, pulmões, trato gastrointestinal, fígado, rins e sistemas endócrino e imunológico (AUGUSTO, 1995; ROBBINS, *et al.*, 2003).

A desnutrição e os desvios nutricionais ocasionam a redução da imunidade, aumentando, portanto o risco de infecções (FONTOURA, *et. al.* 2006) sendo que, a maioria dos mecanismos de defesa do organismo está prejudicada (CHANDRA, 1997), além disso, a desnutrição é considerada a maior causa de imunodeficiência secundária em todo o mundo (RODRIGUEZ, *et. al.*, 2011).

2.2 MACRÓFAGO E TNF- α

As células e moléculas responsáveis pela imunidade formam o sistema imunológico, e a sua resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas é chamada de resposta imunológica. (ABBAS, *et. al.*, 2012). Dentre as diversas células do sistema imunológico os macrófagos desempenham uma grande variedade de funções contribuindo em diferentes aspectos na defesa do hospedeiro. São células essenciais na resposta imune como células apresentadora de antígeno (APC) e como célula reguladora e efetora (UNANUE & ALLEN, 1987; WEAVER & UNANUE, 1990; DOUGHERTY & McBRIDE, 1989; CALDER, 1995).

Os macrófagos são células importantes no mecanismo de defesa do organismo, sendo que a função mais conhecida dessas células é a fagocitose tanto de microrganismos, debris celulares, como de partículas líquidas (KINET, 1989). Entretanto essas células apresentam papel importante também na geração de radicais livres, apresentação de antígenos e produção de citocinas (NEWSHOLME, *et al.*, 1999; GREENBERG & GRINSTEIN, 2002), está última com uma importante função imediata, regulando resposta imune e inflamatória, podendo controlar a proliferação e diferenciação celular, a apoptose e ativar ou

inibir células maduras efetoras (WALKER *et al.*, 1995; QUESENBERRY, 1995; ASSENMACHER *et al.*, 1996; ABBAS *et al.*, 2012).

A secreção de citocinas é uma resposta rápida, um evento auto-limitante. Em geral as citocinas não são estocadas como moléculas pré-formadas e sua síntese é iniciada por um novo gene de transcrição. Tal ativação transcricional é geralmente transitória e as moléculas de RNAm são geralmente instáveis. A associação entre um período curto de transcrição e uma meia vida biológica curta do RNAm fazem que a secreção de citocinas seja transitória e dependente da interação ligante-receptor. Uma vez sintetizada, as citocinas são rapidamente secretadas (WALKER *et al.*, 1995; QUESENBERRY, 1995; ABBAS *et al.*, 2012).

As citocinas modificam a biologia celular, via ligação com receptores específicos presentes na célula-alvo. Os mecanismos pelos quais as citocinas ligam-se aos receptores, estimulando a transcrição, não são totalmente conhecidos. Presume-se que a ligação da citocina ao receptor estimule a produção ou a ligação de fatores nucleares regulatórios que ativariam a sequência de nucleotídeos na região 5' do gene que faz a transcrição (REEVES & MAGNUSON, 1990).

Ações de diversas citocinas podem ser antagônicas, sinérgicas ou redundantes. Determinadas citocinas podem influenciar a síntese de outras citocinas levando a uma cascata na qual a segunda ou terceira pode mediar a ação biológica da primeira citocina. A capacidade de uma citocina em aumentar ou inibir a produção de outras citocinas constituem-se em importante sistema regulatório positivo e negativo para as respostas imune e inflamatória (ARAI, *et al.*, 1990, ABBAS *et al.*, 2012).

Das citocinas liberadas durante a resposta por macrófagos, destaca-se a produção de IL-1, TNF- α e IL-6, citocinas pró-inflamatórias que atuam como os principais mediadores do metabolismo intermediário, com capacidade de originar

atividades resultantes da interação direta entre as citocinas e a resposta celular, podendo alterar o metabolismo por modificações nas concentrações de insulina, glucagon, corticosterona circulante e a síntese hepática de proteínas de fase aguda (FRIED *et al.*, 1978; GROSS & NEUBERNE 1980; ORTIZ & BETANCOURT, 1984; KEUSCH, 1994; FUJIHARA, *et al.*, 2003).

A interleucina 12, também é uma citocina pro-inflamatória, produzida por macrófagos ativados, que exerce um papel indutor do desenvolvimento de células T helper 1, dessa forma com uma importante função na relação resposta inespecífica e a resposta específica (GRAZIA CAPPIELLO *et al.*, 2001; LADERACH *et al.*, 2003; SANJABI *et al.*, 2000). A IL-10 inicialmente descrita como um fator produzido por clones de linfócitos Th2, inibe a produção de citocinas por linfócitos Th1, entre elas IL-2, IL-3, TNF- α , IFN- γ e GM-CSF. A IL-10, além de ser produzida por células Th2, é também produzida por macrófagos (FIORENTINO *et al.*, 1991) e inibe a produção de TNF- α , IL-6, IL-1 por macrófagos (BOGDAN *et al.*, 1991; FIORENTINO *et al.*, 1991; BERKMAN *et al.*, 1995).

Dentre as diversas citocinas produzidas pelo macrófago o TNF- α participa de uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo inflamação, crescimento, diferenciação e apoptose, sendo uma molécula chave na rede de citocinas, capaz de regular a expressão de outras citocinas (PFIZENMAIER *et al.*, 1996). A ligação de membros da família TNF e seus respectivos receptores inicia uma grande variedade de respostas, onde muitas dessas respostas são pró-inflamatórias e dependem da ativação de fatores de transcrição, como por exemplo, o NF κ B e AP-1, levando a uma nova transcrição gênica (ABBAS, *et al.*, 2012).

A liberação de TNF- α em resposta aguda é rápida e curta, induzindo a liberação de IL-1, ativando os fagócitos mononucleares, estimulando as células T, as células "natural killer" e os mastócitos (VAN DER POLL & LOWRY, 1995; BEUTLER & BAZZONI, 1998). O IFN- γ , produzidos pelas células T estimula a síntese de TNF- α de monócitos ativados previamente por LPS.

O $\text{TNF-}\alpha$ aumenta a expressão de receptores de superfície em células do endotélio vascular, aumentando a adesividade de leucócitos, inicialmente de neutrófilos e subsequentemente de monócitos e linfócitos (Figura 1). Além disso, o $\text{TNF-}\alpha$ estimula os monócitos e outras células a secretarem citocinas que contribuem para o recrutamento de eosinófilos e monócitos. A produção crônica de $\text{TNF-}\alpha$ em baixas concentrações propicia à remodelação tecidual (DINARELLO, *et al.*, 1986).

Figura 1: Ação Biológica do Fator de Necrose Tumoral Alfa. Adaptado, Pfizenmaier, 1996, Abbas, *et al.*, 2012.

O $\text{TNF-}\alpha$ é o principal mediador da resposta inflamatória aguda na presença de bactérias Gram-negativas e outros microrganismos infecciosos. Os fagócitos mononucleares são a principal fonte celular desta citocina embora os linfócitos T, células NK e mastócitos ativados possam secretá-la. O $\text{IFN-}\gamma$, produzido por células T e NK, aumenta a síntese de $\text{TNF-}\alpha$ por macrófagos estimulados com LPS (MENDES, 2007).

Dessa forma considera-se o TNF- α um dos mais proeminentes mediadores inflamatório, essa citocina tem um papel central na iniciação de reações inflamatórias do sistema imune inato, incluindo a produção de outras citocinas, ativação e expressão de moléculas de adesão, e estímulo para o crescimento. A potente atividade biológica do TNF- α também explica o perigo de dano tecidual quando a ativação do TNF- α não é cuidadosamente controlada (HEHLGANS & PFEFFER, 2005)

Sendo assim, apesar do TNF- α exercer atividades benéficas na imunoregulação e na defesa orgânica, essa citocina pode ser responsável por muitas complicações sistêmicas graves. A produção de TNF- α em altas doses causa anormalidades sistêmicas, clínicas e patológicas e está diretamente relacionada com alto risco de mortalidade (GARG & AGGARWAL, 2002). Altas concentrações de TNF- α induzem estado hemodinâmico descompensado levando a um choque séptico (LI *et al.*, 2006). Já está demonstrado que tanto a IL-1 α como IL-1 β (DINARELLO, 1984) estão alteradas em pacientes com *sepsis* (DINARELLO, *et al.*, 1986) além de outras citocinas como TNF- α , IFN- γ (DINARELLO, *et al.*, 1984; 1988), IL-6 (HELLE, *et al.*, 1988), IL-8 (ZAMPONIO, *et al.*, 1994), e IL-11 (LOPEZ-VALPUESTA & MYERS, 1994).

2.3 ATIVAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF κ B MEDIADA POR TNF- α

Os fatores de transcrição são proteínas que se ligam ao promotor e ao *enhancer* dos genes promovendo uma coordenação da iniciação da transcrição gênica (XIAO, 2004). O fator de transcrição nuclear kappa B (NF κ B) é um importante fator de transcrição, envolvido na resposta imunológica, na qual regula expressão de genes essenciais no processo inflamatório e na defesa do organismo, além de ter participação na sobrevivência e proliferação celular (XIAO, 2004). Sabe-se que uma grande variedade de estímulos leva a ativação do NF κ B, como, por exemplo, citocinas (TNF e IL-1), lipopolissacarídeo de bactérias Gram-

negativas (LPS), infecções virais e estresse oxidativo (ABBAS, *et al.*, 2012; BOCHUD & CALANDRA, 2003).

A ativação do fator de transcrição NF κ B mediada por TNF- α e ativação de genes relacionados à inflamação, à resposta imunológica inata, à anti-apoptose e à sobrevivência celular ocorrem por uma via denominada clássica (XIAO, 2004). O TNF- α exerce seus efeitos através da ligação a dois receptores distintos, TNFR-I e TNFR-II (MARINO, *et al.*, 1997). O papel biológico do TNFR-II não é totalmente compreendido, embora algumas evidências sugiram que esse receptor module a ação do TNFR-I nas células do sistema imune e células endoteliais (VAN HERREWEGHE, *et al.*, 2010). Já no que refere especificamente à ativação via receptor TNFR-I, sabe-se que ele é responsável pela maioria dos efeitos do TNF- α , desencadeando uma série de eventos intracelulares que resultam na ativação principalmente de dois fatores de transcrição NF κ B e c-Jun. Estes últimos fatores de transcrição são responsáveis por ativarem genes importantes para diversos processos biológicos, incluindo crescimento e morte celular, resposta imune e inflamatória e resposta a estresses (HSU, *et al.*, 1995; CHEN & GOEDDEL, 2002, ABBAS, *et al.* 2012).

O TNFR-I é constitutivamente expresso na maioria dos tipos celulares, incluindo os macrófagos. A sinalização celular desencadeada por esse receptor requer a formação de um complexo ligante trimérico para a ativação celular (HSU, *et al.*, 1995, CHEN & GOEDDEL, 2002). O TNFR-I apresenta um domínio enzimático reconhecível (domínio de morte SODD), e sua capacidade de transdução de sinais é dependente da interação entre proteínas assessórias (BAKKER & REDDY, 1996, TEWARI & DIXIT, 1995, VAN HERREWEGHE *et al.*, 2010). A ativação da via clássica do NF κ B pelo TNFR-I depende do recrutamento do domínio enzimático da proteína TRADD, que tem sido identificada como uma proteína associada ao receptor I do TNF que se liga com o domínio de morte do TNFR-1 de forma ligante-dependente o qual iniciará o recrutamento da proteína adaptadora de interação denominada RIP (Receptor Interacting Protein) (HSU, *et al.*, 1995; CHEN & GOEDDEL, 2002) e das proteínas TRAF2 (TNFR-associated

factor 2) e FADD (Fas-associated death domain) (HSU, *et al.*, 1995, BOLDIN, *et al.*, 1995; CHINNAIYAN, *et al.* 1995; ROTHE, *et al.*, 1994, VAN HERREWEGHE *et al.*, 2010) (**figura 2**). Essas proteínas recrutam enzimas chaves do TNFR-I e são responsáveis pelo início dos eventos celulares de sinalização. O TNF- α pode levar tanto a ativação da via inflamatória quanto desencadear a morte celular por apoptose. A proteína TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain) se liga ao TNFR-I, que recrutará a proteína FADD (Fas-Associated Death Domain) e ligará-se à caspase-8, levando assim a uma ativação da via da apoptose. Ainda é desconhecido qual é o fator que determina se a ligação do TNF ao TNFR-I irá ativar a via de sinalização inflamatória ou apoptótica (ABBAS, *et al.*, 2012).

