UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓICAS

AMANDA RABELLO CRISMA

Avaliação da hemopoese e da resposta imune inata mediada por macrófagos em camundongos submetidos à recuperação nutricional após desnutrição protéica

São Paulo

2010

AMANDA RABELLO CRISMA

Avaliação da hemopoese e da resposta imune inata mediada por macrófagos em camundongos submetidos à recuperação nutricional após desnutrição protéica

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor

Área de concentração: Análises Clínicas e Toxicológicas

Orientador: Prof.ª Dr.ª Primavera Borelli

São Paulo

2010

Amanda Rabello Crisma

Avaliação da hemopoese e da resposta imune inata mediada por macrófagos em camundongos submetidos à recuperação nutricional após desnutrição protéica

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profª. Drª. Primavera Borelli
orientador/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

_____
3º. examinador

_____
4º. examinador

São Paulo, _____ de _____de 2010.

DEDICATÓRIA

À toda minha família, que sempre entendeu minha necessidade de conhecimento e meu sonho de ser cientista

Agradecimentos

À Karina Nakajima, por ser minha melhor amiga durante todos esses anos (e por tantos outros que ainda estão por vir) e sempre ficar ao meu lado, compartilhando as alegrias e as tristezas, tanto no laboratório, quanto fora dele.

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

À Graziela Batista da Silva, amiga e companheira das horas boas e ruins, tanto no laboratório, quanto no trânsito com o fretado

Aos amigos Marco Aurélio Ramirez Vinolo, Ricardo Ambrósio Fock e Marcelo Macedo Rogero, por toda ajuda no laboratório, mas principalmente por mostrarem que amizade e união são essenciais no trabalho.

À Dulce Marta Schimiegel, que apesar do pouco tempo de convivência, compartilhou conhecimento e alegrias.

Às estagiárias Aline Ramos, Tatiana Mota, Gabriela Demarchi e Tathiana Capeto pela amizade e por estarem sempre dispostas a ajudar nos experimentos, mostrando que trabalho em equipe é fundamental.

À Martina Rudinick e Luciane Faine, amigas do Laboratório de Bioquímica por todos os cafés, risadas, conselhos, desabafos, enfim, por serem grandes amigas em todos os momentos.

À Luciana Simão do Carmo, companheira de pós-graduação, pela amizade e ajuda no laboratório.

À Mariana Koëche, pelo tempo que passou conosco compartilhando a correria da vida de pós-graduando.

À Ivanir Pires, técnica do laboratório de Bioquímica da Nutrição, pela paciência e disponibilidade em ensinar, tirar dúvidas e ajudar nas análise e no que for necessário.

Ao Prof. Antonio Altair Oliveira (Táta), que, com muita alegria e bom humor, transmitiu seus conhecimentos e suas lições de vida.

À Prof.ª Primavera Borelli, por me dar uma chance como estagiária e acreditar no meu potencial como pesquisadora, contribuindo durante todos esses anos para o meu crescimento científico, intelectual e pessoal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À CAPES/CNPq pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Afinal, o que é o homem diante da Natureza? Nada, se comparado ao Infinito. Tudo, se comparado ao Nada. Um meio entre Nada e Tudo.

Blaise Pascal

RESUMO

CRISMA, A.R. **Avaliação da hemopoese e da resposta imune inata mediada por macrófagos em camundongos submetidos à recuperação nutricional após desnutrição protéica.** 2010. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A desnutrição protéico-energética (DPE) afeta mais de 1 bilhão de pessoas no mundo, principalmente crianças, idosos e pacientes hospitalizados. Ela provoca alterações metabólicas e hormonais, além de afetar o tecido hemopoético. O comprometimento da hemopoese provoca anemia e leucopenia, modificando a resposta imune inata e adquirida do organismo. Dessa forma, é comum a associação entre desnutrição e infecção, levando ao comprometimento do tratamento e aumento da morbidade e mortalidade de indivíduos hospitalizados. Após a recuperação nutricional, é relatada a reversão das alterações bioquímicas e hormonais, bem como das alterações na hemopoese e na resposta imune. Porém, muitos resultados são controversos, existindo dúvidas quanto à reversibilidade das alterações. Assim, nos propusemos a avaliar os efeitos da recuperação nutricional nos parâmetros bioquímicos, hormonais, hematológicos e imunológicos em modelo murino de desnutrição. Os animais desnutridos apresentaram perda de peso significativa, redução de proteínas totais, albumina, glicose, insulina e IGF-1, bem como aumento de glutamina plasmática, glutamina sintetase muscular e corticosterona. Houve redução dos parâmetros hepáticos e musculares, bem como alteração na sensibilidade à insulina, evidenciada pelos testes de OGTT e ITT. Todas as alterações descritas caracterizam o quadro de desnutrição. Após a recuperação nutricional, alguns parâmetros foram normalizados, mas as concentrações de glicose, insulina e IGF-1 permaneceram reduzidas. Da mesma forma, as alterações na concentração de DNA hepático e na sensibilidade à insulina permaneceram nos animais renutridos. A pancitopenia periférica e hipocelularidade da medula óssea e do baço observadas nos animais desnutridos foram revertidas após a renutrição. A avaliação de macrófagos peritoniais mostrou reversão parcial do comprometimento da capacidade e

adesão e espraiamento, bem como da atividade fungicida nos animais renutridos. A produção de peróxido de hidrogênio continuou baixa após a recuperação nutricional, enquanto a produção de óxido nítrico voltou a aumentar. O comprometimento da produção de citocinas pró-inflamatórias decorrente da desnutrição não foi completamente revertido, visto que, em camundongos Swiss Webster, somente a produção de TNF-α retornou ao normal, enquanto em camundongos C56BL/6J a produção de nenhuma citocina foi restabelecida. A avaliação da via de sinalização do fator de transcrição NFκB mostrou alteração na expressão de MyD88, TRAF-6, IkKβ e IkBα em animais desnutridos. Após a recuperação nutricional, algumas dessas proteínas não retornaram ao normal. Os animais desnutridos também apresentaram comprometimento da ativação de NFκB, que não foi normalizada após a recuperação nutricional. Sendo assim, é possível afirmar que o retorno a uma dieta normoprotéica não é suficiente para reverter todas as alterações causadas pela desnutrição.

Palavras-chave: Recuperação nutricional, hemopoese, resposta imune

ABSTRACT

CRISMA, A.R. **Evaluation of hematopoiesis and innate immune response mediated by macrophages in mice submitted to nutritional recovery after protein malnutrition.** 2008. Thesis (Doctorate) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Protein-energy malnutrition (PEM) affects more than 1 billion people worldwide, mainly children, elderly and hospitalized patients. It causes metabolic and hormonal changes, besides affecting hematopoietic tissue. Impaired hematopoiesis causes anemia and leukopenia, modifying innate and acquired immune response of the organism. Thus, it is common the association between malnutrition and infection, leading to impaired treatment and increasing morbidity and mortality in hospitalized patients. After nutritional recovery, it is reported reversal of biochemical and hormonal changes, as well as, reversal of changes in hematopoiesis and immune response. However, many results are controversial, and there are doubts about the reversibility of the changes. Thus, we proposed to evaluate the effects of nutritional recovery biochemical, hormonal, haematological and immunological parameters in a murine model of malnutrition. The malnourished animals showed significant weight loss, reduction in total protein, albumin, glucose, insulin and IGF-1, as well as increased plasma glutamine, corticosterone and muscle glutamine synthetase. There was a reduction in muscle and liver parameters as well as change in insulin sensitivity, evidenced by the tests of OGTT and ITT. All modifications described characterize the malnutrition. After nutritional recovery, there was normalization of some parameters, but the concentrations of glucose, insulin and IGF-1 remained low. Likewise, changes in hepatic DNA concentration and insulin sensitivity remained in renourished animals. Peripheral pancytopenia and hypocellularity in bone marrow and spleen observed in malnourished animals were reversed after refeeding. The evaluation of peritoneal macrophages showed partial reversal of impairment of adhesion and spreading ability, as well as fungicidal activity in animals renourished. The hydrogen peroxide production

remained low after nutritional recovery, while nitric oxide production increased again. Impaired production of proinflammatory cytokines due to malnutrition was not completely reversed, whereas in Swiss Webster mice, only the production of TNF-α returned to normal, whereas in C56BL/6J mice no cytokine production was restored. The assessment of the signalling pathway of transcription factor NFκB showed alterations in the expression of MyD88, TRAF-6 IkKβ and IkBα in malnourished animals. After nutritional recovery, some of these proteins didn't return to normal. Malnourished animals also showed impaired activation of NFκB, which wasn't normalized after nutritional recovery. Therefore, it is possible to say that the return to a normal diet is not enough to reverse all the changes caused by malnutrition.

Key-words: Nutritional recovery, hematopoiesis, immune response

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de sinalização do fator de transcrição NFκB **30**

Figura 2. Delineamento experimental **51**

Figura 3. Resultados do consumo de ração, proteínas e água de camundongos Swiss Webster dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **73**

Figura 4. Resultados do consumo de ração, proteínas e água de camundongos C57BL/6J dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **74**

Figura 5. Resultados da variação de peso corporal em função do tempo e variação final do peso corporal de camundongos Swiss Webster e C57BL/6J dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido.....**76**

Figura 6. Resultados da concentração sérica de proteínas totais e albumina e de camundongos Swiss Webster e C57BL/6J dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **79**

Figura 7. Resultados da concentração sérica de glicose de camundongos Swiss Webster dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **81**

Figura 8. Resultados da concentração sérica de insulina dos camundongos Swiss Webster dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **81**

Figura 9. Resultados da concentração sérica de glicose e área sob a curva da glicemia ao longo do tempo dos camundongos Swiss Webster dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **83**

Figura 10. Resultados do K_{itt} dos camundongos Swiss Webster dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **83**

Figura 11. Resultados da concentração sérica de IGF-1 dos camundongos Swiss Webster dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **85**

Figura 12. Resultados da concentração sérica de corticosterona dos camundongos Swiss Webster dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **85**

Figura 13. Resultados da concentração plasmática de glutamina, glutamina muscular e atividade de glutamina sintetase de camundongos Swiss Webster dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **87**

Figura 14. Resultados do conteúdo total de proteína, DNA e RNA do músculo gastrocnêmio de camundongos Swiss Webster dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **90**