Figura 2. Transdução de sinal mediada por TNF. Ativação da via de sinalização do TNF mediada pelo receptor TNFR-I. Recrutamento e formação do complexo proximal do receptor contendo importante proteínas adaptadoras TRADD, TRAF2, RIP e FADD. Estas proteínas adaptadoras irão recrutar e ativar proteínas importantes para a ativação celular (por exemplo, caspase-8 e IKK β) e desencadearão eventos celulares como apoptose, ativação do fator de transcrição NF κ B e ativação de JNK. Adaptado de CHEN & GOEDDEL, 2002.

Uma vez ativado o complexo do receptor TNFR-I as proteínas adaptadoras irão recrutar outras proteínas que culminem com a ativação do fator de transcrição NF κ B. Quando não estimulado, o fator NF κ B encontra-se no citoplasma ligado a

uma proteína inibitória: o I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF κ B para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do I κ B são necessárias para que ocorra a translocação nuclear (BALDWIN, 1996; BAEUERLE & BALTIMORE, 1996).

A fosforilação do I κ B, e sua subsequente degradação, é fundamental. A proteína I κ B fosforilada recebe a adição de ubiquitina e pela ação da ubiquitina ligase, sendo em seguida degradada pelo complexo proteossoma 26S. Isso resulta na liberação do NF κ B (GHOSH, *et al.*, 1998). O desmembramento do complexo I κ B/NF κ B permite o transporte do NF κ B para o núcleo, com consequente ligação desse nos genes que apresentam a sequência regulatória, junto à região promotora, levando a um aumento na expressão do gene alvo. A fosforilação do I κ B ocorre pela ação de proteínas quinase específicas, como o complexo I κ B quinase (IKK) (CAAMANO & HUNTER, 2002; LI & VERMA, 2002)

A implicação do fator de transcrição NF κ B como alvo terapêutico decorre da enorme quantidade de genes que sofrem regulação por esse fator e modulam vários processos celulares, tais como desenvolvimento, plasticidade, morte e defesa celular (HELENIUS, *et al.*, 1996a; HELENIUS, *et al.*, 1996b). Entre tais genes podem-se citar os envolvidos na produção de enzimas, como óxido nítrico sintase e ciclooxigenase-2 induzíveis e a enzima de defesa antioxidante superóxido dismutase; na produção de interleucinas, fator de necrose tumoral, moléculas de superfície celular, como a molécula 1 de adesão de célula vascular, molécula 1 de adesão de célula intracelular, E-selectina, complexos de histocompatibilidade de classe I e II; proteínas de fase-aguda, como amiloide série A. (O'NEILL & KALTSCHMIDT, 1997; BARNES & KARIN, 1997).

3.0 OBJETIVOS

Sabendo-se que animais desnutridos apresentam alterações funcionais das células efectoras da resposta inflamatória/infecciosa, propõe-se neste projeto, baseado em um modelo experimental de desnutrição protéico, avaliou-se:

- ❖ O perfil hematológico (hemograma e mielograma);
- ❖ Contagem diferencial e imunofenotipagem de células peritoniais;
- ❖ A expressão do receptor e RNAm de TNF- α (TNFR-I) em células peritoniais;
- ❖ Capacidade de células obtidas do lavado peritoneal, em sintetizar as citocinas: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL10, quando estimuladas *in vitro* com TNF- α ;
- ❖ Avaliar a expressão das proteínas adaptadoras TRADD, TRAF2, RIP e IKK α em células peritoniais estimulados *in vitro* com TNF- α ;
- ❖ Avaliar a expressão do fator de transcrição NF κ B e IKB α total e das suas porções fosforiladas respectivamente em células peritoniais estimuladas *in vitro* com TNF- α .

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Balb/C, de dois a três meses de idade, machos, provenientes do Biotério Central do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo.

Esse trabalho está Aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Protocolo CEUA/ FCF/316) em 04 de Fevereiro de 2011. (**Anexo I**)

Os animais foram submetidos, desde o nascimento, às mesmas condições ambientais (temperatura ambiente entre 22-25°C, ciclo de luz de 12 horas). Logo após o desmame, os animais passaram a ser alimentadas com ração Purina e água *ad libitum* até o início do experimento.

Os animais foram pesados e distribuídos em gaiolas metabólicas, receberam Ração Controle por 7 dias (ZUCAS, *et al.*, 1969), sendo pesados a cada 48 horas durante o período de adaptação (BORELLI *et al.*, 1995; 1998), que foi definido pelo ganho e estabilidade do peso corpóreo.

4.2 RAÇÕES

A ração I destinada aos animais nutridos (grupo controle) possui 12% de proteína e a ração II, (grupo desnutrido), possui 2% de proteína. A caseína foi a fonte protéica das rações. A mistura salínica e vitamínica utilizadas foram as recomendadas por Reeves *et al.*, (1993) (**Tabela 1**). As rações foram produzidas na forma de granulado e conservadas a -4°C até o momento de uso.

Tabela 1: Composição das Rações

Componentes (g/kg)	Ração I - Controle	Ração II - Hipoprotéica
Proteína (Caseína)	120	20
Sacarose	100	100
Celulose	50	50
Óleo de Soja	40	40
Mistura Salínica ¹	35	35
Mistura Vitamínica ¹	10	10
L-Cistina	1,8	0,257
Bitartarato de Colina	2,5	2,5
Tert-butilhidroquinona	0,008	0,008
Amido	642,5	742,5

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, 1993). Dietas isocalóricas 3601,0 kcal/kg de ração.

Tabela 2: Composição da Mistura Vitamínica

Vitaminas g/Kg de mix	Rações Normoprotéica e Hipoprotéica
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 B-12	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 normoprotéica e hipoprotéica de acordo com o Instituto Americano de Nutrição (REEVES, 1993)

Tabela 3: Composição da Mistura Salínica

Sais minerais (g/Kg de Mix)	Ração Normoprotéica	Ração Hipoprotéica
Carbonato de cálcio anidro	357,00	357,00
Fosfato de potássio monobásico	236,16	353,21
Cloreto de sódio	74,00	74,00
Citrato de potássio	39,00	0
Sulfato de potássio	46,60	46,60
Óxido de magnésio	24,00	24,00
Citrato férrico	6,06	6,06
Carbonato de zinco	1,65	1,65
Carbonato de manganês	0,63	0,63
Carbonato cúprico	0,30	0,30
Iodato de potássio	0,01	0,01
Selenato de sódio anidro	0,01025	0,01025
Paramobilidato de amônio tetrahidratado	0,00795	0,00795
Meta-silicato de sódio 9-hidratado	1,45	1,45
Sulfato de potássio e crômio	0,275	0,275
Cloreto de lítio	0,0174	0,0174
Ácido bórico	0,0815	0,0815
Fluoreto de sódio	0,0635	0,0635
Carbonato de níquel	0,0318	0,0318
Vanadato de amônio	0,0066	0,0066
Sacarose	212,646	134,596

Composição da mistura salínica para as dietas normoprotéica e hipoprotéica de acordo com o Instituto Americano de Nutrição (REEVES, 1993).

4.3 INDUÇÃO À DESNUTRIÇÃO

Após o período de adaptação de uma semana, os animais foram separados em dois grupos: o grupo controle (nutrido) recebeu a ração I e o grupo desnutrido (experimental) recebeu a ração II. Ambos os grupos receberam água e ração *ad libitum*, determinou-se a cada 48 horas o consumo de ração, água e o peso corpóreo de cada animal.

Os animais ficaram submetidos a essa dieta até que perdessem cerca de 20% do peso inicial, a seguir foram retirados do biotério, e levados até o laboratório de Hematologia Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, onde os experimentos foram realizados.

4.4 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL DOS ANIMAIS

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

4.5 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DAS RAÇÕES

A determinação da concentração protéica das rações foi feita pelo método de micro-Kjedahl (WARD, 1963) e realizada no laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, sob a responsabilidade da Prof. Dr. Julio Tirapegui.

4.6 OBTENÇÃO DE SANGUE TOTAL E SORO

As amostras sanguíneas foram obtidas, a partir do plexo axilar com auxílio de uma pipeta de transferência, em camundongos previamente anestesiados com cloridrato de quetamina (50 mg/Kg de massa corporal) associado ao cloridrato de xilazina (50 mg/Kg de massa corporal), por via intramuscular. Amostras sem anticoagulante foram utilizadas para obtenção do soro, e para obtenção do sangue

total (utilizado para a realização do hemograma) foram utilizadas amostras com EDTA 10%. O soro foi separado por centrifugação (2000Xg por 10 minutos), a 4°C, sendo utilizado para a dosagem das proteínas totais, albumina e pré-albumina.

4.7 AVALIAÇÃO DA DESNUTRIÇÃO: DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS, ALBUMINA, PRÉ-ALBUMINA SÉRICAS E HEMOGRAMA.

A determinação de proteínas totais foi feita pelo método do Biureto (GORNALL, *et al.*, 1949) e a determinação de albumina foi realizada pelo método do Verde de Bromo Cresol (DOUMAS, *et al.*, 1971). As amostras foram processadas em duplicata e as leituras realizadas em espectrofotômetro automatizado Synergy MX (BIOTEK®). A pré-albumina foi avaliada pela determinação quantitativa em soro através de técnica automatizada de nefelometria utilizando-se reagentes comerciais *N-ANTISORO* pré-albumina (Dade Behring®, Marburg, USA), seguindo-se a metodologia indicada pelo fabricante.

Para a realização do hemograma as amostras foram coletadas como descrito no item 4.6 e com esse material realizou-se o hemograma (DACIE & LEWIS, 1995). O número de eritrócitos e de leucócitos foi determinado em contador automático (ABX Vet ® HORIBA). Os valores relativos do número de leucócitos foram determinados em extensões sanguíneas, realizadas após a coleta do sangue e coradas pela coloração de May Grunwald-Giensa modificada (ROSENFELD, 1947).

4.8 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DA MEDULA OSSEA E REALIZAÇÃO DO MIELOGRAMA

Animais anestesiados de acordo com o descrito no item 4.6 foram exsanguinados por venossecção e eutanasiados. Procedeu-se à retirada do fêmur esquerdo, seguida do corte das epífises. As células da medula óssea foram obtidas por lavagem da cavidade femoral com 0,5 mL de meio de cultura McCoy's 5A® modificado (SIGMA®, CHEMICAL COMPANY, USA). A suspensão

celular obtida foi utilizada para contagem do número total de células nucleadas em câmara de Neubauer e para a confecção de lâminas obtidas por citocentrifugação e coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947), que foram analisadas em microscópio óptico a fim de se realizar a identificação e quantificação das populações celulares (contando-se, no mínimo, 300 células por lâmina).

4.9 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES PERITONIAIS

Após exsanguinação e eutanásia dos animais, a cavidade peritoneal foi lavada com 5 mL de meio RPMI 1640 (Cultilab[®], Campinas, Brasil), pH 7,4, estéril, contendo 10% de soro bovino fetal (Cultilab[®] Campinas, Brasil), aspirando-se, a seguir, o líquido peritoneal, contendo as células, as quais foram contadas em hemocitômetros e a viabilidade celular avaliada pelo teste de exclusão com o azul de tripano.

4.10 CITOMETRIA DE FLUXO

Alíquotas de 10^5 células/mL de suspensão contendo as células do lavado peritoneal dos camundongos controles e desnutridos, coletadas conforme item 4.8, foram suspensas em meio DMEM alta glicose, pH 7,4. As células foram centrifugadas a 1500 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi desprezado por inversão, adicionou-se anticorpos e incubou-se por 30 minutos com 8µL anticorpo APC-TNFR-I (Cat 113006, lot # b146514 **Biolegend**) e/ ou 4µL anticorpo FITC-CD11b (Cat 11-0112-82, lot# E033743 **e-Bioscience**), sob agitação, protegido da luz. Após a incubação as amostras foram lavadas, Adicionar 500 µL de PBS, Centrifugadas 1500 rpm por 3 minutos e imediatamente realizou-se a aquisição no FACSCanto II (**Becton Dickson, NJ, USA**) foram adquiridos 10.000 eventos. As aquisições foram analisadas e compensadas pelo software FLOW JO 7.6 (**TreeStar, OR, USA**).

4.11 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para o ensaio de Imunofluorescência as células foram coletadas como descrito no item 4.9, alíquotas de $0,5 \times 10^6$ foram cultivadas em meio RPMI 1640 com 10% de soro bovino fetal, durante período de 24 horas em temperatura de 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂. Após o período de incubação as células foram lavadas 2 vezes com solução salina, e caracterizadas com os anticorpos Dapi (Cat D1306, LifeTechnologies), Mac-1 (Cd11b Cat 11-0112-82, lot# E033743, eBioscience) e F4/80 (Cat # 17-4801-82, lot# E07285-269 eBioscience), e então analisadas ao microscópio.

4. 12 BIOLOGIA MOLECULAR

4.12.1 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE RNA TOTAL

O RNA total foi obtido a partir de células totais do lavado peritoneal dos animais dos grupos Controle e Desnutrido, conforme descrito nos itens 4.9, usando o kit *RNeasy Mini* (Qiagen, Incorporated, Chatsworth, CA) seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, o RNA total foi imediatamente mensurado por espectrofotometria pelo equipamento *NanoVue Plus* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). A absorbância máxima dos ácidos nucleicos sob luz UV ocorre no comprimento de onda de 260 nm e a concentração de RNA total é dada em ng/μL, onde uma unidade de densidade óptica equivale a 40 μg de RNA por mL de solução. A pureza do RNA total foi avaliada pela razão A_{260nm}/A_{280nm} (SAMBROOK; GETTING, 1989), sendo que foram consideradas adequadas para utilização as amostras cujas razões de absorbância encontravam-se na faixa entre 1,9 e 2,1. As amostras de RNA foram armazenadas em alíquotas a -80°C até que a transcrição reversa fosse realizada.

4.12.2 SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR

O DNA complementar (cDNA) das amostras foi sintetizado a partir de RNA total. Foi utilizado o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied

Biosystems, Carlsbad, CA), que utiliza a enzima transcriptase reversa *MultiScribe*[™]. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 500 ng de RNA total em um volume total de 10 µL em água livre de DNase e RNase. A proporção de reagentes utilizada para a transcrição reversa foi: 2,0 µL de 10× RT Buffer, 0,8 µL de 25× dNTP Mix (100 mM), 2,0 µL de 10× RT Random Primers, 1,0 µL de transcriptase reversa *MultiScribe*[™], 1,0 µL de inibidor de RNase e 3,2 µL de água livre de DNase e RNase, totalizando um volume final de 20 µL. A reação foi feita sob as seguintes condições de ciclagem: incubação dos reagentes por 10 minutos a 25°C, aquecimento a 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos e resfriamento a 4°C, seguindo as instruções do fabricante. A eficiência da reação de transcrição reversa foi considerada igual para todas as amostras. O cDNA obtido foi armazenado a -40 °C até a realização da PCR em tempo real.

A análise da expressão gênica foi feita pelo método de quantificação relativa, no qual foi utilizado um gene de referência (*ACTB*) como controle endógeno.

Gene	Espécie	Identidade do ensaio	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
<i>TNFRSF1a</i>	<i>Mus musculus</i>	Mm00441883_g1	82
<i>ACTB</i>	<i>Mus musculus</i>	Mm00607939_s1	115

pb: pares de bases

Quadro 1: Características dos ensaios TaqMan[®] utilizados para avaliação da expressão dos genes selecionados pela técnica de PCR em tempo real.

4.12.3 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE INTERESSE

A determinação da expressão dos genes foi realizada por PCR em tempo real utilizando o sistema *TaqMan*[®] (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) e os ensaios foram conduzidos no equipamento *A&B StepOne Plus Real-Time PCR System*[®] (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). Neste sistema, a amplificação é avaliada por monitoramento contínuo da fluorescência de cada amostra, entre

520 e 660 nm, de forma que a intensidade de fluorescência detectada é diretamente proporcional à quantidade de cDNA presente na amostra. Estes dados são traduzidos por um software específico e plotados em um gráfico que mostra a intensidade de fluorescência *versus* o número de ciclos. Quanto maior a quantidade de cDNA molde presente no início da reação, menor é o número de ciclos para detecção de uma intensidade de fluorescência estatisticamente significativa (HIRAYAMA *et al.*, 2008).

O volume total de reação de 10 µl foi composto de 1,0 µL de cDNA, 5,0 µl de *TaqMan® Fast Universal Master Mix* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA), 0,5 µl de cada iniciador (sense e antisense) – marcado com sonda FAM e referência passiva ROX – e 3,5 µl de água livre de DNase e RNase. As condições de termociclagem utilizadas foram as mesmas descritas no item 4.12.2.

Os valores quantitativos da expressão gênica foram obtidos pelos valores do Ct, que se caracteriza pelo início da amplificação do produto de PCR. Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de expressão relativa} = 2^{-(\Delta\text{Ct amostra} - \Delta\text{Ct calibrador})} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

O ΔCt é obtido pela subtração da média dos Cts do gene de interesse pela média dos Cts do controle endógeno, para normalização dos dados. O calibrador é a amostra utilizada como base para resultados comparativos. Como controle de qualidade, todas as reações foram realizadas em duplicata e para cada placa de reação foram utilizados controles negativos.

4.13 CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES PERITONIAIS

As células foram coletadas como descrito no item 4.9 e cultivadas (1×10^6 célula/mL) em meio RPMI 1640 com 10% de soro bovino fetal, em duplicata, na presença ou ausência de TNF- α (10ng) durante período de 2 horas em temperatura de 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂. A quantidade de TNF- α e o tempo de

incubação utilizado foram padronizados de acordo com estudos prévios realizados pelo grupo, e para evitar o efeito autócrino das citocinas produzidas pelos macrófagos, respectivamente. Após decorrido esse período o sobrenadante foi coletado para a posterior dosagem de citocinas e realizado a extração das proteínas.

4.14 AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DE IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-10 *in vitro*

As células do lavado peritonial foram obtidas conforme descrito no item 4.9. As células ficaram em cultura a 37 °C, 5% de CO₂, em placas de cultura com 24 poços na concentração de 1 x 10⁶ células por poço, e um volume total de 1 mL. As células serão cultivadas na ausência ou presença de TNF- α em meio de cultivo celular (RPMI 1640 — código R 5886) (Cultilab – Campinas, Brasil), estéril, aprotogênico e contendo soro fetal bovino (10%). Após 2 horas, o sobrenadante da cultura celular foi removido e congelado (-80 °C) para posterior dosagem de IL-1 α (Cat DY 400, Lote 1299222), IL-1 β (Cat DY 401, Lote 1295298), IL-6 (Cat DY 406, Lote 1283317), IL-12 (Cat DY 419, Lote 1275166), IL-10 (Cat DY 417, Lote 1294698). A determinação da concentração das citocinas presentes no sobrenadante das culturas celulares foi realizada pelo método de ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) – kits R&D Systems.

4.15 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO NF κ B ATIVADA POR TNF- α

A expressão do TNFR-I, TRAF2, TRADD, RIP, IKK, IKB α , p IKB α , NF κ B, p NF κ B em células mononucleares peritoniais, mantidos sob cultura como descrito no item 4.13, foram determinados pela técnica de Western Blotting.

4.15.1 SDS-PAGE E “WESTERN BLOTTING”

4.15.1.1 PREPARO DO GEL DE POLIACRILAMIDA

Procedeu-se conforme protocolo de Sambrook *et al.* (1989) e Harlow & Lane (1988), descrito sucintamente a seguir. Preparou-se géis em bicamada,

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

4.15.1.2 PREPARO DE LISADO DE PROTEÍNAS PARA SDS-PAGE E “WESTERN BLOTTING”

Os lisados foram preparados a partir de 1×10^6 células em tampão RIPA (0,1 % SDS, 1 % Igepal CA-630, 1 % deoxicolato de sódio, 10 mM Tris.HCL, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 µg/mL aprotinina, 1 µg/mL leupeptina, 100 µg/mL PMSF, 0,5 mM EDTA). O material foi sonificado (30 segundos), centrifugado por 1 minutos, a 20.000 rpm, e 4 °C, o sobrenadante foi quantificado e um volume foi misturado ao tampão de laemmli (3 x concentrado, 100 mM Tris.HCL, pH 6,8, 5 % 2-mercaptoetanol (v/v), 2 % SDS, 20 % glicerol, 0,01 % azul de bromofenol), levadas ao banho seco por 10 minutos a 100°C, para desnaturação das proteínas e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida. Como padrão foi utilizada a mistura pré-corada Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (THERMO SCIENTIFIC, EUA) (5-10 µg de proteína).

4.15.1.3 TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS DO GEL PARA A MEMBRANA (NITROCELULOSE)

O gel contendo as proteínas fracionadas por eletroforese foi incubado por 10 minutos em tampão de transferência (3 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037 % SDS, 20 % metanol, pH 8,3). Paralelamente, a membrana de nitrocelulose foi hidratada e então também incubada em tampão de transferência. Um "sanduíche" foi então montado na seguinte ordem: esponja, 2 folhas de papel 3mm, membrana, gel, 2 folhas de 3 mm (Whatman), esponja. Procedeu-se à transferência em cuba de eletroforese, na presença de tampão de transferência, sob corrente de 200-400 mA, por 90 min.

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

4.15.1.4 SONDAGENS DAS PROTEÍNAS COM ANTICORPOS

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com proteínas de leite desnatado Molico, a 3 %, em tampão TBS, por 0,5-1 h, sob agitação. O anticorpo específico foi diluído (quadro 2) em TBS com 0,05% Tween 20 (TBST) e utilizado para a incubação com as membranas, por 2-12 h, com agitação, à temperatura de 2 a 8°C. A membrana foi então lavada 3 vezes, por 10 minutos, com TBST.

ANTICORPO	DILUIÇÃO	FORNECEDOR	NÚMERO CATÁLOGO	LOTE
TNFR-I	1:200	Santa Cruz	SC-7895	Lot# H1010
TRADD	1:200	Santa Cruz	SC-7868	Lot#C3010
TRAF2	1:200	Santa Cruz	SC-876	Lot# E3111
IKB α	1:1000	Santa Cruz	SC-371	Lot# F0810
p-IKB α	1:1000	Santa Cruz	SC-101713	Lot# J1111
IKK α	1:1000	Santa Cruz	SC-7182	Lot# A1111
NF κ B	1:1000	Santa Cruz	SC-372	Lot# L2011
p- NF κ B	5:1000	Santa Cruz	SC-33039	Lot# F2011
RIP	1:1000	Santa Cruz	SC-7881	Lot# K2811

Quadro 2: Anticorpos utilizados, concentração, fornecedor, número catálogo e lote.