Figura 15. Resultados do conteúdo total de proteína, DNA e RNA do fígado de camundongos Swiss Webster dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **93**

Figura 16. Resultados do número de hemácias, volume hematócrito e hemoglobina de camundongos Swiss Webster dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **95**

Figura 17. Resultados do número de hemácias, volume hematócrito e hemoglobina de camundongos C57BL/6J dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **96**

Figura 18. Resultados do número de leucócitos de camundongos Swiss Webster e C57BL/6J dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **99**

Figura 19. Resultados do número de células nucleadas da medula óssea de camundongos Swiss Webster e C57BL/6J dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **102**

Figura 20. Resultados do número de células nucleadas do baço de camundongos Swiss Webster e C57BL/6J dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **106**

Figura 21. Resultados do número de células nucleadas peritoniais de camundongos Swiss Webster e C57BL/6J dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **110**

Figura 22. Resultados da capacidade de adesão de células peritoniais de camundongos Swiss Webster nos tempos de 2 horas e 24 horas dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **112**

Figura 23. Resultados da capacidade de espraiamento de células peritoniais de camundongos Swiss Webster nos tempos de 2 horas e 24 horas dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **113**

Figura 24. Resultados da concentração de peróxido de hidrogênio produzida por macrófagos de camundongos Swiss Webster dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **118**

Figura 25. Resultados da produção de óxido nítrico por camundongos C57BL/6J em 24 horas e 48 horas e camundongos Swiss Webster em 48 horas dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **119**

Figura 26. Resultados da concentração de IL-1β, IL-6, TNF-α e IL-10 produzidas por macrófagos de camundongos Swiss Webster dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **124**

Figura 27. Resultados da concentração de IL-1β, TNF-α e IL-10 produzidas por macrófagos de camundongos C57BL/6J dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **126**

Figura 28. População de macrófagos expressando CD14 de camundongos C57BL/6J dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **128**

Figura 29. População de macrófagos expressando TLR4/MD2 de camundongos C57BL/6J dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **129**

Figura 30. Ativação do fator NFκB em camundongos C57BL/6J dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **132**

Figura 31. Expressão das proteínas MyD88, TRAF-6, IkKβ, IkBα, NFκB, pNFκB, pIkBα e relação NFκB fosforilado/NFκB e IκBα fosforilado/ IκBα total de camundongos C56BL/6J dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido **137**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição percentual da ração **46**

Tabela 2 – Composição da mistura salínica **47**

Tabela 3 – Composição da mistura vitamínica **48**

Tabela 4 – Rações e grupos experimentais **51**

Tabela 5 – Valores de escore para atividade fungicida **66**

Tabela 6 – Anticorpos monoclonais **67**

Tabela 7 – Imunofenotipagem **67**

Tabela 8 – Peso corporal ao longo do protocolo experimental: Swiss Webster e C57BL/6J **77**

Tabela 9 – Peso absoluto e relativo do músculo gastrocnêmio esquerdo **89**

Tabela 10 – Peso absoluto e relativo do fígado **92**

Tabela 11 – Índices hematimétricos e porcentagem de reticulócitos de camundongos Swiss Webster **97**

Tabela 12 – Índices hematimétricos de camundongos C57BL/6J **97**

Tabela 13 – Contagem relativa de leucócitos no sangue periférico: Swiss Webster ..**100**

Tabela 14 – Contagem absoluta de leucócitos no sangue periférico: Swiss Webster .**100**

Tabela 15 – Distribuição relativa e absoluta das populações medulares: Swiss Webster **103/104**

Tabela 16 – Peso absoluto e relativo do baço de camundongos Swiss Webster **106**

Tabela 17 – Distribuição relativa e absoluta das populações esplênicas: Swiss Webster **107/108**

Tabela 18 – Distribuição relativa e absoluta das populações da cavidade peritonial ..**110**

Tabela 19 – Porcentagem de fagocitose e atividade fungicida de *Candida albicans* não opsonizadas e opsonizadas **115**

LISTA DE SIGLAS

BFU-E: Burst-forming units-erythroid (unidades formadoras de colônias eritróides)

CFU-GM: Colony-forming unit granulocyte-monocyte (unidade formadora de colônia grânulo-monocítica)

CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média

CO_2: Dióxido de carbono

DNA: Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)

DPE: Desnutrição protéico-energética

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

EIA: Enzyme immune assay (ensaio imunoenzimático)

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

EMSA: Eletrophoretic mobility shift assay (ensaio de retardo de banda por mobilidade eletroforética)

GH: Growth hormone (hormônio do crescimento)

GM-CFC: Granulocyte-monocyte colony-forming cells (células formadoras de colônias grânulo-monocíticas)

HCM: Hemoglobina corpuscular media

IFN-γ: Interferon gama

IGF-1: Insulin-like growth factor-1 (fator de crescimento semelhante à insulina)

IκB: Inhibitor kappa B (inibidor kappa B)

IκBα: Inhibitor kappa B alpha (inibidor kappa B alfa)

IKKα:I kappa B kinase alpha (I kappa B quinase alfa)

IKKβ:I kappa B kinase beta (I kappa B quinase beta)

IKKγ:I kappa B kinase gama (I kappa B quinase gama)

IL-1: Interleucina-1

IL-1β: Interleucina-1 beta

IL-2: Interleucina-2

IL-3: Interleucina-3

IL-4: Interleucina-4

IL-6: Interleucina-6

IL-8: Interleucina-8

IL-10: Interleucina-10

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

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

ITT: Insulin tolerance test (teste de tolerância à insulina)

LBP: LPS binding protein (proteína ligante do LPS)

LPS: Lipopolissacarídeo

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

MEC: Matriz extra-celular

MyD88: Myeloid differentiation 88 (fator de diferenciação mielóide 88)

NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide

NaF: Fluoreto de sódio

NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide

NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase

NFκB: nuclear factor kappa B (fator de transcrição nuclear kappa B)

NK: Natural killer

OGTT: Oral glucose tolerance test (teste de tolerância oral à glicose)

PAF: Fator ativador plaquetário

PBS: Phosphate buffer solution (solução tampão de fosfato)

PMSF: Phenylmethylsulphonyl fluoride (fluoreto de fenilmetilssulfonila)

RNA: Ribonucleic acid (ácido ribonucléico)

SDM: Standard deviation of media (desvio padrão da média)

SHN: Soro homólogo normal

TGF-β: Transforming growth factor beta (fator de transformação do crescimento beta)

TLR4: Toll-like receptor 4

TNFα: Tumor necrosis factor alpha (fator de necrose tumoral alfa)

TRAF-6: TNF-α receptor associated factor 6 (fator associado ao receptor de TNF-α 6)

VCM: Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 21
1.1 Desnutrição protéico-energética 21
1.2 Alterações hematológicas e imunológicas 23
1.3 Citocinas e desnutrição 26
1.4 Sinalização ativada por LPS: via do fator de transcrição NFκB 27
1.5 Metabolismo protéico e desnutrição 31
1.6 Glutamina 33
1.7 Hormônios e desnutrição 34
1.7.1 Insulina, glucagon, hormônio do crescimento (GH) e glicocorticóides 34
1.7.2 Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) 35
1.8 Recuperação nutricional 38
2. OBJETIVO 43
3. MATERIAL E MÉTODOS 44
3.1 Animais 44
3.2 Rações 45
3.3 Delineamento experimental 49
3.3.1 Indução da desnutrição 49
3.3.2 Recuperação nutricional 50
3.4 Obtenção de sangue 52
3.4.1 Sangue total 52
3.4.2 Soro 52
3.4.3 Plasma 52
3.5 Realização do hemograma e contagem de reticulócitos 53
3.6 Determinação de proteínas totais e albumina séricas 53
3.7 Determinação da concentração sérica de glicose 53
3.8 Determinação de insulina, IGF-1 e corticosterona séricos 54
3.9 Determinação da concentração plasmática de glutamina 54
3.10 Análises teciduais: fígado e músculo 54
3.10.1 Obtenção de fígado e músculo gastrocnêmio 54
3.10.2 Proteína, DNA e RNA tecidual 55

3.10.2.1 Extração de proteína, DNA e RNA 55
3.10.2.2 Determinação de proteína tecidual 56
3.10.2.3 Determinação de RNA tecidual 56
3.10.2.4 Determinação de DNA tecidual 56
3.10.3 Glutamina 57
3.10.3.1 Extração de glutamina muscular 57
3.10.3.2 Determinação de glutamina ,muscular 57
3.10.4 Glutamina sintetase 57
3.10.4.1 Extração de glutamina sintetase muscular 57
3.10.4.2 Atividade de glutamina sintetase 58
3.11 Teste de tolerância oral à glicose (OGTT) 58
3.12 Teste de tolerância à insulina (ITT) intraperitonial 59
3.13 Obtenção de células da medual óssea (MO) e realização do mielograma 59
3.14 Obtenção de células do baço e realização do esplenograma 59
3.15 Obtenção de células da cavidade peritonial 60
3.16 Cultura de células peritoniais 61
3.17 Avaliação da síntese de citocinas 61
3.18 Avaliação da síntese de óxido nítrico 61
3.19 Avaliação da síntese de peróxido de hidrogênio 62
3.20 Teste de adesão de células da cavidade peritonial 62
3.21 Teste de espraiamento de células da cavidade peritonial 63
3.22 Teste de fagocitose e atividade fungicida, *in vitro*, de células peritoniais 64
3.22.1 Obtenção de soro homólogo normal (SHN) 64
3.22.2 Preparo e opsonização da suspensão de *Candida albicans* ...64
3.22.3 Obtenção da suspensão de células peritoniais 65
3.22.4 Ensaio de fagocitose e atividade fungicida 65
3.23 Avaliação da expressão do receptor de LPS 66
3.24 Avaliação da via de ativação do fator de transcrição NFκB 68
3.24.1 Obtenção de células peritoniais e obtenção do lisado de proteínas 68
3.24.2 Quantificação da concentração de proteínas 68

3.24.3 Preparo do gel de poliacrilamida e realização da eletroforese 69
3.24.4 Transferência de proteínas para a membrana de PVDF 69
3.24.5 *Immunoblotting* 69
3.24.6 Revelação com sistema quimioluminescente 70
3.25 Determinação da ativação do fator de transcrição NFκB 70
3.25.1 Obtenção de células peritoniais e execução do EMSA 70
3.26 Análise estatística 71
4. RESULTADOS 72
4.1 Concentração de proteína das rações 72
4.2 Avaliação do estado nutricional 72
4.2.1 Análise do consumo de ração, proteínas e água 72
4.2.2 Análise do peso corporal 75
4.2.3 Avaliação da concentração sérica de proteínas totais e albumina 78
4.2.4 Avaliação da concentração sérica de glicose e insulina 80
4.2.5 Avaliação da tolerância oral à glicose (OGTT) e da tolerância à insulina (ITT) 82
4.2.6 Avaliação da concentração sérica de IGF-1 84
4.2.7 Avaliação da concentração sérica de corticosterona 84
4.2.8 Análise do metabolismo da glutamina 86
4.2.8.1 Glutamina plasmática 86
4.2.8.2 Glutamina muscular 86
4.2.8.3 Atividade de glutamina sintetase muscular 86
4.2.9 Análise de proteína, DNA e RNA totais em fígado e músculo gastrocnêmio 88
4.2.9.1 Gastrocnêmio 88
4.2.9.2 Fígado 91
4.3 Avaliação hematológica 94
4.3.1 Hemograma 94
4.3.1.1 Eritrograma 94
4.3.1.2 Leucograma 98
4.3.2 Mielograma 101
4.3.3 Esplenograma 105

4.4 Avaliação de macrófagos peritoniais 109
4.4.1 Células nucleadas do lavado peritonial 109
4.4.2 Avaliação da capacidade de adesão 111
4.4.3 Avaliação da capacidade de espraiamento 111
4.4.4 Avaliação da fagocitose e atividade fungicida 114
4.4.5 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio 116
4.4.6 Avaliação da produção de óxido nítrico 116
4.4.7 Avaliação da produção de citocinas 120
4.4.8 Avaliação do receptor de LPS 127
4.4.9 Avaliação da ativação do fator de transcrição NFκB 130
4.4.10 Avaliação da via de sinalização do fator de transcrição NFκB 130
5. DISCUSSÃO 138
5.1 Linhagens utilizadas 138
5.2 Aspectos nutricionais 138
5.3 Aspectos hematológicos 147
5.4 Aspectos imunológicos 150
6. CONCLUSÃO 158
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....160

1. INTRODUÇÃO

1.1 Desnutrição protéico-energética

Desnutrição é um termo genérico, usado na referência a distúrbios alimentares como obesidade, subnutrição ou deficiência específica de nutrientes (MARGETTS et al., 2003). Entre os tipos de subnutrição, encontra-se a desnutrição protéico-energética (DPE), definida pela Organização Mundial da Saúde como "conjunto de condições patológicas que advêm da falta, em proporções variadas, de proteínas e calorias" (WHO, 1973). A DPE apresenta uma variedade de alterações clínicas decorrentes da deficiência protéica e energética, alterações estas que normalmente são agravadas por infecções (OLIVEIRA; MARCHINI, 1998). As manifestações clínicas da DPE dependem do grau e gravidade da deficiência protéico-energética, da causa e duração da deficiência, bem como da idade do indivíduo e da associação ou não com outras doenças. Dentre as formas clínicas, as mais graves são *Kwashiorkor* e *Marasmus* (WATERLOW, 1971). *Kwashiorkor* decorre de uma carência protéica com ingestão normal de carboidratos, enquanto o *Marasmus* está relacionado com a deficiência prolongada de proteínas e carboidratos. *Kwashiorkor* e *Marasmus* são os dois extremos da deficiência protéico-energética, porém muitos estados intermediários decorrentes de vários graus de privação protéica combinados com diversos graus de deficiência calórica são reconhecidos (DE ANGELIS, 1986). Enquanto a mortalidade no *Marasmus* é baixa, o *Kwashiorkor* e o *kwashiorkor*-marasmático apresentam altas taxas de mortalidade e morbidade, além de serem de difícil tratamento (JAHOOR et al., 2008).

Definir os vários graus de DPE em adultos é uma tarefa difícil e com limitações, em parte porque muitas definições são baseadas nas síndromes encontradas em crianças de países subdesenvolvidos. Várias definições têm sido propostas para caracterizar os quadros de DPE, sendo que as mais recentes propõem considerar essa como uma síndrome *kwashiorkor*-marasmática, com evidências clínicas e laboratoriais de redução da ingestão de proteínas e energia, além de edema, diminuição de proteínas viscerais e a existência de um

estado pró-inflamatório sistêmico (JENSEN et al., 2009). Nenhuma avaliação simples pode caracterizar de forma adequada o quadro de DPE, sendo necessário um conjunto de medidas que avaliem o consumo diário de nutrientes, os parâmetros bioquímicos e os índices antropométricos (MARGETTS et al., 2003). Assim, a ausência de uma definição aceita mundialmente que reflita a fisiopatologia da DPE e suas consequências impede o diagnóstico e o tratamento adequados (MEIJERS et al., 2010).

Em geral, a desnutrição pode ser caracterizada pela causa, tipo, nutriente, grau, consequências, duração e efeitos. A causa pode ser tanto primária, ocasionada por uma dieta inadequada, ou secundária, causada por absorção ou utilização inadequada, aumento das necessidades ou excreção excessiva e, ambas, podem ocorrer simultaneamente (OLIVEIRA; MARCHINI, 1998; STINNET, 1983).

O quadro de desnutrição é em geral de evolução relativamente lenta. Do ponto de vista fisiopatológico as carências nutricionais se desenvolvem segundo uma seqüência determinada. A falta de ingestão de determinado nutriente faz com que o organismo lance mão de suas reservas na tentativa de manter a homeostase. Estas reservas são maiores ou menores de acordo com os diferentes nutrientes. Uma vez esgotadas essas reservas surgem alterações bioquímicas seguidas de distúrbios funcionais e, só depois, surgem alterações ou lesões anatômicas. Isso explica porque é pouco comum a manifestação clínica com lesão anatômica das moléstias carenciais (COTRAN, 2000).

A DPE é o tipo mais frequente de desnutrição, afetando mais de 1 bilhão de pessoas no mundo (FAO, 2009). Apresenta incidência significativa em crianças, idosos e pacientes portadores de neoplasias, doenças crônicas, sob quimioterapia ou pacientes sob alimentação parenteral (KEUSCH, 2003; NOVA et al., 2002; WAITZBERG et al., 1999). A DPE é observada em quase todo o mundo, tanto em países desenvolvidos como subdesenvolvidos, sendo encontrada em maiores proporções nos países da África, Ásia e América Latina (WHO, 2000). Dados da FAO (2009) mostram, na América Latina, aumento de 12,8% no percentual de pessoas desnutridas em relação a 2008. Em 2001, um terço da população brasileira era considerada mal nutrida, sendo que, deste total, 37% eram trabalhadores

rurais sem terra e 9% das crianças contidas nesta parcela da população morriam antes de completar um ano de vida (FAO, 2001). Atualmente, cerca de 4% de crianças abaixo dos 5 anos apresentam algum tipo de desnutrição, e, aproximadamente 14% apresentam retardo no crescimento (WHO, 2010). Embora as desordens nutricionais sejam particularmente comuns em países subdesenvolvidos, sabe-se que ocorrem também em países desenvolvidos (CHANDRA, 1991; MARGETTS et al., 2003; OLIVEIRA; MARCHINI, 1998; VISVANATHAN, 2003), afetando principalmente os idosos (MARGETTS et al., 2003, VISVANATHAN, 2003) e os pacientes que apresentam neoplasias, doenças crônicas ou que estão sob quimioterapia. Em geral, a DPE atinge cerca de 20-50% dos pacientes admitidos no hospital e compromete a resposta ao tratamento, aumentando a morbidade e a mortalidade (SEGURA et al., 2005; VAN BOKHORST-DE VAN DER SCHUEREN, 2005).

1.2 Alterações hematológicas e imunológicas

A hemopoese é um fenômeno complexo e altamente regulado, que ocorre em diferentes locais ao longo de seu desenvolvimento (fisiologicamente, em humanos, após o nascimento ocorre essencialmente na medula óssea). Em camundongos, além da medula óssea, o baço também constitui-se em importante local de hemopoese após o nascimento.

A produção de células sangüíneas depende do microambiente medular, uma estrutura organizada de forma a regular a fisiologia da célula-tronco hemopoética (COWLING; DEXTER, 1995; McKENNA; COTTER, 1997). O microambiente é constituído por células sangüíneas em diferentes estados de maturação, células estromais, matriz extra-celular (MEC) e por substâncias solúveis (nutrientes, hormônios e citocinas) (EAVES et al., 1991; MAYANI et al., 1984). Estes componentes são responsáveis pela regulação da hemopoese, juntamente com mediadores plasmáticos e celulares da resposta inflamatória e com o estado nutricional do indivíduo (ATHENS et al., 1961; BORELLI et al., 2007; VITURI et al., 2000). Entre esses mediadores encontra-se o TGF-β, que controla proliferação e diferenciação celular. Em muitos tipos celulares esse fator induz apoptose e reduz a

proliferação, favorecendo a diferenciação celular (ISUFI et al., 2007). A regulação da hemopoese ocorre através de interações moleculares entre a célula-tronco hemopoética e os constituintes do microambiente medular, que controlam o balanço entre a auto-renovação da célula tronco e sua diferenciação (LEMISCHKA; MOORE, 2003; WILSON; TRUMPP, 2006).

Na DPE são observadas comprometimento da resposta imune celular e humoral, redução da atividade do sistema complemento, diminuição na atividade microbicida dos fagócitos e modificações da hemopoese (BORELLI et al., 1995, 2001; FRIED, 1978; ORTIZ; BETANCOURT, 1984). Isso ocorre devido à elevada taxa de renovação celular e à síntese ativa de proteínas dos tecidos linfo-hemopoéticos centrais e tecidos linfóides periféricos (CHANDRA, 1981). Em indivíduos adultos, normais, a produção diária de células sanguíneas é da ordem de 1-2 $x10^{10}$ células/dia/kg de peso. Estudos em nosso laboratório têm demonstrado anemia e leucopenia, bem como a existência de fibrose esplênica subcapsular, alterações nos centros germinativos esplênicos e hipoplasia na medula óssea (BORELLI et al., 1995, 1999, 2007; BORSATTO; XAVIER, 1999, 2007). Além disso, temos observado redução dos processos de migração e mobilização celular para os focos inflamatórios (BORELLI et al., 1995; GARCIA, 1992), ocorrendo alterações na capacidade de adesão e espraiamento, fagocitose e atividade fungicida (SOUZA et al., 2001), e no *burst* respiratório de macrófagos peritoniais (BORELLI; NARDINELLI, 2001), bem como na produção de citocinas (FOCK et al., 2007).