As proteínas foram sondadas com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:10.000 em TBST, por 2 h, sob agitação. A membrana foi lavada 3 vezes, por 10 minutos, com agitação.

4.15.1.5 REVELAÇÃO COM SISTEMA QUIMIOLUMINESCENTE

A revelação foi realizada utilizando-se o Kit ECL Plus (luminol, fenol e peróxido de hidrogênio), Para análise utilizou-se o digitalizador de Imagem ImageQuant 400 (GE Helthcare)

4.16 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o programa GraphPadInstat Tm for Windows. Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de homocedasticidade da amostra e classificados em paramétricos ou não paramétricos pela aderência à curva Normal (curva Gaussiana). Dados obtidos em nossos experimentos foram submetidos à análise estatística do teste t e ANOVA e considerados significativos quando o $p \leq 0,05$.

5.0 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO, DE PROTEÍNAS E VARIAÇÃO DO PESO CORPÓREO.

O consumo de ração tanto dos animais do grupo controle quanto do grupo desnutrido foi semelhante (**gráfico 1**), porém houve uma redução significativa na quantidade de proteína ingerida pelo grupo desnutrido (**gráfico 1**) em função da composição da ração (**tabela 1**). Os animais do grupo desnutrido apresentaram uma perda de peso significativa (**gráfico 1**).

Gráfico 1 : Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão, do consumo de ração, consumo de proteína e variação do peso, camundongos do grupo controle (n=13), camundongos do grupo desnutrido (n=14). ***Valores significativos para $p < 0,001$, n representa número de animais avaliados

5.2 ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS TOTAIS E ALBUMINA SÉRICA.

Os animais do grupo desnutrido apresentaram valores significativamente menores de proteínas totais, albumina e pré-albumina sérica (**Gráfico 2**).

Gráfico 2: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão de proteínas totais, albumina total e pré-albumina sérica, camundongos do grupo controle (n=13), camundongos do grupo desnutrido (n=14), ***Valores significativos para $p < 0,001$, **Valores significativos para $p < 0,01$. n representa número de animais avaliados.

5.3 HEMOGRAMA

5.3.1 ERITROGRAMA

Os camundongos desnutridos apresentaram diminuição significativa no número de hemácias, bem como redução na porcentagem do hematócrito e menor concentração de hemoglobina (**Tabela 4**).

Tabela 4 : Valores de hemácias, hematócrito e hemoglobina.

Grupo experimental	Controle (n=13)	Desnutrido (n=14)
Hemácia ($\times 10^6$ células/mm ³)	9,32 $\pm$ 0,25	8,13 $\pm$ 0,36*
Hematócrito (%)	43,4 $\pm$ 1,0	37,8 $\pm$ 1,2 **
Hemoglobina (g/dL)	13,7 $\pm$ 0,4	11,8 $\pm$ 0,3**

Tabela 4: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão, de hemácias, hematócrito, hemoglobina, **Valores significativos para $p < 0,01$, *Valores significativos para $p < 0,05$, n representa número de animais avaliados.

5.3.2 LEUCOGRAMA

O número absoluto de leucócitos apresentou redução significativa, também observamos redução significativa nos valores absolutos de neutrófilos, linfócitos, monócitos do sangue periférico nos animais do grupo desnutrido (**Gráfico 3**).

Gráfico 3: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão do número de leucócitos, segmentados, linfócitos, e monócitos do sangue periférico, camundongos do grupo controle (n=13), camundongos do grupo desnutrido (n=14), ***Valores significativos para $p < 0,001$. ** Valores significativos para $p < 0,01$, n representa número de animais avaliados.

5.4 NÚMERO DE CÉLULAS TOTAIS NA MEDULA ÓSSEA

O mielograma mostra uma hipoplasia com significativa redução no número de células totais nos animais desnutridos, bem como redução nos blastos, da série granulocítica. Além de redução significativa na série eritrocitária e plasmocitária também se observaram redução na série mono-macrofágica. Não observamos diferença na contagem de linfócitos (**Tabela 5**).

Tabela 5: Mielograma

Grupo experimental Célula (x10⁶/mL)	Controle (n=06)	Desnutrido (n=06)
Células Totais	9,05 ± 0,21	6,20 ± 0,10 ***
Blastos	0,640 ± 0,61	0,391 ± 0,56 *
Formas jovens	0,755 ± 0,57	0,525 ± 0,58 *
Forma em anel	1,408 ± 1,03	1,082 ± 0,60 *
Segmentado	2,052 ± 1,33	1,467 ± 1,48 *
Eosinófilo	0,230 ± 0,45	0,118 ± 0,20 *
Linfócito	2,265 ± 1,21	2,022 ± 0,98
Plasmocito	0,0038 ± 0,06	0,017 ± 0,02 *
Mono-Macrofago	0,226 ± 0,42	0,087 ± 0,09 *
Erit. Jovem	0,167 ± 0,29	0,067 ± 0,28 *
Erit. Maduro	1,22 ± 1,24	0,417 ± 0,83 ***

Tabela 5 : Resultados em valores médio ± o desvio padrão do mielograma. ***Valores significativos para $p < 0,001$. * Valores significativos para $p < 0,05$, **n** representa número de animais avaliados.

5.5 CÉLULAS DO LAVADO PERITONEAL

A celularidade do lavado peritoneal dos animais desnutridos foi significativamente menor, também apresentaram redução no valor absoluto das células mononucleares (**Gráfico 4**).

Gráfico 4: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão do número de leucócitos, segmentados, linfócitos, e monócitos do lavado da cavidade peritoneal, camundongos do grupo controle (n=13), camundongos do grupo desnutridos. * Valores significativos para $p < 0,05$, n representa número de animais avaliados.

5.6 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA EM CÉLULAS PERITONEAIS

As células do lavado peritoneal, provenientes de camundongos do grupo controle e desnutridos foram coletados e marcado com: Dapi (azul), anti MAC-1 (verde) e F4/80 (Vermelho). As figuras abaixo mostram as imagens adquiridas em microscópio de fluorescência, As imagens mostram que as células de ambos grupos foram marcadas pela imunofluorescência, esses receptores de superfície

são marcadores para a linhagem macrófágica, portanto esse ensaio evidenciou que as células coletadas se tratam de macrófagos (**Figura 3**).

A-)

Figura 3. Fotomicrografia da imunofluorescência para marcação anti MAC-1 e F4/80 de células do lavado peritoneal de animais do grupo controle e desnutrido. A-) Aumento de 10x.

5.7 CITOMETRIA

A citometria de fluxo foi utilizada para determinar a fração de células peritoneais que apresentavam os antígenos de superfície para CD11b e TNFR-I. Os resultados mostraram menor expressão do receptor de TNF nas células provenientes dos camundongos do grupo desnutrido (**Gráfico 5**).

Gráfico 5: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão do número de células que apresentaram os marcadores CD11b⁺ e TNFR-I⁺ no lavado da cavidade peritoneal, camundongos do grupo controle (n=5), camundongos do grupo desnutridos (n=5). * Valores significativos para $p < 0,05$, n representa número de animais avaliados

5.8 BIOLOGIA MOLECULAR

O resultado da biologia molecular revelou que as células, obtidas da cavidade peritoneal, apresentam menor expressão de RNAm para o receptor de TNF nos camundongos do grupo desnutrido (**Gráfico 6**)

Gráfico 6: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão da expressão de RNAm do TNFR-I em células da cavidade peritoneal, camundongos do grupo controle e grupo desnutrido (n=5). *Valores significativos para $p < 0,05$. n representa número de animais avaliados.

5.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO, DAS PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO NFκB, ATIVADA POR TNF-α

Os resultados da expressão de proteínas obtidas a partir de culturas de macrófagos peritoneais, pela técnica de Western Blotting, demonstrou menor expressão do TNFR-I no grupo desnutrido, tanto nas células sem estímulo quanto nas células que receberam o estímulo de TNF-α, inferindo que a desnutrição proteica afeta a expressão desse receptor em macrófagos (**Gráfico7**).

Gráfico 7: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão da expressão do Receptor de TNF em macrófagos peritoneais sem estímulo e estimulados com TNF-α, camundongos do grupo controle e grupo desnutrido (n=4), camundongos do grupo controle e grupo desnutrido estimulados com TNF-α (n=4). n representa número de animais avaliados. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$).

A expressão de TRAF2, TRADD, RIP e IKK, não apresentaram diferenças entre os grupos, tanto nos animais sem estímulo quanto nos animais estimulados com TNF- α (**Gráficos 8, 9, 10 e 11**). Esses resultados mostram que a expressão dessas proteínas possivelmente venha a estar conservada em condição de desnutrição, nessas condições experimentais.

Gráfico 8: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão da expressão de TRAF2 em macrófagos peritoneais sem estímulo e estimulados com TNF- α , camundongos do grupo controle e grupo desnutrido (n=5), camundongos do grupo controle e grupo desnutrido estimulados com TNF- α (n=5). n representa número de animais avaliados.

Gráfico 9: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão da expressão de TRADD em macrófagos peritoneais sem estímulo e estimulados com TNF- α , camundongos do grupo controle e grupo desnutrido (n=5), camundongos do grupo controle e grupo desnutrido estimulados com TNF- α (n=5). n representa número de animais avaliados.

Gráfico 10: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão da expressão de RIP em macrófagos peritoneais sem estímulo e estimulados com TNF- α , camundongos do grupo controle e grupo desnutrido (n=4), camundongos do grupo controle e grupo desnutrido estimulados com TNF- α (n=4). **n** representa número de animais avaliados.

Gráfico 11: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão da expressão de IKK em macrófagos peritoneais sem estímulo e estimulados com TNF- α , camundongos do grupo controle e grupo desnutrido (n=5), camundongos do grupo controle e grupo desnutrido estimulados com TNF- α (n=5). **n** representa número de animais avaliados.

Não evidenciamos diferença estatisticamente significativa na expressão de IKB α total em nenhum dos grupos não estimulados ou estimulados com TNF- α (**Gráfico 12**), em contrapartida o IKB α fosforilado (p IKB α) mostrou-se aumentado no grupo desnutrido quando comparado ao seu respectivo grupo controle nas células não estimuladas ou após o estímulo com TNF- α (**Gráfico 13**).

Gráfico 12: Resultados em valores médios $\pm$ o desvio padrão da expressão de IKB α em macrófagos peritoneais sem estímulo e estimulados com TNF- α , camundongos do grupo controle e grupo desnutrido (n=5), camundongos do grupo controle e grupo desnutrido estimulados com TNF- α (n=5). **n** representa número de animais avaliados.

Gráfico 13: Resultados em valores médios $\pm$ o desvio padrão da expressão de p IKB α em macrófagos peritoneais sem estímulo e estimulados com TNF- α , camundongos do grupo controle e grupo desnutrido (n=5), camundongos do grupo controle e grupo desnutrido estimulados com TNF- α (n=5). **n** representa número de animais avaliados. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$).

Houve redução na expressão do NF κ B total no grupo controle estimulado com TNF- α , entretanto não houve diferença na expressão desse fator de transcrição no grupo controle e desnutrido não estimulados e no grupo desnutrido estimulado com TNF- α (**Gráfico 14**).

Gráfico 14: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão da expressão de NFκB em macrófagos peritoneais sem estímulo e estimulados com TNF- α , do grupo controle e grupo desnutrido (n=5), camundongos do grupo controle e grupo desnutrido estimulados com TNF- α (n=5). **n** representa número de animais avaliados. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$).

A expressão do fator de transcrição NFκB fosforilado (p NFκB) não apresentou diferença entre animais do grupo controle e desnutrido. Entretanto células estimuladas com TNF- α dos animais do grupo controle apresentaram aumento significativo da expressão de p NFκB quando comparado com células do respectivo grupo desnutrido (**Gráfico 15**).

Gráfico 15: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão da expressão de p NFκB em macrófagos peritoneais sem estímulo e estimulados com TNF- α , do grupo controle e grupo desnutrido (n=5), camundongos do grupo controle e grupo desnutrido estimulados com TNF- α (n=5). **n** representa número de animais avaliados. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$).

5.10 CITOCINAS

A quantificação de citocinas do sobrenadante da cultura de células peritoniais foi realizada através da técnica de ELISA, avaliou-se a produção de citocinas pró inflamatórias (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12) e a citocina anti inflamatória IL-10.

Houve diferença estatisticamente significativa na produção de IL-1 α e IL-1 β . A quantificação de IL-1 α mostrou que o controle, após estímulo de TNF- α , produziu uma quantidade maior de IL-1 α , quando comparado aos grupos controle e desnutrido não estimulados. O grupo desnutrido estimulado com TNF- α , produziu quantidades estatisticamente semelhantes aos demais grupos (**Gráfico 16**).

Gráfico 16: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão da produção de IL-1 α por macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulado com TNF- α , do grupo controle (n=10) e grupo desnutrido (n=09), camundongos do grupo controle (n=11) e desnutrido estimulado com TNF- α (n=11). n representa número de animais avaliados. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$).

O grupo controle, após estímulo de TNF- α , produziu uma quantidade maior de IL-1 β em relação aos demais grupos comparados, enquanto que os grupos controle e desnutrido não estimulados e o grupo desnutrido estimulado com TNF- α , produziram quantidade estatisticamente semelhantes de IL-1 β . (**Gráfico 17**).

Gráfico 17: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão da produção de IL-1 β por macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulado com TNF- α , do grupo controle e grupo desnutrido (n=13), camundongos do grupo controle e desnutrido estimulado com TNF- α (n=13). **n** representa número de animais avaliados. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$).

O perfil de produção de IL-6 em todos os grupos, estimulados ou não com TNF- α , foram estatisticamente semelhantes (**Gráfico 18**).

Gráfico 18: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão da produção de IL-6 por macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulado com TNF- α , do grupo controle (n=16) e grupo desnutrido (n=15), camundongos do grupo controle (n=16) e desnutrido estimulado com TNF- α (n=14). **n** representa número de animais avaliados. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos .

Ao avaliar a produção de IL-12 evidenciamos que, o grupo desnutrido e grupo controle (não estimulados) produzem quantidades semelhantes de IL-12. Em contrapartida, o grupo controle (após estímulo de TNF- α), produz maior

quantidade de IL-12, enquanto o grupo desnutrido não apresenta elevação da produção dessa citocina após o estímulo (**Gráfico 19**).

Gráfico 19: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão da produção de IL-12 por macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulado com TNF- α , do grupo controle (n=10), camundongos do grupo desnutrido (n=8) camundongos do grupo controle e desnutrido estimulado com TNF- α (n=10). **n** representa número de animais avaliados. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$).

Quanto a produção de IL-10, não foi observada diferenças estatísticas entre os grupos avaliados (**Gráfico 20**).

Gráfico 20: Resultados em valores médio $\pm$ o desvio padrão da produção de IL-10 por macrófagos peritoniais sem estímulo e estimulado com TNF- α , do grupo controle (n=14), camundongos do grupo desnutrido (n=14) camundongos do grupo controle (n=13) e desnutrido estimulado com TNF- α (n=14). **n** representa número de animais avaliados. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

6.0 DISCUSSÃO

A desnutrição proteica é um tipo de carência nutricional, que pode tornar o organismo vulnerável à microrganismos patogênicos, esse estado de vulnerabilidade talvez venha a ser explicado pelo fato de que as células de mamíferos requerem uma quantidade precisa de macro e micro nutrientes para o seu desenvolvimento e crescimento, uma dieta deficiente em um ou mais desses componentes essenciais limitam o crescimento celular e levam a um stress metabólico. Se esse stress permanecer pode danificar importantes componentes necessários para o funcionamento celular normal (ZEMPLI & DAKSHINAMURTI, 2005). Dessa forma nas últimas décadas muitos trabalhos foram realizados tentando compreender a inter-relação doença-desnutrição e, embora muitos conhecimentos tenham sido obtidos, os mecanismos envolvidos em seu todo, ainda estão por serem esclarecidos.

A literatura ainda é controversa acerca da resposta inflamatória em situações de desnutrição, o que pode ser devido à utilização de diferentes modelos experimentais. A literatura contém dados obtidos tanto em seres humanos – abrangendo crianças e adultos; indivíduos originários de locais onde a fome é endêmica e indivíduos voluntariamente desnutridos; pessoas hospitalizadas – onde frequentemente associam-se processos inflamatórios e/ou infecciosos das mais diversas origens; indivíduos severamente desnutridos, onde múltiplas deficiências nutricionais estão presentes ou ainda, em pacientes com doenças sistêmicas crônicas, nas quais os efeitos da doença e da terapia são difíceis de serem distinguidos daqueles devidos à deficiência nutricional.

Os trabalhos empregando experimentação em animais também apresentam um universo de situações: diferenças entre as espécies, isogenicidade ou não das espécies, sexo, idade, tipos e formas de desnutrição e os mais variados estímulos infecciosos. Dessa forma, torna-se muitas vezes difícil definir o perfil de como a desnutrição influencia algumas das respostas do organismo originando assim, dados conflitantes na literatura.

Em nosso trabalho induzimos um modelo de desnutrição proteica em camundongos Balb/c devido a característica isogênica dessa espécie, machos, com o intuito de evitar flutuações hormonais provocadas pelo ciclo estral das fêmeas. Os animais estavam com cerca de dois a três meses de idade, com esse tempo os animais são considerados adultos, e conseqüentemente já atingiram a maturidade hematopoética, sendo consenso que a hematopoese apresenta importantes alterações em função da idade tanto em animais quanto em humanos (BANNERMAN, 2007).

Optamos pela indução de uma desnutrição protéica devido a sua elevada endemicidade em países em desenvolvimento, como o Brasil, e que não coincidentemente, são as áreas em que predominam doenças infecciosas e altos índices de mortalidade. (WAITZBERG *et al.*, 1999; MARCOS, 2000; BRUNDTLAND, 2000; KEUSCH, 2003). Neste modelo de desnutrição as rações foram elaboradas considerando os teores de vitaminas, ácidos graxos e sais minerais necessários para fornecer uma dieta adequada, restringindo-se apenas a quantidade de proteína da ração ofertada (ração hipoprotéica) (REEVES, *et al.*, 1993) dessa forma os camundongos foram alimentados *ad libitum*. Na elaboração das rações utilizamos caseína como fonte proteica em ambas às rações (ração controle e ração hipoprotéica), apesar da caseína ser pobre em aminoácidos sulfurados, dessa forma intencionando suprir a necessidade dos aminoácidos sulfurados suplementou-se a ração com L-cistina proporcionalmente à quantidade de caseína (REEVES, 1993).

Nossos resultados mostraram que ambos os grupos de animais consumiram quantidades semelhantes de rações. Entretanto o consumo de proteína foi menor no grupo desnutrido em função da composição deficiente em proteína ração ofertada, uma vez que as rações foram formuladas apresentando-se isocalóricas, pudemos afirmar que os camundongos que consumiram a ração hipoproteica foram submetidos a uma desnutrição exclusivamente proteica.

Além do consumo de ração como parâmetro nutricional, foram avaliados outros critérios com a finalidade de verificar o perfil nutricional dos animais, ao longo do período de indução da dieta, os animais do grupo desnutrido perderam aproximadamente 20% do peso corpóreo inicial ao passo que os animais do grupo controle ganharam em média de 20% de peso no período supramencionado. Dessa forma o consumo de ração variação do peso corpóreo associados aos valores do hemograma, da concentração de proteínas totais, da albumina e da pré-albumina séricas, mostraram-se como bons indicadores na avaliação da desnutrição protéica

O tecido muscular esquelético é sensível à desnutrição protéica por ser um reservatório de proteína no organismo. Portanto, quando há déficit proteico na dieta, este tecido torna-se alvo de depleção (ALVES, *et. al.* 2008), o organismo pode utilizar-se da musculatura lisa do intestino como fonte de aminoácidos, mas a principal fonte de aminoácidos é proveniente do músculo esquelético durante o período de privação de proteínas na dieta (EMERY, 2005), dessa forma de maneira simplista explicaria a diminuição da massa corpórea observada em situações de desnutrição (MALAFAIA, 2010).

A diminuição da concentração sérica de proteínas com síntese predominantemente hepática vem a ser um bom índice laboratorial para a comprovação de casos de desnutrição proteica. A queda na concentração dessas proteínas indicaria diminuição da biossíntese hepática devido ao limitado suprimento de substrato energético e proteico, comumente associado à desnutrição. As principais proteínas associadas ao estado nutricional são: albumina sérica, pré-albumina, transferrina (CUPPARI, 2009), dessa forma a menor concentração nas proteínas totais, albumina e pré-albumina sérica apresentada pelos animais desnutridos corroboram para a confirmação de indução de uma desnutrição protéica.

O sangue é caracterizado por sua alta taxa de renovação, levando-se em consideração que as células deste tecido apresentam curto período de vida, bem

como sua flexibilidade e adaptabilidade a diferentes condições patofisiológicas. A constante produção de células depende do microambiente medular, sendo uma estrutura organizada que desempenha papel regulador, na fisiologia das células tronco hematopoéticas, além de diferentes fatores de crescimento, citocinas, ação hormonal, mediadores celulares de resposta inflamatória, e estado nutricional do indivíduo (BORELLI. *et al.*, 2004).

Dentre as alterações hematológicas manifestadas no sangue periférico dos camundongos submetidos à desnutrição proteica foi observado um quadro de anemia, esses dados vão de acordo com Borelli, *et al* (2007) onde evidencia que em situações de desnutrição a anemia está presente. O tecido hematopoético, como todos os tecidos que apresentam uma alta taxa de proliferação celular e renovação, tem uma alta demanda por nutrientes, dessa forma necessidade absoluta de proteínas pelo processo de hematopese pode, por si justificar a ocorrência de anemia e leucopenia, que são frequentemente encontrados em indivíduos desnutridos (BORELLI *et al.*, 2004; XAVIER; *et al.*, 2007).

Outras alterações hematológicas quantitativas, também evidenciadas em condições de desnutrição, como leucopenia (BORELLI, *et al.*, 1995; GARCIA, 1992) linfocitopenia (BORELLI, *et al.*, 1995; GARCIA, 1992; AUGUSTO, 1995; BARON, 1997) e neutropenia (BORELLI, *et al.*, 1995; BARON, 1997) são um reflexo do comprometimento dos órgãos linfo-hematopoéticos, particularmente do microambiente hematopoético (XAVIER, *et al.* 2007).

Os resultados dos hemogramas realizados dos camundongos mostram que os animais desnutridos estavam leucopenicos, com uma diminuição no valor absoluto de linfócitos, neutrófilos e monócitos circulantes, a diminuição dessas células do sangue periférico pode ser atribuída à hipoplasia medular presente nos animais desnutrido, além das alterações microambientais medulares e uma parada maturativa evidente de células hematopoéticas em situações de desnutrição (BORELLI *et al*, 2009). Nossos resultados mostraram alterações quantitativas na celularidade da medula óssea, onde evidenciamos diminuição

significativa no número de células totais e diferentes linhagens caracterizando uma hipoplasia medular, relatada em diversos trabalhos da literatura (SALVA *et al.*, 2012, VITURI *et al.*, 2001).