Observações de caráter epidemiológico e experimental evidenciam maior susceptibilidade de indivíduos desnutridos a processos infecciosos (CHANDRA, 1981; BROSTOFF et al., 1991; GROSS; NEWBERNE, 1980; SCHAIBLE; KAUFMANN, 2007), sendo a associação entre desnutrição e infecção responsável pelo aumento da morbidade e mortalidade, especialmente em crianças (ANSTEAD et al., 2003; BEISEL, 1977; VICTORIA; HERNANDEZ, 1990; SCHAIBLE; KAUFMANN, 2007). As formas pelas quais a desnutrição compromete os mecanismos de defesa do indivíduo ainda não estão totalmente esclarecidos. Em parte isso pode ser explicado por uma modificação na liberação de

citocinas na desnutrição, afetando não só a resposta inflamatória, mas toda a regulação do sistema imune (FOCK et al., 2007; KEUSCH, 1986; KLASING, 1988), e em parte pela própria redução da hemopoese (BORELLI et al., 1995; XAVIER et al., 2007).

O tecido hemopoético apresenta elevada exigência de nutrientes devido a sua alta taxa de renovação e proliferação celular, o que justificaria, por si só, a alta incidência de anemia e leucopenia observadas em indivíduos desnutridos. Entretanto, na literatura são encontradas observações conflitantes como a ocorrência de leucocitose, que pode ser devida à presença de um quadro multicarencial freqüentemente associado a outros processos patológicos. Alterações quantitativas como leucopenia, alterações na produção de eritrócitos, linfocitopenia e neutropenia são, pelo menos em parte, reflexo do comprometimento dos órgãos linfo-hemopoéticos em condições de desnutrição (BARON, 1997; FOCK et al., 2007; XAVIER et al., 2007).

Mudanças na eritropoese ocorrem como parte dos efeitos da DPE no homem. Muitos estudos descrevem um grau moderado de anemia em decorrência da deficiência de ingestão protéica (AKMAN et al., 2004; ASCHKENASY, 1975; WATERLOW, 1996). Em geral, as hemácias são normocíticas e normocrômicas, a contagem de reticulócitos é aproximadamente normal e, na medula óssea, a linhagem eritróide aparece diminuída (MEHTA, 2004). A redução da eritropoese pode ser conseqüência direta tanto da diminuição do consumo de proteínas, como da redução da estimulação da medula óssea.

Assim como a redução da eritropoese, o comprometimento na produção das demais células mielóides em indivíduos desnutridos não parece ser uma conseqüência apenas da DPE, mas sim reflexo de modificações dos fatores de estimulação que controlam a proliferação, a diferenciação e a liberação destas células (BORELLI et al., 1995; VITURI et al., 2000).

Na literatura são encontrados dados bastante restritos a respeito dos precursores hemopoéticos na desnutrição. Alguns trabalhos têm demonstrado, em ratos, redução do número de células tronco (DEO et al., 1975) e alterações na dinâmica da população de células tronco no baço e na medula de camundongos (BELL et al., 1976). Foi relatada por

Borsato (1999) a redução no número de CFU-GM em culturas de progenitores hemopoéticos obtidos da medula óssea de camundongos desnutridos. Mais recentemente demonstramos que ocorre depleção de células primitivas $CD34^+$, progenitores eritróides (Ter 119^+) e linfóides ($CD2^+/CD3^+$) e que a anemia não é ferropriva e nem devido à falta de eritropoitina (BORELLI et al., 2007). Demonstramos ainda, que na desnutrição o número de células hemopoéticas com atividade proliferativa é significativamente menor e que as modificações histológicas observadas na matriz extracelular da medula óssea pode estar comprometendo a fisiologia da célula tronco hemopoética (XAVIER et al., 2007).

1.3 Citocinas e desnutrição

Citocinas são substâncias que desempenham importante papel na coordenação da resposta inflamatória a vários estímulos externos e internos. Há duas classes de citocinas: pró-inflamatórias e regulatórias. As citocinas pró-inflamatórias são essenciais para iniciar a defesa contra o patógeno. Entre elas, podemos citar TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6 e IL-8. As citocinas regulatórias modulam negativamente o processo inflamatório através da supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias. Nessa classe de citocinas encontram-se IL-4, IL-10 e IL-3 (ELIZABETH, 2009).

A maioria das citocinas é produzida por linfócitos T e macrófagos durante a fase efetora da imunidade inata e adquirida, apresentando função imediata no controle da proliferação e diferenciação celular, apoptose e na ativação ou inibição de células efetoras (ABBAS, 2000). A ação das citocinas pode ser antagônica, sinérgica ou redundante. Algumas citocinas podem influenciar a síntese de outras ou mesmo mediar seus efeitos. A capacidade de uma citocina de regular a produção de outra é importante no controle da resposta inflamatória (ABBAS, 2000).

Dentre as citocinas liberadas durante a fase inicial da resposta inflamatória, as principais são TNF-α, IL-1β e IL-6. TNF-α induz a liberação de outras citocinas como IL-1 e

IL-6, além de ativar fagócitos mononucleares (COTRAN, 2000). IL-1 é uma das principais desencadeadoras do processo inflamatório, sendo a principal responsável pela ativação de outras células. IL-6 tem como principal função estimular a síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado, além de atuar no hipotálamo para indução de febre (ABBAS, 2000).

Embora a resposta imune seja um componente vital da resposta do hospedeiro, ela pode ser fatal se não for altamente regulada. Entre os mecanismos conduzidos para controlar o processo inflamatório, a ação de IL-10 desempenha um papel fundamental. Os mecanismos pelos quais essa citocina exerce sua atividade não são bem conhecidos, porém sua atividade antiinflamatória é através da inibição de muitas respostas funcionais de macrófagos e neutrófilos, como produção de espécies reativas de oxigênio, fagocitose e síntese de citocinas pró-inflamatórias em resposta ao LPS (MALEFYT, 1991).

Comprometimento da resposta inflamatória é uma das características de déficits de proteína e energia. Em parte, esse comprometimento decorre do aumento da produção de IL-10, conhecida por ter capacidade altamente imunossupressora (HILLYER et al., 2006). No entanto, estudos mostrando alteração da produção de citocinas pró-inflamatórias em decorrência da desnutrição mostram resultados controversos. Redução da produção de citocinas como TNF-α, IL-1 e IL-6 tem sido descrita por diversos autores (ANSTEAD et al., 2003; FOCK et al., 2007), enquanto outros descrevem aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias (AZEVEDO et al., 2005; DEWAN et al., 2009).

1.4 Sinalização ativada por LPS: via do fator de transcrição NFκB

Lipopolissacarídeo (LPS) é o principal componente da parede celular de bactérias gram-negativas e um dos mais potentes ativadores microbianos da inflamação. Ele ativa monócitos e macrófagos, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12. Macrófagos também secretam uma série de outros mediadores

biológicos em resposta ao LPS, como fator ativador plaquetário (PAF), prostaglandinas, enzimas e espécies reativas de oxigênio (MIYAKE, 2003).

A despeito de sua potente atividade imunoestimulatória, os mecanismos pelos quais o LPS é reconhecido são complexos e pouco compreendidos (MIYAKE, 2003). Grande progresso tem sido feito na identificação das moléculas que constituem o complexo de reconhecimento do LPS, sendo identificados como componentes centrais CD14, TLR4 e MD-2 (FUJIHARA et al., 2003). Quando o LPS é liberado da parede celular das bactérias gram-negativas, tende a formar agregados que tem pequena capacidade de ativar o sistema imune, sendo necessária a solubilização dessa molécula para ativar macrófagos (FUJIHARA et al., 2003). Isso é conseguido através da ligação do LPS à proteína ligante de LPS (LBP) presente no sangue. Essa proteína transfere monômeros de LPS para o CD14 presente na membrana celular, que também é ligante desse fragmento microbiano (FUJIHARA et al., 2003; MIYAKE, 2003, 2004). Células que não possuem CD14 ancorado à membrana celular também são capazes de responder ao LPS porque a forma solúvel deste receptor presente na circulação pode substituir sua forma ligada à membrana na ligação com o fragmento microbiano (FUJIHARA et al., 2003). A formação do complexo LPS/CD14 (solúvel ou ancorado à membrana celular) reduz significativamente a concentração de LPS necessária à ativação de macrófagos, sugerindo um papel importante do CD14 na amplificação do sinal desencadeado pelo LPS (FUJIHARA et al., 2003; MIYAKE, 2004). No entanto, embora seja de grande importância para o reconhecimento do LPS, o CD14 ancorado à membrana celular carece de domínio transmembrana, não sendo capaz de, sozinho, transduzir o sinal ativado por LPS (PALSSON-McDERMOTT et al., 2004).

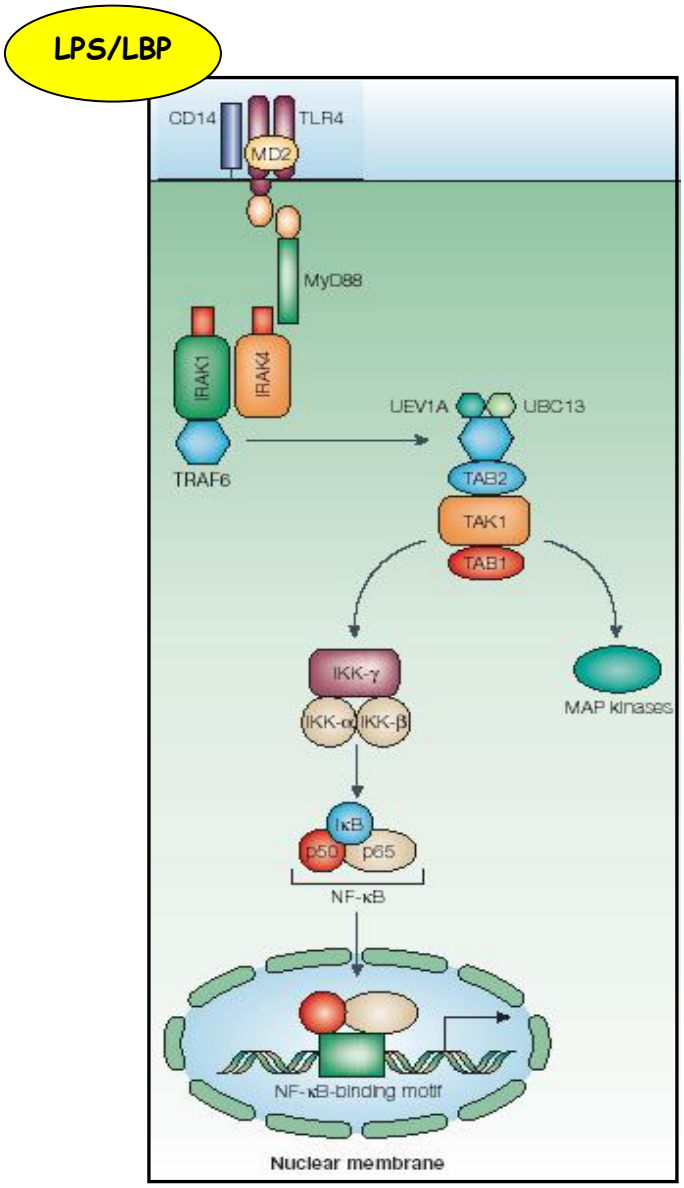
Atuando em conjunto com o CD14 na transdução do sinal gerado pelo LPS está a molécula TLR4 (MIYAKE, 2004), sendo que estudos apontam esse como o verdadeiro receptor para LPS (PALSSON-McDERMOTT et al., 2004). Neste caso, tanto o CD14 ancorado à membrana quanto sua forma solúvel teriam apenas o papel de apresentar o LPS ao complexo TLR4/MD2. TLR4 faz parte de uma família de receptores do sistema imune que reconhece padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), desempenhando papel

fundamental na resposta inflamatória do indivíduo. LPS é considerado um PAMP de bactérias gram-negativas. O lipídio A representa a porção conservada e é responsável pelos efeitos pró-inflamatórios do LPS, enquanto o antígeno O varia com a espécie bacteriana (FUJIHARA et al., 2003). No reconhecimento do LPS pela célula, destaca-se, ainda a proteína MD-2, que atua como adaptadora extracelular na ativação de TLR4, sendo essencial para a sinalização do sinal gerado por LPS (PALSSON-McDERMOTT et al., 2004).

A principal via de sinalização ativada pela ligação do LPS ao complexo CD14, TLR4 e MD-2 se utiliza de proteínas adaptadoras para transduzir o sinal, sendo que uma delas é o MyD88. Dessa forma, estudos tem mostrado que a resposta ao LPS mediada pelo CD14 pode ser dividida em duas categorias: uma resposta a curto prazo dependente de MyD88 e uma resposta tardia independente de MyD88. Os eventos subsequentes a ativação da via MyD88 dependente levam à ativação do fator de transcrição NFκB e vias da MAPK. De forma simplificada, a ativação de MyD88 leva ao recrutamento e associação de IRAK-1 e IRAK-4 ao complexo receptor. Ocorre a autofosforilação de IRAK-1, que causa sua dissociação deste complexo e associação à molécula TRAF-6. Esta se torna ativada e se associa com TAB-2, ativando a MAPK quinase TAK1, que está constitutivamente associada à sua proteína adaptadora TAB1. Neste ponto, TAK1 atua como ativador do NFκB através da ativação de um complexo conhecido como "sinalossomo". Este complexo é constituído pelas proteínas inibitórias IKKα e IKKβ, junto com uma proteína estrutural denominada IKKγ (também conhecida como NEMO). A ativação desse complexo promove a fosforilação de uma família de proteínas inibitórias (sendo a principal delas IκBα), resultando em sua ubiquitinação e degradação (FUJIHARA et al., 2003; MIYAKE, 2003, 2004; PALSSON-McDERMOTT et al., 2004).

A família de fatores de transcrição NFκB é composta por cinco membros (p65 (REL-A), REL-B, REL-C, p50 e p62), que atuam como homo ou heterodímeros. Os dímeros são mantidos no citoplasma em sua forma inativa por moléculas da família IκB. A ativação deste fator de transcrição envolve a fosforilação e proteólise das proteínas IκB e a concomitante translocação dos dímeros para o núcleo (PALSSON-McDERMOTT et al., 2004). Uma vez no

núcleo, NFκB se liga a seus elementos responsivos do DNA, promovendo a transcrição de genes que codificam para a produção de citocinas, óxido nítrico sintase indutível, entre outros (Figura 1).



AKIRA et al., 2004, modificado

Figura 1. Via de sinalização do fator de transcrição NFκB ativada por LPS.

1.5 Metabolismo protéico e desnutrição

As proteínas provenientes da dieta fornecem aminoácidos ao organismo. Estes aminoácidos terão dois destinos principais: anabolismo e catabolismo. Uma vez na circulação, os aminoácidos são captados pelo músculo esquelético, pelos rins e por outros tecidos, onde entram na síntese de proteínas, visto que eles não são armazenados na forma livre no organismo. Esse processo, chamado de anabolismo, requer que todos os aminoácidos necessários estejam disponíveis ao mesmo tempo. Assim, severa restrição de aminoácidos irá inibir a síntese de proteínas via limitação de substrato (OLIVEIRA; MARCHINI, 1998; ZIEGLER; FILER, 1996). Já o catabolismo corresponde à degradação de proteínas que acontece continuamente em todos os tecidos (OLIVEIRA; MARCHINI, 1998).

Nos estágios iniciais a DPE está associada a uma diminuição nas taxas de síntese protéica e de degradação. Acredita-se que essas alterações estejam relacionadas a um mecanismo adaptativo para conservar energia e aminoácidos quando seu suprimento é escasso. Isso aumentaria a eficiência de utilização do nitrogênio e minimizaria as perdas (WYKES et al., 1996). Durante o estresse fisiológico devido a uma infecção, o *turnover* protéico aumenta, sendo que o aumento da degradação protéica providenciaria aminoácidos para a síntese de proteínas de fase aguda. Esta depleção de aminoácidos é capaz de afetar as funções celulares, reduzir o consumo de oxigênio nos tecidos e diminuir a concentração de glicose no sangue (COTRAN et al., 2000). Diversos estudos relatam que as taxas de renovação de proteína são maiores no *Kwashoirkor* do que no *Marasmus* (MANARY et al., 1998). Já em um quadro de desnutrição crônica, o organismo não consegue manter os mecanismos de adaptação que minimizam as perdas de nitrogênio. Dessa forma, há redução nas taxas de renovação de proteína, ou seja, há diminuição da síntese e aumento do catabolismo, levando a um comprometimento do crescimento e do desenvolvimento dos tecidos de todo o organismo. Assim, verifica-se comprometimento da síntese protéica no músculo esquelético, fígado, mucosa do jejuno e no plasma (WYKES et al., 1996).

O músculo esquelético é o maior reservatório de proteína do organismo e, portanto, o compartimento mais afetado pela DPE. Citocinas e hormônios desempenham importante papel na regulação do metabolismo muscular. Assim, alterações hormonais e de citocinas decorrentes da DPE acabam promovendo catabolismo muscular, inibindo a síntese protéica, desencadeando apoptose e influenciando a contratilidade e funcionalidade do músculo. Essa resposta metabólica de fase aguda também afeta o estado nutricional por aumentar o gasto energético de repouso e os requerimentos energéticos. A eficiência da utilização de proteínas diminui e, consequentemente aumenta as necessidades protéicas oriundas da alimentação. Aminoácidos são exportados do músculo para o fígado, onde contribuem para aumentar a neoglicogênese (JENSEN et al., 2009).

A DPE também promove redução da síntese de albumina, sendo a principal causa dos quadros de hipoalbuminemia (KOJIMA et al., 2008; KOPPLE, 1994). Por causa disso, a albumina é considerada um dos principais marcadores do estado nutricional, sendo que BISTRIAN (1974) foi um dos primeiros a descrever a alta prevalência da hipoalbuminemia entre pacientes hospitalizados. A concentração plasmática de albumina é decorrente da taxa de síntese, do catabolismo e do volume de distribuição. Além da DPE, várias outras condições afetam a concentração de albumina, como estados inflamatórios, expansão do volume plasmático e aumento das perdas de albumina (TJIONG et al., 2007). Por causa disso, e também pelo fato de sua meia-vida ser relativamente longa (cerca de 20 dias), seu uso como marcador nutricional tem sido questionável (GEHRING et al., 2007; JENSEN et al., 2009). Em muitos trabalhos a pré-albumina tem substituído a albumina como marcador nutricional devido à sua meia-vida ser menor, porém, visto que sua concentração plasmática é influenciada pelos mesmos fatores que influenciam a concentração da albumina, seu uso como marcador nutricional também tem sido questionado (JENSEN et al., 2009).

1.6 Glutamina

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e no tecido muscular sendo utilizada em altas taxas por células de divisão rápida, incluindo neutrófilos, linfócitos e macrófagos (NIEMAN; PEDERSEN, 1999; PITHON-CURI et al., 2004; ROGERO et al., 2002). Uma alta proporção da glutamina da dieta é utilizada pelas células do intestino. Desse modo, para atender à elevada demanda de glutamina pelos diversos tecidos e órgãos, este aminoácido deve ser sintetizado pelo organismo. Quantitativamente, o mais relevante tecido de síntese, estoque e liberação de glutamina é o músculo esquelético, que apresenta atividade das enzimas glutamina sintetase e aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (ROGERO; TIRAPEGUI, 2000; ROGERO et al., 2004). A síntese e o transporte da glutamina no músculo esquelético são influenciados pelos glicocorticóides. A atividade da glutamina sintetase é aumentada durante estados catabólicos e tratamento com glicocorticóides. Além disso, verifica-se que durante processo catabólicos, a corticosterona provoca aumento do efluxo de glutamina a partir do músculo esquelético, da atividade da enzima glutamina sintetase muscular, da degradação protéica e da captação de glutamina pelo fígado e rins (WALSH et al., 1998).