A aparente dificuldade da resposta leucocitária em processos infecciosos, em parte, ocorre devido à redução no compartimento de reserva da medula óssea (BLATT, BORELLI, 2004), pois a incidência CFU-GM (progenitor comum a granulócitos e macrófagos) está significativamente reduzida na desnutrição protéica (BORSATTO, 1999) com consequente alteração no processo de mobilização dos leucócitos do sangue para os tecidos (BORELLI, *et al.*, 1995, LANDGRAF, *et al.*, 2007), além de alterações dos mecanismos funcionais de resposta celular (BORELLI, *et al.*, 1995; NARDINELLI & BORELLI, 2001; VITURI, *et al.*, 2001; FOCK, *et al.*, 2003).

O aumento da regulação destas citocinas é um importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra infecção (ABBAS, *et al.*, 2012). Sabe-se que animais desnutridos apresentam hipoplasia severa de órgãos linfo-hematopoéticas e alterações funcionais em macrófagos (BORELLI, *et al.*, 1995; REDMOND, *et al.*, 1991), o que poderia interferir na susceptibilidade dos animais às infecções. Alterações na dieta e estado nutricional podem influenciar a resposta inflamatória e dificultar a resposta à infecção. Evidências indicam ainda que sempre ocorre leucopenia (BORELLI, *et al.*, 1995; CATCHATOURIAN, *et al.*, 1980), bem como diminuição das atividades bactericida e fungicida (NARDINELLI & BORELLI, 2001), nas situações em que a desnutrição não é associada a outras doenças.

Dados epidemiológicos e clínicos demonstram que a deficiência nutricional altera o comportamento do sistema imune, levando a uma condição que compromete sua resposta, alterando a capacidade fagocítica, a produção de anticorpos e citocinas, bem como alteração no sistema complemento o que aumenta o risco de infecção (CHANDRA, 2002; FOCK *et al.*, 2009). Assim, nesta condição, várias funções dos macrófagos encontram-se comprometidas (BORELLI, 1998, NARDINELLI & BORELLI, 2001; FOCK, 2005 e 2007). Nossos

resultados demonstraram que animais desnutridos apresentaram redução da celularidade do lavado peritoneal com redução no número de macrófagos, o que per si implica no comprometimento imunológico comumente observado em situações de desnutrição, uma vez que estas células são de importância fundamental no controle, na resolução dos processos infecciosos e na regulação da homeostase por serem iniciadoras da resposta inflamatória, por participarem do processo de reparação tecidual e por estarem envolvidas na resposta imune tanto inata quanto adaptativa (MELO *et al.*, 2008).

A ativação dos membros da família dos receptores do TNF pode levar a proliferação, diferenciação, sobrevivência ou apoptose das células. Esses efeitos biológicos envolvem efeitos benéficos na resposta imune e defesa do organismo frente à infecções. Em contrapartida alguns membros da família do TNF e TNFR podem exercer danos como em casos de sepsis, febre, caquexia bem como em doenças autoimune (artrite reumatoide, psoríase) (HEHLGANS & PFEFFER, 2005).

Para o efetivo funcionamento do sistema imunológico na manutenção da homeostase do organismo, além da quantidade necessária de células é imprescindível que as funções executadas por essas células estejam integras. Estudos realizados na década de 90 demonstraram que células deficientes em receptor de TNF, infectadas com parasitas intracelulares, apresentaram alta parasitemia e mortalidade das células (CASTANOS-VELEZ *et al.*, 1998, NASHLEANAS *et al.*, 1998), além disso, outros estudos com diferentes patógenos que desafiavam células ausentes em receptor de TNF, apontam para uma resposta imune deficiente frente a patógenos (EHLERS *et al.*, 2000, FLYNN *et al.*, 1995, PFEFFER *et al.*, 1993, ROTHE *et al.*, 1993). Contrapondo esses dados com os resultados obtidos em nosso trabalho, no qual evidenciamos menor expressão de TNFR-I nos animais desnutridos, podemos inferir que a capacidade das células em orquestrar uma resposta imunológica adequada seria ineficiente.

As citocinas, glicoproteínas que podem agir de forma estimulatório ou regulatório no sistema imunológico, exercem efeito de forma autócrina, parácrina

ou endócrina, atuando individualmente ou sinergicamente, possuem importante papel como mediadores da resposta imunológica, a produção é orquestrada por vias de sinalização, que são constituídas por proteínas específicas que cumprem um papel intrincado como propagadoras do sinal para a ativação dos fatores de transcrição (ABBAS, *et al* 2012).

Portanto em situações que as proteínas das vias de sinalização ou a produção de citocinas estão reduzidas pressupõe-se que a capacidade do organismo de produzir uma resposta imunológica adequada ou eficaz, mediante a presença de patógenos, pode estar prejudicada. Os resultados desse trabalho evidenciaram que as células provenientes dos camundongos desnutridos produzem menor quantidade IL-12 quando estimuladas com TNF- α . A IL-12 é uma citocina que estimula os linfócitos tipo T helper1 (TH1) a iniciar resposta imune específica e de memória. Esses resultados vão de acordo com Gonzales-Torrez, *et al.* (2013), que demonstraram menor produção de IL-12 em crianças acometidas por desnutrição e concomitantemente de infecção. Esse resultado nos leva a pensar que a concentração diminuída dessa citocina induziria a menor ativação para o desenvolvimento de resposta imune específica, e de certa forma justificaria a imunodeficiência frente a patógenos observada em organismo desnutridos (GONZALES-TORREZ, 2013).

As células do sistema imune possuem receptores capazes de reconhecer moléculas presente em patógenos, dentre elas o Tool Like Receptor-4 (TLR-4) e a proteína acessória CD14, esses receptor desempenham um papel fundamental no reconhecimento do LPS (lipopolissacarídeo), o principal componente da parede de bactérias gram negativas, e na ativação do NF κ B, posteriormente a esse mecanismo de ativação, fisiologicamente, as células produzem citocinas pró inflamatórias, (TNF- α , IL-1, IL-6) (VERSTREPEN, 2008), conseqüentemente essas citocinas ativarão seus respectivos receptores desencadeando respostas celulares que darão sequência a defesa do organismo. Destacando à resposta desencadeada pelo estímulo ao receptor de TNF, que induz a ativação do NF κ B e

consequentemente leva a produção de citocinas, dentre elas IL-1 IL-6 e IL-12 (CABAL-HIERRO, 2012).

Pesquisas anteriores em nosso grupo demonstraram que macrófagos provenientes de camundongos submetidos à desnutrição, expressam quantidades menores de TLR-4 e CD14, além disso, quando estimulados com LPS sintetizam menor concentrações de TNF- α (FOCK *et al.* 2007, 2010). Frente a esse achado a ação autocrina dessa citocina estaria comprometida, o que pudemos evidenciar nesse trabalho, onde células de animais desnutridos estimuladas com TNF- α , apresentaram menor fosforilação do fator de transcrição NF κ B, sendo esse efeito atribuído, em parte a menor expressão do receptor de TNF, inferindo informações que poderiam justificar, parcialmente, aspectos da imunodeficiência encontrada em organismos desnutridos.

Existe uma família de proteínas inibitórias do fator de transcrição NF κ B, fisiologicamente esse fator de transcrição encontra-se no citoplasma ligado a sua proteína inibitória (IKB α), diversos estímulos podem levar a ativação e fosforilação do IKB α , em seguida ocorre a ubiquitinação e consequente degradação da mesma, permitindo assim que o NF κ B fique livre para migrar para o núcleo e se ligar a região promotora no DNA. A quantificação do IKB α total mostrou que tanto o grupo controle quanto desnutrido tem expressão semelhante dessa proteína, em contrapartida e curiosamente a porção fosforilada do IKB α estava maior no grupo desnutrido quando comparado ao seu respectivo grupo controle. Esses resultados vão de acordo com Lima (2013), que também mostrou aumento da expressão de IKB α fosforilado em macrófagos peritoniais, frente a estímulo inflamatório, suplementado com glutamina, num modelo de desnutrição proteica. O que nos leva a acreditar que a desnutrição talvez esteja envolvida na modulação da ativação dessa proteína, porém os mecanismos que levam a essa ativação carecem de elucidação.

A expressão do NF κ B total, no grupo controle, estimulado com TNF- α mostrou-se diminuída, porém a sua porção fosforilada mostrou-se aumentada

quando comparado com animais desnutridos. Isso nos leva a crer que o estímulo de TNF- α foi experimentalmente capaz de ativar a via de sinalização do receptor de TNF, esse dado pode ainda ser confirmado pela produção das citocinas IL-1 α , IL-1 β , e IL-12 nos animais do grupo controle. Avaliando e confrontando a expressão de NF κ B, nos camundongos do grupo desnutrido, verificamos que a expressão desse fator de transcrição estava aumentada no grupo desnutrido, após estímulo de TNF- α , e interessante a porção fosforilada estava diminuída quando comparado com o grupo controle, além disso, foi evidenciada produção reduzida, das citocinas IL-1 β , e IL-12, no grupo desnutrido estimulado com TNF- α . Portanto esses resultados permitem inferir que a via de sinalização do NF κ B, estimulada pelo TNF- α nos animais desnutridos, não está sendo ativado na mesma maneira/intensidade do que nos camundongos controles.

Pesquisas recentes do nosso grupo demonstraram a diminuição na produção de citocinas pró inflamatórias, e um aumento de produção de IL-10 em camundongos desnutridos, essa última exerce efeito bloqueador do NF κ B, atuando como regulador negativo da ativação desse fator de transcrição (FOCK, 2007, 2010, LIMA, 2013). Nesses estudos, atribuiu-se, em parte a imunossupressão apresentada pelos camundongos desnutridos decorrente do aumento da produção de IL-10, o que possivelmente acarretaria o bloqueio do NF κ B exercido por essa citocina. Todavia, nesse trabalho, não foi evidenciado aumento na produção de IL-10, portanto, descarta-se a possibilidade da atuação de IL-10 como inibidor do NF κ B para explicar a redução da ativação desse fator de transcrição no grupo desnutrido.

Portanto, os dados evidenciados nesse trabalho estão de acordo com a literatura aonde evidenciamos comprometimento da resposta imune em condição de desnutrição

7.0 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que animais desnutridos apresentaram anemia, leucopenia, diminuição da celularidade medular e da celularidade da cavidade peritoneal, bem como menor expressão do receptor de TNF e consequentemente comprometimento da ativação do fator de transcrição NF κ B quando ativado com TNF α , o que reflete em menor produção de IL-1 β e IL-12 e em parte pode explicar aspectos do comprometimento da resposta imunológica, comumente observados em situações de desnutrição.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 560p.

ALVES, A.P.; DÂMASO, 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**, v.84, n.3, p.264-271, 2008.

ARAI, K.; LEE, F.; MIYAJIMA, A.; MIYAJIMA, S.; ARAI, N.; YOKOTA, T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. **Annual Review of Biochemistry**, v.59, p.783-836, 1990.

ASSENMACHER, M., SCHEFFOLD, A., SCHMITZ, J., SEGURA CHECA, J. A., MILTENYI, S., RADBRUCH, A. Specific expression of surface interferon-gamma on interferon gamma producing T-cells from mouse and man. *Eur. J. Immunol.* v.26, p.263-7, 1996.

AUGUSTO, A.P. Avaliação nutricional. In: ALVES, D.C.; MANNARINO, I.C.; GERUDE, M. **Terapia nutricional**. São Paulo: Atheneu, 1995. p.28-34.

BALDWIN Jr., A.S. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. **Annual Review of Immunology**, v.14, p.649-683, 1996.