Verifica-se que o estresse fisiológico induzido pela desnutrição protéica está associado ao aumento da concentração sérica de corticosterona em animais, a qual promove diminuição da massa magra e, conseqüentemente, da capacidade de manutenção da glutaminemia. Sendo assim, a diminuição da glutaminemia pode diminuir a capacidade funcional de neutrófilos, macrófagos e linfócitos uma vez que esse aminoácido é considerado indispensável para leucócitos. A determinação das concentrações plasmáticas de glutamina e corticosterona são relevantes, uma vez que ambos atuam na modulação da resposta imune (BOELENS et al., 2001; ROGERO; TIRAPEGUI, 2003; ROGERO et al., 2006; WELLS et al., 1999)

1.7 Hormônios e desnutrição

1.7.1 Insulina, glucagon, hormônio do crescimento (GH), glicocorticóides

Em indivíduos saudáveis, rápidas adaptações ocorrem entre as refeições para manter a glicemia normal na ausência de ingestão de alimento, semelhantes às que ocorrem nos estágios iniciais da adaptação à desnutrição. A diminuição da concentração plasmática da glicose plasmática leva à redução da concentração de insulina. Ocorre aumento da concentração plasmática de glucagon, que, na presença de baixa concentração de insulina, promove glicogenólise e gliconeogênese hepáticas. À medida que as reservas de glicogênio hepático vão sendo depletadas, a glicemia vai novamente diminuindo. Além do glucagon, ocorre também a liberação de epinefrina, do hormônio do crescimento (GH) e de cortisol, que possuem ação sinérgica ao glucagon. Os triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo são mobilizados e liberados como ácidos graxos livres, que constituem fonte de energia para alguns tecidos. Estas mudanças ocorrem para aumentar a oxidação de ácidos graxos, diminuindo a proteólise tecidual. Em humanos, após 30 dias de desnutrição, os rins se tornam um importante órgão gliconeogênico (DEGROOT, 1995).

Na DPE, as concentrações plasmáticas de insulina estão geralmente diminuídas, elevando-se durante a recuperação nutricional. Alguns estudos encontraram diferenças significativas entre a concentração de insulina tanto no *Marasmus* quanto no *Kwashiorkor* (ROBINSON; SEAKINS, 1982). CRACE et al. (1991) demonstraram que a restrição protéica compromete a secreção de insulina, sendo que após recuperação nutricional a resposta plasmática de insulina à sobrecarga de glicose apresentou melhora, porém continuou inferior à normal. Como a insulina estimula a síntese protéica no fígado e no músculo e parece inibir a proteólise (PACY et al., 1989), baixas concentrações deste hormônio parecem permitir maior liberação de aminoácidos a partir dos músculos a fim de privilegiar a síntese protéica de outros tecidos.

Durante a DPE são observadas altas concentrações plasmáticas de glicocorticóides, que aumentam em situações de inanição e infecção. Os glicocorticóides são hormônios essencialmente catabólicos, mas seus efeitos dependem, em parte, do equilíbrio entre insulina e cortisol. Assim, a relação insulina/cortisol pode ser um índice útil para avaliar o estado nutricional de um indivíduo.

1.7.2 Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1)

O fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) atua no organismo promovendo a proliferação celular e a síntese de proteoglicanos pelos tecidos cartilaginosos, conectivo e ósseo e mediando o efeito anabólico e de promoção de crescimento linear exercido pelo hormônio de crescimento (GH) hipofisário. A maior parte do IGF-1 é secretada pelo tecido hepático e é transportado para outros tecidos (ação endócrina), sendo também secretado por outros tecidos, incluindo as células cartilaginosas, onde age localmente (ação parácrina). A relevância do IGF-1 no organismo pode ser constatada em camundongos que apresentam "knockout" do gene que expressa a proteína IGF-1 ou o receptor para IGF-1, uma vez que a ausência de IGF-1 nesses animais provoca prejuízo no crescimento — redução do tamanho de camundongos em 40-45% — e no desenvolvimento muscular (LARON, 2001).

A quantidade e a qualidade nutricional da proteína da dieta afetam o metabolismo protéico. A ingestão de dietas deficientes em proteínas ou em aminoácidos indispensáveis promove a diminuição do conteúdo de proteína corporal e o aparecimento de um quadro de desnutrição grave. Paralelamente, ocorre a diminuição da concentração de algumas proteínas plasmáticas, tais como albumina, pré-albumina e proteína ligadora de retinol (NOGUCHI, 2000).

O hormônio anabólico IGF-1 age principalmente regulando o metabolismo protéico corporal em diversas condições nutricionais. Além disso, a concentração plasmática de IGF-1 correlaciona-se com a quantidade e qualidade nutricional da proteína da dieta (AMMANN

et al., 2000; NOGUCHI, 2000). Cabe destacar que o conteúdo de caseína da dieta regula a concentração plasmática de IGF-1 uma vez que a restrição protéica acarreta na diminuição da concentração plasmática e tecidual de IGF-1 (SIMMEN et al., 1998), sendo essa diminuição decorrente da deficiência de insulina ou da diminuição da disponibilidade de aminoácidos (THISSEN et al., 1994). Corroborando esse fato, TIRAPEGUI (1999) verificou diminuição significativa de 95% e 42% na concentração plasmática e muscular de IGF-1, respectivamente, em ratos em crescimento, que consumiram dieta com 5% de caseína, em comparação ao grupo controle, que consumiu dieta contendo 12% de caseína. Similarmente, BOURRIN et al. (2000) demonstraram que uma dieta contendo 2,5% de caseína promoveu diminuição de 37% na concentração plasmática de IGF-1 em ratas adultas.

Estudos em seres humanos demonstram que a concentração plasmática de IGF-1 é influenciada pela quantidade de energia e de proteína da dieta. SMITH et al. (1995) observaram que a restrição calórica (50%) ou a restrição protéica (diminuição de ingestão de 1,0 para 0,66 g/kg de massa corporal/dia), durante seis dias, tanto em adultos quanto em crianças, promoveu diminuição significativa do balanço nitrogenado e da concentração plasmática de IGF-1. A diminuição da concentração plasmática e tecidual de IGF-1 decorrente da baixa concentração de proteína na dieta pode ser revertida pela re-introdução de uma dieta com quantidades adequadas de proteínas (MAITER et al., 1989). TOVAR et al. (1999) verificaram, em ratos, que a desnutrição induzida por dieta contendo 0,5% de caseína durante cinco semanas promoveu diminuição significativa da concentração plasmática de IGF-1 e de proteínas totais em relação ao grupo controle (18% de caseína). Posteriormente a esse período, os animais foram re-alimentados durante três semanas com uma dieta com 6% de caseína, o que não promoveu reversão dos parâmetros sangüíneos avaliados. A reabilitação nutricional com 18% de caseína na dieta durante 10 e 21 dias promoveu um aumento de 12 e 21 vezes da concentração plasmática de IGF-1, respectivamente, sugerindo-se que a determinação da concentração plasmática de IGF-1 representa um indicador sensível da evolução do estado nutricional de animais previamente desnutridos submetidos a diferentes concentrações de proteína na dieta.

A regulação da inflamação e da imunidade depende de uma vasta rede de interação entre células e citocinas. Juntamente às ações mediadas pelo hormônio cortisol, o sistema endócrino participa de diversos modos na regulação da imunidade por meio das ações do GH e IGF-1, em particular (HEEMSKERK et al., 1999).

Estudos demonstram que células imunocompetentes e células estromais da medula óssea podem expressar IGF-1. Por exemplo, juntamente com o GH, mediadores pró-inflamatórios tais como TNF-α e prostaglandina E_2 induzem a síntese de IGF-1 em macrófagos. Quase todas as células do sistema imune, incluindo linfócitos T e B, células mononucleares presentes no sangue e células *natural killer* (NK), expressam o receptor para IGF-1, ao mesmo tempo em que são susceptíveis aos efeitos desse hormônio. Desse modo, observa-se o papel da regulação autócrina e parácrina do IGF-1 em relação à imunidade inata e adquirida (ABBOUD et al., 1991; HEEMSKERK et al., 1999).

Em relação à imunidade inata verifica-se que o IGF-1, juntamente com fatores de estimulação de colônias, tais como IL-3, exerce ações regulatórias na diferenciação e proliferação de células da linhagem mielóide. O IGF-1 modula a hemopoese diretamente por meio da seleção de células da linhagem mielóide pela indução de sinalização de proliferação e anti-apoptótica. Além disso, IGF-1 controla o tamanho ósseo durante o período de crescimento e, conseqüentemente, o volume da medula óssea e da produção de células hemopoéticas. A atividade de células NK é aumentada pela estimulação com IGF-1, enquanto esse hormônio diretamente induz a síntese de ânion superóxido em macrófagos e neutrófilos. Cabe ressaltar que macrófagos pré-tratados com IGF-1 e, subseqüentemente estimulados com endotoxina demonstram aumento da síntese de TNF-α (HEEMSKERK et al., 1999).

Os efeitos do IGF-1 sobre a imunidade adquirida são claramente refletidos pela sua capacidade de regular a linfopoese antes e após a migração de células precursoras derivadas da medula óssea para órgãos linfóides secundários. A ligação específica de alta afinidade do IGF-1 para linfócitos T e B tem sido demonstrada *in vitro* e o número de receptores para IGF-1 na membrana plasmática de linfócitos T é aumentado após

estimulação *in vitro* com mitógenos para célula T. IGF-1 atua na diferenciação de células precursoras linfóides uma vez que esse hormônio promove aumento da diferenciação de progenitores de célula T tímicas, ao mesmo tempo em que está envolvido na diferenciação de pró-linfócitos B na medula óssea (FUNK et al., 1994; GEFFNER, 1997; HEEMSKERK et al., 1999).

Diante das evidências científicas acima expostas, verifica-se que a quantidade de proteína na dieta exerce papel relevante sobre a síntese tecidual de IGF-1 e, conseqüentemente, sobre a concentração plasmática desse hormônio. Ao mesmo tempo, estudos demonstram que a quantidade de proteína da dieta e a concentração de IGF-1 influenciam diversos parâmetros da imunocompetência em animais e humanos. Desse modo, a determinação da concentração plasmática e tecidual de IGF-1 no presente projeto representa um indicador sensível da evolução do estado nutricional de animais previamente submetidos a um protocolo de desnutrição protéica (2% de proteína) e, posteriormente, realimentados com uma dieta controle (12% de proteína).

1.8 Recuperação nutricional

As alterações provocadas pela desnutrição protéica e protéico-energética no organismo de um indivíduo são amplamente relatadas pela literatura. Dentre essas alterações, podem ser citadas a redução dos parâmetros antropométricos, alteração dos parâmetros bioquímicos e nutricionais, alteração da hemopoese e comprometimento do sistema imune. Neste contexto, saber se tais alterações podem ser revertidas ou se a desnutrição leva a um comprometimento irreversível das funções torna-se fundamental na medida em que dados epidemiológicos mostram que milhões de pessoas no mundo apresentam alguma forma de desnutrição.

Em geral, na recuperação do indivíduo desnutrido é necessário tratar o episódio agudo, suprimir outras doenças associadas e, finalmente, estabelecer-se uma dieta adequada (OLIVEIRA; MARCHINI, 1998). O tratamento da DPE baseia-se na provisão de

nutrientes que estão faltando na dieta, proteínas de boa qualidade e calorias adequadas. Indivíduos com desnutrição severa requerem vários tipos de cuidados e tratamentos de acordo com seu estado clínico e necessidades nutricionais. Estas necessidades variam durante a fase aguda do distúrbio, a recuperação e a reabilitação. O tratamento pode ser dividido em quatro fases: a primeira é a reidratação; a segunda é o tratamento da infecção (se esta existir), a terceira é a alimentação com alta taxa de proteínas e calorias e a última é a reabilitação (OMS, 1999).

Existem diversos parâmetros utilizados na avaliação do estado nutricional de um indivíduo (ZIEGLER; FILER, 1996). Entre eles podem ser citados a resposta imunológica (que é um índice funcional sensível devido à sua estreita relação com o estado nutricional), a avaliação da dieta, exames físicos para sinais de síndromes da deficiência, antropometria e medidas físicas, bioquímicas e radioisotópicas da composição corporal (CHANDRA, 1991).

Embora a Organização Mundial da Saúde descreva um protocolo para o tratamento de pessoas com desnutrição (OMS, 1999) e existam inúmeros estudos sugerindo diversos protocolos para recuperação nutricional e avaliando sua eficácia, os resultados relacionados aos efeitos da renutrição ainda são poucos e, algumas vezes, controversos.

Há relatos na literatura de que, com a recuperação nutricional, desaparecem as lesões anatômicas, há normalização das funções, correção das alterações bioquímicas plasmáticas e acúmulo normal das reservas de nutrientes (OLIVEIRA; MARCHINI, 1998). Dentre os efeitos da recuperação nutricional, o mais descrito é o ganho de peso corporal após o período de renutrição. O peso corporal reflete a contribuição de vários compartimentos. Estes compartimentos incluem tecido adiposo, músculo esquelético, ossos e órgãos parenquimatosos. Na restrição de nutrientes, pode ser observada uma diminuição no peso corporal dos indivíduos devido às alterações bioquímicas que culminam com uma acentuação do catabolismo protéico (ZIEGLER; FILER, 1996).

Em geral, o ganho de peso é descrito como um dos primeiros efeitos da recuperação nutricional. Vários estudos sugerem que o ganho de peso está relacionado ao aumento da massa magra, que ocorreria devido ao aumento da eficiência da conversão energética por

parte dos indivíduos renutridos (BOZA et al., 1999; WALRAND et al., 2000). Este aumento seria explicado, em parte, por uma diminuição da termogênese, permitindo que maior energia seja utilizada na produção de proteínas, lipídios e glicogênio (BOZA et al., 1999). Neste sentido, inúmeros autores descrevem um aumento do gasto energético de repouso explicado, em parte, pelo aumento da massa magra, especialmente da massa muscular (MOUKADDEM et al., 1997; WYMELBEKE et al., 2004). Por outro lado, alguns autores descrevem somente um aumento da massa muscular durante o início do processo de recuperação nutricional, relatando que o aumento do peso corporal aconteceria em um período posterior (BRIET; JEEJEEBHOY, 2001; BRIET et al., 2003). De qualquer forma, sabe-se que a capacidade de recuperação de um indivíduo desnutrido depende da magnitude do crescimento recuperacional. Este crescimento corresponde ao aumento da velocidade de crescimento acima do esperado para a idade de um indivíduo, que ocorre posterior a um período em que este crescimento foi diminuído por alguma condição. Os requerimentos nutricionais durante este período não estão totalmente estabelecidos, mas são maiores que os requerimentos de indivíduos da mesma idade, visto que devem ser suficientes para satisfazer a demanda de síntese de novos tecidos durante o período de recuperação (neste período, o aumento de peso de um indivíduo em recuperação é muito maior que o aumento de peso de um indivíduo da mesma idade) (WEISSTAUB; ARAYA, 2003).

Muitos estudos têm demonstrado, em ratos adultos, que a desnutrição leva à hipofunção e à atrofia morfológica do intestino delgado (BARBER et al., 1990). No entanto, a renutrição rapidamente restaura a morfologia e a função do intestino, resultando em reparo da atrofia e normalização da permeabilidade intestinal (BOZA et al., 1999; CANO et al., 2002; WALRAND et al., 2000). Boza et al. (1999) relatam, além da normalização das funções intestinais, aumento do balanço nitrogenado (que durante o período de desnutrição permanece negativo). Este resultado está relacionado ao aumento da digestibilidade e diminuição da produção de fezes.

Entre as alterações bioquímicas observadas em indivíduos desnutridos, a principal é a diminuição da quantidade de proteína tecidual. Esta situação tem sido relatada em vários

estudos, assim como a reversão deste quadro após a renutrição (BOZA et al., 1999). Alterações hormonais também têm sido descritas em situações de desnutrição. Em indivíduos desnutridos, observa-se diminuição nas concentrações séricas de insulina e IGF-I e um aumento de cortisol, sendo essa situação revertida após a recuperação nutricional (CAREGARO et al., 2001; NOGUCHI, 2000; PALACIO et al., 2002b; SOLIMAN et al., 2000).

Em relação à hemopoese, anemia e leucopenia moderadas têm sido relatadas em pacientes desnutridos (LAMBERT et al., 1997; WANG et al., 2001), assim como uma granulopoese ineficaz, que pode ser decorrente da redução da quantidade de GM-CFC na medula óssea. A quantidade de BFU-E pode ou não estar alterada, visto que uma anemia moderada pode não ser suficiente para provocar uma alteração no número de hemácias circulantes (VAISMAN et al., 2004). Dados de nosso laboratório demonstram redução na quantidade de células progenitoras mielóides e eritróides em animais desnutridos (BORELLI et al., 2007). Além disso, há uma redução da resposta imune inespecífica e específica (BORELLI et al., 1995, 2001, 2007; FRIED, 1978; ORTIZ; BETANCOURT, 1984) e alteração na produção de citocinas (FOCK et al., 2007; GRIMBLE, 1989).

Vários trabalhos relatam que, com a recuperação nutricional, há melhora nos parâmetros hemopoéticos. VAISMAN et al. (2004) relatam que indivíduos desnutridos que recuperam 10% do peso não apresentam alteração nos valores de hemoglobina e hemácias, porém, apresentam aumento significante no número de leucócitos, sem, contudo, haver alteração significante na contagem diferencial de polimorfonucleares e linfócitos. Por outro lado, WALRAND et al. (2000) relatam aumento do número de leucócitos já no período de desnutrição, sendo esse aumento mantido durante o processo de renutrição. Esse aumento seria devido, em parte, ao aumento do número de neutrófilos durante os períodos de desnutrição e renutrição.

Com a recuperação nutricional ocorre o aumento da quantidade dos precursores hemopoéticos e da concentração de eritropoietina. A melhora observada nestes parâmetros pode ser correlacionada com a melhora dos parâmetros nutricionais (VAISMAN et al.,

2004). Estudos que avaliam a produção de citocinas em indivíduos desnutridos apresentam resultados muito controversos (CORCOS et al., 2001; RAYMOND et al., 2000), assim como aqueles que avaliam a produção de citocinas durante o período de recuperação nutricional. NAGATA et al. (1999) encontraram um aumento na capacidade de produção de citocinas durante a renutrição. WALRAND et al. (2000) relatam aumento de TNF-α após o processo de recuperação nutricional. Já NOVA et al. (2002) mostraram diminuição na produção de TNF-α e IL-6 e aumento na produção de IL-1β em indivíduos desnutridos, sendo que esta situação não foi revertida após 1 mês de renutrição.

A recuperação do sistema imune tem sido pouco estudada durante a reabilitação nutricional. Diferenças entre os resultados encontrados para atividade microbicida e fagocitose têm sido encontradas (VÁSQUEZ-GARIBAY et al., 2002). Walrand et al. (2000) relatou aumento significante na produção de peróxido de hidrogênio de indivíduos renutridos em relação aos valores de indivíduos desnutridos. A adesão e quimiotaxia de neutrófilos, que está diminuída na desnutrição, também tende a melhorar com a terapia nutricional (VÁSQUEZ-GARIBAY et al., 2002; WALRAND et al., 2000).

Em indivíduos desnutridos há diminuição no número de linfócitos circulantes, sendo observado aumento percentual de linfócitos imaturos e redução percentual de linfócitos maduros (CHEVALIER et al., 1996; VÁSQUEZ-GARIBAY et al., 2002). Com a recuperação nutricional há uma reversão deste quadro (CHEVALIER et al., 1996; WALRAND et al., 2000), porém alguns estudos relatam somente aumento do número de linfócitos B, enquanto o número de linfócitos T permanece diminuído (WALRAND et al., 2000). No entanto, alguns estudos relatam que a recuperação da imunidade celular não é concomitante com a recuperação nutricional, sendo que a primeira necessita de um tempo maior para ocorrer (CHEVALIER et al., 1996). Já VASQUEZ-GARIBAY et al. (2002) relatam que 1 ano após a recuperação nutricional, a imunidade celular continua diminuída em crianças submetidas à terapia nutricional. Isso poderia ser explicado por uma alteração irreversível no ciclo celular de linfócitos.