BARNES, P.J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **New England Journal of Medicine**, v.336, n.15, p.1066-1071, 1997.

BAEUERLE, P.A.; BALTIMORE, D. NF-kappa B: ten years after. **Cell**, v.87, n.1, p.13-20, 1996

BANNERMAN, R.M., Hematology . In: FOSTER ,H.L. SMALL J. D.,FOX J.G. The mouse in biomedical research :normative biology, Husbandry, and models. (American College of Laboratory Animal Medicine series) **New York, Academic Press** v. 3 158- 163, 2007.

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

BAKKER, S.J.; REDDY, E.P. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. **Oncogene**, v.12, n.1, p.1–9, 1996.

BERKMAN, N., JOHN, M., ROESEMS, G., JOSE, P. J., BARNES, P. J., CHUNG, K. F. Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *J. Immunol.* v.155, p.4412-8, 1995.

BEUTLER, B.; BAZZONI, F. TNF, apoptosis and autoimmunity: a common thread? **Blood Cells, Molecules, & Diseases**, v.24, n.2, p.216-230, 1998.

BLATT, S.L. **Efeito da desnutrição protéica experimental na hemopoese medular**. São Paulo, 2004. 215p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

BOCHUD, P.Y.; CALANDRA, T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. **BMJ [British Medical Journal]**, v.326, n.7383, p.262-266, 2003. [Review].

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med.* v.174, p.1549-55, 1991.

BOLDIN, M.P.; METT, I.L.; VARFOLOMEEV, E.E.; CHUMAKOV, I.; SHEMER-AVNI, Y.; CAMONIS, J.H.; WALLACH, D. Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.1, p.387-391, 1995.

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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.42, n.6, p.523-530, 2009.

BORELLI, P.; BLATT, S.; PEREIRA, J.; MAURINO, B.B.; TSUJITA, M.; SOUZA, A.C.; XAVIER, J.G.; FOCK, R.A. Reduction of erythroid progenitors in protein energy malnutrition. **British Journal of Nutrition**, v.97, p.307-314, 2007

BORELLI, P.; BLATT, S.L.; ROGERO, M.M.; FOCK, R.A. Haematological alterations in protein malnutrition. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.26, n.1, p.49-56, 2004.

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

BORELLI, P.; SOUZA, I.P.; BOROJEVIC, R.; DAGLI, M.L.Z.; KANG, H.C. Protein malnutrition: some aspects of the in vitro adhesion of peritoneal mouse macrophages. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v.42, n.6, p.367-373, 1998.

BORSATTO, E.M. **Desnutrição proteica: avaliação *in vitro* da capacidade proliferativa de progenitores grânulo-monocíticos da medula óssea de camundongos**. São Paulo, 1999. 84p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

BRUNDTLAND, G.H. Nutrition and infection: malnutrition and mortality in public health. **Nutrition Reviews**, n.58, n.2, pt.2, p.S1-S4, disc.p.S63-73, 2000.

CALDER, P. C. fuel utilization by cells of the immune system. **Nutrition society**, v.54, p.65-82, 1995.

CAAMANO, J.; HUNTER, C.A. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.3, p.414-429, 2002.

CABAL-HIERRO, L.; LAZO, P. S. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 6, p. 1297–1305, 2012.

CASTANOS-VELEZ E, MAERLAN S, OSORIO LM, ABERG F, BIBERFELD P, ORN A, ROTTENBERG ME. Trypanosoma cruzi infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. **Infect Immun** v.66, p. 2960-8, 1998.

CATCHATOURIAN, R.; ECKERLING, G.; FRIED, W. Effect of short term protein deprivation on hemopoietic functions of healthy volunteers. **Blood**, v.55, p.625–628, 1980.

CHANDRA, R.K. Nutrition and the immune system from birth to old age. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.56, n.3, p.S73-S76, 2002.

CHANDRA, R.K. Nutrition and the immune system: an introduction. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.66, n.2, p.460S-463S, 1997.

CHEN, G.; GOEDDEL, D.V. TNF R-1 signaling: a beautiful pathway. **Science**, v.296, n.5573, p.1634-1635, 2002.

CHINNAIYAN, A.M.; O'ROURKE, K.; TEWARI, M.; DIXIT, V.M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. **Cell**, v.81, n.4, p.505-512, 1995.

CUPPARI, L. **Nutrição**: nas doenças crônicas não-transmissíveis. Barueri: Manole, 2009. 515p.

DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. **Practical haematology**. 8.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995, p.57-58.

DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; WOLFF, S.M.; BERNHEIM, H.; BEAUTLER, B.; CERAMI, A.; FIGARI, I.S.; PALLADINO, M.A.J.; O'CONNOR, J.V. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. **Journal of Experimental Medicine**, v.163, n.6, p.1433-1450, 1986.

DINARELLO, C. A. Interleukin 1. *Rev. Infect. Dis.* v.6, p.51-95, 1984.

DINARELLO, C. A., BERNHEIN, H.A., DUFF, G. W., HELE, H. V., NAGABHUSHAN, T. L., HAMILTON, N. C., COCEANI, F. Mechanisms of fever induced by recombinant human interferon. *J. Clin. Invest.* v.74, p.906-13, 1984.

DINARELLO, C. A., CANNON, J. G., WOLFF, S. M. New concepts on the pathogenesis of fever. *Rev. Infect. Dis.* v.10, p.168-89, 1988.

DE ANGELIS, R.C. Desnutrição calórico-protéica: má nutrição calórico-protéica. In: _____. **Fisiologia da nutrição**. 3.ed. São Paulo: Nobel, 1986. n.2, p.38-56.

DOUGHERTY GJ, McBRIDE WH (1989) Monocyte differentiation in vitro. In Zembala M, Asherson GL, eds. *Human Monocytes*. London, **Academic Press**, 49–58.

DOUMAS, B.T.; WATSON, W.A.; BIGGS, H.G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clinica Chimica Acta**, v.31, n.1, p.87-96, 1971.

EHLERS S, KUTSCH S, EHLERS EM, BENINI J, PFEFFER K. Lethal granuloma disintegration in mycobacteria-infected TNFRp55–/– mice is dependent on T cells and IL-12. **J Immunol.** v.165 p. 483–92, 2000.

EMERY, P.W. Metabolic changes in malnutrition. **Eye**, v.19, 1029–1034, 2005.

FAO. Food and Agriculture Organization **1.02 billion people hungry**. Roma, 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/news>. Acesso em: 14 nov. 2010.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Economic growth is necessary but not sufficient to accelerate reduction of hunger and malnutrition**. Roma, 2012. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/016/i3027e/i3027e00.htm>. Acesso em 30. jul. 2013.

FIORENTINO, D. F., ZLOTNIK, A., MOSMANN, T. R., HOWARD, M., O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* v.147, p.3815-22, 1991.

FLYNN JL, GOLDSTEIN MM, CHAN J, TRIEBOLD KJ, PFEFFER K, LOWENSTEIN CJ, SCHREIBER R, MAK TW, Bloom BR.et al. Tumor necrosis factor alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Immunity** v. 2, p. 561–72, 1995.

FOCK, R.A.; SILVA, O.P.P.S.; BORELLI, P. Desnutrição protéica modifica a síntese de óxido nítrico em macrófagos. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v.39, supl.3, p.115, 2003.

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**, v.40, p.105-114, 2007.

FOCK, R.A.; ROGERO, M.M.; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition alters the C3 complement factor in response to lipopolysaccharide in a murine model. **Nutrire**, v.34, n.1, p.131-142, 2009.

FOCK, R.A.; ROGERO, M.M.; VINOLO, M.A.R.; CURI, V.R.; BORGES, M.C.; BORELLI, P. Effects of protein-energy malnutrition on NF-kappaB signalling in murine peritoneal macrophages. **Inflammation**, v.33, n.2, p.101-109, 2010.

FONTOURA, C.S.M.; CRUZ, D.O.; LONDERO, L.G.; VIEIRA, R.M. Avaliação nutricional de paciente crítico. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.18, n.3, p.298-306, 2006.

FRIED, W.; SABONE, S.J.; BARONE, J.; ANAGNOSTOU, A. Effect of protein deprivation on hematopoietic Stem Cells and on peripheral blood counts. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.92, n.2, p.303-310, 1978.

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**, v.100, p.171-194, 2003.

GARCIA, P.B. **Inflamação em camundongos submetidos à desnutrição proteica**: análise da mobilização celular e da de hematopoese. São Paulo, 1992. 2v. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnica - Universidade de São Paulo.

GARG, A.K.; AGGARWAL, B.B. Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. **Molecular Immunology**, v.39, p.509-517, 2002.

GHOSH, S.; MAY, M.J.; KOPP, E.B. NF κ B and rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. **Annual Review of Immunology**, v.16, p.225-260, 1998.

GONZÁLEZ-TORRES, C.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, H.; MILIAR, A.; NÁJERA O.; GRANIEL J.; FIRO V.; ALVAREZ C.; BONILLA E. RODRIGUEZ L. Effect of Malnutrition on the Expression of Cytokines Involved in Th1 Cell Differentiation. **Nutrients**, v. 5, n. 3, p. 579-593, 2013.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reactions. **Journal of Biological Chemistry**, v.177, n.2, p.751-766, 1949.

GRAZIA CAPPIELLO, M., SUTTERWALA, F.S., TRINCHIERI, G., MOSSER, D.M., Ma, X. Suppression of IL-12 transcription in macrophages following Fc gamma receptor ligation. **J. Immunol.** 166, 4498-4506; 2001

GREENBERG, S.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis and innate immunity. **Current opinion in Immunology**, v.14, p.136-145, 2002.

GROSS, R.L.; NEWBERNE, M.P. Role of nutrition in immunologic function. **Physiological Reviews**, v.60, n.1, p.188–302, 1980.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726p.

HEHLGANS, T.; PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunology**, v.115, n.1, p.1–20, 2005.

HELLE, M.; BRAKENHOFF, J. P. J., De GROOT, E. R., AARDEN, L. A. Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. *Eur. J. Immunol.* v.18, p.957-9, 1988.

HELENIUS, M.; HÄNNINEN, M.; LEHTINEN, S.K.; SALMINEN, A. Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NFκB transcription factor in mouse cardiac muscle. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.28, n.3, p.487-498, 1996.

HELENIUS, M.; HÄNNINEN, M.; LEHTINEN, S.K.; SALMINEN, A. Changes associated with aging and replicative senescence in the regulation of transcription factor nuclear factor-kappa B. **Biochemical Journal**, v.318, pt.2, p.603-608, 1996.

HIRAYAMA, C.; WATANABE H.; NAKASHIMA, R.; NANBU, T.; HAMADA, A.; KUNIYASU, A.; NAKAYAMA, H.; KAWAGUSHI, T.; SAITO, H. Constitutive Overexpression of P-glycoprotein, Rather than Breast Cancer Protein or Organic Cation Transporter 1, Contributes to Acquisition of Imatinib-Resistance in K562 Cells. **Pharmaceutical Research**, vol 25, 4:827-835, 2008.

HSU, H.; XIONG, J.; GOEDDEL, D.V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NFκB activation. **Cell**, v.81, p.495–504, 1995.

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

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

JAHOOR, F.; BADALOO, A.; REID, M.; FORRESTER, T. Protein metabolism in severe childhood malnutrition. **Annals of Tropical Paediatrics**, v.28, p.87–101, 2008.

KEUSCH, G.T.; FARTHING, M.J.G. Nutrition and infection. **Annual Review of Nutrition**, v.6, p.131-154, 1986.

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

KEUSCH, G.T. Nutrition and infection. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. **Modern nutrition in health diseases**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. v.2, cap.69, p.1241-1258..

KOMATSU, W.; MAWATARI, K.; MIURA, Y.; YAGASHAKI, K.; Restoration by dietary glutamine of reduced tumor necrosis factor production in a low-protein-diet-fed rat model. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.71, n.2, p.352-357, 2007.

LADERACH,D., COMPAGNO,D., DANOS,O., VAINCHENKER,W., GALY,A. RNA interference shows critical requirement for NF-kappa B p50 in the production of IL-12 by human dendritic cells. **J. Immunol.** v.171, p.1750–1757, 2003.

LAMUS, E.R. Desnutrición e infecciones: importancia en la salud publica. **Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría**, v.41, p.75-93, 1975.

LANDGRAF, M.A.; TOSTES, R.D.E.C.; BORELLI, P.; ZORN, T.M.; NIGRO, D.; CARVALHO, M.H.; FORTES, Z.B. Mechanisms involved in the reduced leukocyte migration in intrauterine undernourishment. **Nutrition**, n.23, p.145-156, 2007.

LI, P.; SUN, M.; WOHLAND, T.; HO, B.; DING, J.L. The molecular mechanism of interaction between sushi peptide and Pseudomonas endotoxin. **Cellular & Molecular Immunology**, v.3, n.1, p.21-28, 2006.

LI, Q.; VERMA, I.M. NF-kappaB regulation in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v.2, n.10, p.725-734, 2002.

LIMA, F. S.; ROGERO, M. M.; RAMOS, M. C.; BORELLI, P.; FOCK, R. A. Modulation of the nuclear factor-kappa B (NFκB) signalling pathway by glutamine in peritoneal macrophages of a murine model of protein malnutrition. **European Journal of Nutrition**, v. 52, n. 4, p. 1343–1351, 2013.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ method. *Methods*, v25, 4:402-408, 2001.

LOPEZ-VALPUESTA, F. J., MYERS, R. D. Fever produced by interleukin-11 (IL-11) injected into the anterior hypothalamic pre-optic area of the rat is antagonized by indomethacin. *Neuropharmacology*. v.33, p.989-94, 1994.

MALAFAIA, G.; MARTINS, R.F.; SILVA, M.E. Avaliação dos efeitos, em curto prazo, da deficiência protéica nos parâmetros físicos e bioquímicos de

camundongos swiss. **REB: Revista Eletrônica de Biologia**, v.3, n.1, p.65-83, 2010.

MARCOS, A. Eating disorders: a situation of malnutrition with peculiar changes in the immune system. *Eur. J. Clin. Nutr.* v.54, p.S61-4, 2000.

MARINO M.W, DUNN A., GRAIL D., INGLESE M., NOGUCHI Y., RICHARDS E., JUNGBLUTH A., WADA H., MOORE M., WILLIAMSON B. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 94, p. 8093–8098, 1997.

MELO, J.F.; MACEDO, É.M.C.; SILVA, R.P.P.; VIANA, M.T.; SILVA, W.T.F.; CASTRO C.M.M.B. Efeito da desnutrição neonatal sobre o recrutamento celular e a atividade oxidante-antioxidante de macrófago em ratos adultos endotoxêmicos. **Revista de Nutrição**, v.21, n.6, p.683-694, 2008.

MENDES, S.T.O. **Efeito de cimentos obturadores endodônticos sobre a atividade de macrófagos M1 E M2**. Belo Horizonte, 2007. 109p. Tese de Doutorado - Faculdade de Odontologia - Universidade Federal de Belo Horizonte.

MIÑANO, F. J., SANCIBRIAN, M., VISZCAINO, M., PAEZ, X., DAVATELIS, G., FAHEY, T., SHERRY, B., CERAMI, A., MYERS, R. D. Macrophage inflammatory protein-1: unique action on the hypothalamus to evoke fever. *Brain Res. Bull.* v.24, p.849-52, 1990.

MONTEIRO, C. A. "A dimensão da pobreza, da fome e da desnutrição no Brasil". São Paulo, **Estudos Avançados**, vol. 9, n. 24, p. 195-207 1995.

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

NÁJERA, O.; GONZÁLEZ, C.; TOLEDO, G.; LÓPEZ, L.; ORTIZ, R. Flow cytometry study of lymphocyte well-nourished children with bacterial subsets in malnourished and infections. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.11, n.3, p.577, 2004.

NARDINELLI, L.; BORELLI, P. Protein calorie-malnutrition a decreased in the macrophage's respiratory burst capacity. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, n.37, p.51-60, 2001.

NASHLEANAS M, KANALY S, SCOTT P. Control of Leishmania major infection in mice lacking TNF receptors. **J Immunol** v.160, p.5506-13, 1998.

NEWSHOLME, P. ; CURI, R. ; CURI, T.C.P. ; MURPHY, C.J. ; GARCIA, C. ; MELO, M.P. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils : its importance in healthy and disease. **Journal of Nutritional and Biochemistry**, v.10, p. 316-324,1999.

O'NEILL, L.A.; KALTSCHMIDT, C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **Trends in Neurosciences**, v.20, n.6, p.252-258, 1997.

ORTIZ, R.; BETANCOURT, M. Cell proliferation in bone marrow cells of severely malnourished animals. **Journal of Nutrition**, v.144, p.472–476, 1984.

PFEFFER K, MATSUYAMA T, KUNDIG TM, WAKEHAM A, KISHIHARA K, SHAHINIAN A, WIEGMANN K, OHASHI PS, KRÖNKE M, MAK TW. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. **Cell**, v. 73, p.457–67, 1993.

PFIZENMAIER, K.; WAJANT, H.; GRELL, M. Tumor necrosis factors in 1996. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.7, n.3, p.271–277, 1996.

POWANDA, M.C.; BEISEL, W.R. Metabolic effects of infection on protein and energy status. **Journal of Nutrition**, v.133, p.322S-327S, 2003.

QUESENBERRY, P.J. Hemopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In: BEUTLER, E.; LICHTMSN, M.A.; COLLIER, B.S.; KIPPS, T.J. **Williams hematology**. 5.ed. New York: McGraw Hill, 1995. p.211-228.

REDMOND, H.P.; LEON, P.; LIEBERMAN, M.D.; HOFMANN, K.; SHOU, J.; REYNOLDS, J.; GOLDFINE, J.; JOHNSTON, R.B.; DALY, J.M. Impaired macrophage function in severe protein – energy malnutrition. **Archives of Surgery**, v.126, p.192–196, 1991.

REEVES, R.; MAGNUSON, N.S. Mechanisms regulating transient expression of mammalian cytokine genes and cellular oncogenes. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v.38, p.241-282, 1990.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the Ain-76 rodent diet. **Journal of Nutrition**, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.

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

RODRIGUEZ, L.; CERVANTES, E.; ORTIZ, R. Malnutrition and gastrointestinal and respiratory infections in children: a public health problem. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v8, n.4, p.1174-1205, 2011. [Review].

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancreáticos e estudo de diversos fatores. **Memórias do Instituto Butantan**, v.20, p.315-328, 1947.

ROTHER J, LESSLAUER W, LOTSCHER H, LANG Y, KOEBEL P, KÖNTGEN F, ALTHAGE A, ZINKERNAGEL R, STEINMETZ M, BLUETHMANN H. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. **Nature**, v.364, p.798–802 1993.

ROTHER, J.; MACKAY, F.; BLUETHMANN, H.; ZINKERNAGEL, R.; LESSLAUER, W. Phenotypic analysis of TNFR1-deficient mice and characterization of TNFR1-deficient fibroblasts *in vitro*. **Circulatory Shock**, v.44, n.2, p.51-56, 1994.

SALVA, S.; MERINO, M. C.; AGUERO, G.; GRUPPI, A.; ALVAREZ, S. Dietary Supplementation with Probiotics Improves Hematopoiesis in Malnourished Mice. (A. A. Ansari, Org.) **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31171, 2012.

SANJABI, S., HOFFMANN, A., LIOU, H.C., BALTIMORE, D., SMALE, S.T.; Selective requirement for c-Rel during IL-12 P40 gene induction in macrophages. **Proc.Natl.Acad. Sci.**, v.97, p.12705–12710; 2000.

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

SAWAYA, A.L. Desnutrição: consequências em longo prazo e efeitos da recuperação, nutricional. **Estudos Avançados**, v.20, n.58, p.147-158, 2006.

SCRIMSHAW, N.S. Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection. **Journal of Nutrition**, n.133, p.316S-321S, 2003.

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

SHETTY, P. malnutrition and undernutrition. **Medicine**, v.34, p. 524-529, 2006.

SOUZA, I.P.; KANG, H.C.; NARDINELLI, L.; BORELLI, P. Desnutrição protéica: efeito sobre o espalhamento, fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoneais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n.2, p.143-151, 2001.

TEWARI, M.; DIXIT, V.M. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.7, p.3255-3260, 1995.

UNANUE ER, ALLEN PM. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. **Science**. 1987 May 1;236(4801):551-7. Review.

VAN HERREWEGHE, F.; FESTJENS, N.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P. Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.67, n.10, p.1567–1579, 2010.

VAN DER POLL, T.; LOWRY, S.F. Endogenous mechanisms regulating TNF and IL-1 during sepsis. In: VINCENT, J.L., ed. **Yearbook of intensive care and emergency medicine**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.385.

VERSTREPEN, L.; BEKAERT, T.; CHAU, T.-L.; TAVERNIER J; CHARLOT A.; BEYAERT R. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF- κ B: variations on a common theme. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 19, p. 2964–2978, 2008.

VITURI, C.L.; BORELLI, P.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRETIN, A.Z. Alteration of the bone marrow in extracellular matrix in mice undernourished. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n.33, p.889-895, 2001.

WAITZBERG, D. L., PLOPPER, C., TERRA, R. M. Postoperative total parenteral nutrition. *World J. Surg.* v.23, p.560-4, 1999.

WALKER, F.; NICOLA, N.A.; METCALF, D.; BURGESS, A.W. Hierarchical down-modulation of hemopoietic growth factor receptors. **Cell**, v.43, p.269-276, 1995.

WARD, P.G. A micro-Kjeldahl procedure for field use. **Journal of Medical Laboratory Technology**, v.20, p.191-195, 1963.

WEAVER CT, UNANUE ER. The costimulatory function of antigen-presenting cells. **Immunol Today**. 1990 Feb;11(2):49-55

XAVIER, J.G.; FAVERO, M.E.; VINOLO, M.A.R.; ROGERO, M.M.; DAGLI, M.L.Z.; ARANA-CHAVEZ, V.E.; BOROJEVIC, R.; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. **Histology and Histopathology**, v.22, n.6, p.651-660, 2007.

XIAO, W. Advances in NF κ B signaling transduction and transcription. **Cellular & Molecular Immunology**, v.1, n.6, p.425-435, 2004.

ZAMPRONIO, A. R., MELO, M. C. C., SILVA, C. A. A., PELÁ, I. R., HOPKINS, S. J., SOUZA, G. E. P. A pre-formed pyrogenic factor released by lipopolysaccharide stimulated macrophages. *Mediat. Inflam.* v.3, p.365-73, 1994.

ZEMPLINI, J.; DAKSHINAMURTI, K. **Nutrients and cell signaling**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. p.193. (Oxidative stress and disease, 15).

ZUCAS, S.M.; LAJOLO, F.M.; BARBÉRIO, J.C. Gaiola metabólica para ratos, testada por meio de zinco radiativo. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.7, n.2, p.353-359, 1969.

9.0 Anexo I: Certificado Comitê de Ética de Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF/66/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **"Avaliação da via sinalizadora do fator de transcrição NFkB ativada pelo TNFalfa em um modelo de carência protéica"** (Protocolo CEUA/FCF/316), de responsabilidade da pesquisadora **Dalila Cunha de Oliveira** sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 04 de julho de 2011.

São Paulo, 06 de julho de 2011.

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