2. OBJETIVO

Sabendo-se que a DPE altera o metabolismo e o balanço hormonal, levando ao comprometimento da hemopoese e da imunocompetência, nos propusemos a avaliar a reversibilidade de algumas das alterações encontradas na desnutrição. Para responder a essa questão, desenvolvemos um modelo murino de recuperação nutricional, no qual avaliamos:

- o estado nutricional dos animais, determinando a:
  - concentração sérica de proteínas totais e albumina
  - concentração de proteína, DNA e RNA hepáticos e musculares;
  - concentração de glutamina plasmática e muscular
  - atividade de glutamina sintetase muscular
  - concentração de glicose sérica
  - concentração de insulina, IGF-1 e corticosterona
  - tolerância oral à sobrecarga de glicose (OGTT) e tolerância intraperitonial à insulina (ITT)

- a hemopoese pela realização do hemograma, mielograma, esplenograma e contagem de reticulócitos;

- a função de células da cavidade peritonial, determinando a :
  - síntese de citocinas (IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α e INF-γ)
  - produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio
  - capacidade de adesão e de espraiamento
  - fagocitose e atividade fungicida
  - expressão dos receptores para LPS (CD14 e TLR4/MD2)
  - ativação do fator de transcrição NFκB
  - expressão de proteínas da via de sinalização ativada por LPS (MyD88, TRAF-6, IKKβ, IκBα, NFκB, e NFκB e IκBα fosforilados)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Neste projeto foram utilizados camundongos (*Mus domesticus*) machos, com 60 dias de idade, das linhagens Swiss Webster (não isogênica) e C57BL/6J (isogênica). Os animais de ambas as linhagens foram provenientes de colônias mantidas pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Camundongos de ambas as linhagens foram utilizados nas análises de peso corporal, consumo de ração e água, parâmetros hematológicos (hemograma, mielograma e esplenograma), concentração sérica de proteínas totais e albumina, produção de citocinas e óxido nítrico por macrófagos peritoniais. Camundongos Swiss Webster foram utilizados nas análises de OGTT, ITT, glicose sérica, glutamina plasmática e muscular, atividade de glutamina sintetase, hormônios (insulina, IGF-1 e corticosterona), proteínas teciduais (proteína, DNA e RNA hepático e muscular), produção de peróxido de hidrogênio e capacidade de adesão e espraiamento de macrófagos peritoniais. Camundongos C57BL/6J foram utilizados nas análises dos receptores CD14 e TLR4 por citometria de fluxo, de proteínas da via de ativação do fator de transcrição NFκB por *Western Blotting* e da ativação deste fator por EMSA.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (processo CEEA 13/2005).

3.2 Rações

O protocolo experimental foi conduzido utilizando-se dois tipos de ração: normoprotéica, contendo 12% de proteína (Tabela 1, Ração Normoprotéica) (REEVES, 1993) e hipoprotéica, contendo 2% de proteína (Tabela 1, Ração Hipoprotéica) (DU et al., 2000). Ambas foram preparadas em nosso laboratório na forma granulado e armazenadas a -4°C até o uso. As rações são isocalóricas (1716,3 kJ/100 g ou 410,6 kcal/100 g) e diferem apenas no conteúdo protéico, sendo preparadas de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para camundongos adultos (Tabelas 1, 2 e 3) (REEVES, 1993). A fonte de proteína utilizada foi a caseína, sendo que tanto seu teor protéico quanto o das rações, foi determinado pelo método micro-Kjeldahl (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Sabendo-se que cerca de 80% do fosfato da ração é proveniente da caseína, a concentração desse mineral na mistura salínica utilizada no preparo das rações foi corrigida de acordo com a concentração protéica de cada lote de caseína utilizado e com a quantidade de caseína empregada em cada uma das rações (normoprotéica e hipoprotéica) para se adequar aos valores normais recomendados (REEVES, 1993).

Tabela 1 - Composição percentual da ração

COMPOSIÇÃO	RAÇÃO NORMOPROTÉICA	RAÇÃO HIPOPROTÉICA
	(g/kg ração)	
Proteína	120	20
Sacarose	100	100
Celulose	50	50
Óleo de Soja	40	40
Mistura Salínica	35	35
Mistura Vitamínica	10	10
L-Cistina	1,8	0,257
Bitartarato de Colina	2,5	2,5
Tert-butilhidroquinona	0,008	0,008
Amido (q.s.p.)	1000	1000

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

Tabela 2 - Composição da Mistura Salínica

Sais minerais	Ração Normoprotéica (g/Kg de Mix)	Ração Hipoprotéica (g/Kg de Mix)
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).

Tabela 3 - Composição da Mistura Vitamínica

Vitaminas	Rações Normoprotéica e Hipoprotéica g/Kg de mix
Ácido nicotínico	3,00
Pantotenato de cálcio	1,60
Piridoxina-HCl	0,70
Tiamina-HCl	0,60
Riboflavina	0,60
Ácido fólico	0,20
D-biotina	0,02
Vitamina 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).

3.3 Delineamento experimental

3.3.1 Indução da desnutrição

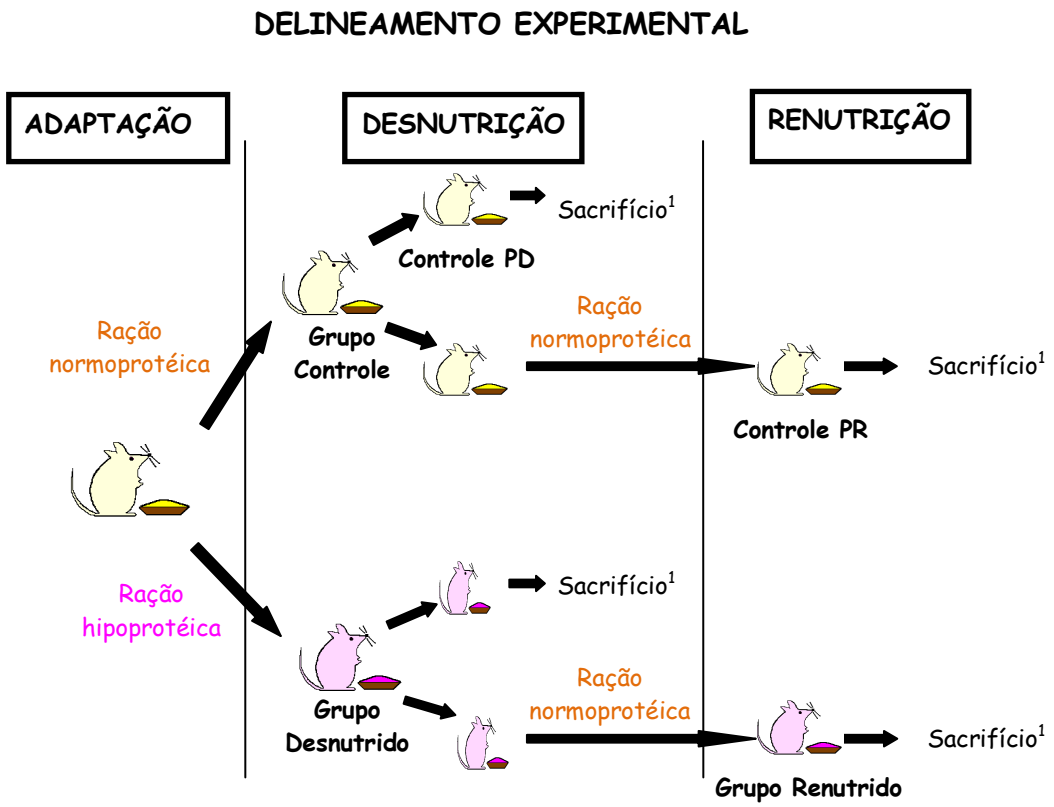
Os animais de ambas as linhagens foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais sob as mesmas condições ambientais, com ciclo de luz de 12h (claro/escuro), temperatura de 22±2°C e umidade de 55±10%, permanecendo por um período de adaptação aos gaioleiros de 15 a 20 dias (Tabela 4, Figura 2). Neste período, os animais receberam ração normoprotéica e água *ad libitum*, e tiveram seu peso avaliado a cada 48 horas. Após a obtenção da estabilidade do peso corporal, os camundongos foram separados em dois grupos: **Controle** e **Desnutrido**. A separação obedeceu a critérios estatísticos, de modo que a média do peso corporal dos animais do **Grupo Controle** fosse estatisticamente semelhante à média do peso corporal dos animais do **Grupo Desnutrido**. O **Grupo Controle** continuou a receber ração normoprotéica, enquanto o **Grupo Desnutrido** passou a receber ração hipoprotéica (Tabela 4, Figura 2), dando início ao processo de desnutrição. Durante todo o experimento foram avaliados o peso corporal e o consumo de água e ração dos animais a cada 48 horas. Cinco semanas após o início do período de desnutrição (HUANG; FRAKER, 2003), os animais do **Grupo Desnutrido** foram separados em 2 subgrupos: um foi sacrificado, enquanto o outro foi submetido ao processo de renutrição. O **Grupo Controle** também foi separado em dois subgrupos: um foi sacrificado simultaneamente ao **Grupo Desnutrido** e passou a ser chamado de **Controle do Período de Desnutrição (Controle PD)**, enquanto o outro continuou a receber ração normoprotéica. Os animais sacrificados foram utilizados para a obtenção das amostras biológicas necessárias às análises.

3.3.2 Recuperação nutricional

Após o período de desnutrição os animais que restaram do **Grupo Desnutrido** foram submetidos ao processo de renutrição. Nesta etapa, os animais passaram a receber ração normoprotéica, (Tabela 4, Figura 2) constituindo, assim, o **Grupo Renutrido**. Tanto a água quanto a ração continuaram a ser administradas *ad libitum*. O peso e o consumo de ração e água continuaram a ser avaliados a cada 48 horas. Em paralelo ao **Grupo Renutrido** foram mantidos os animais do **Grupo Controle** que não foram sacrificados concomitantemente aos animais desnutridos, passando a ser chamados de **Grupo Controle do Período de Renutrição (Controle PR)**. O processo de renutrição foi mantido durante 4 semanas (Tabela 4, Figura 2), sendo que ao final deste período, os animais dos **Grupos Controle PR** e **Renutrido** foram sacrificados para obtenção das amostras biológicas.

Tabela 4 – Rações e grupos experimentais

GRUPOS	RAÇÃO UTILIZADA EM CADA PERÍODO		
	Adaptação (15-20 dias)	**Desnutrição (5 semanas)**	**Renutrição (4 semanas)**
Grupo Controle	Ração normoprotéica	Ração normoprotéica	Ração normoprotéica
Grupo Desnutrido	Ração normoprotéica	Ração hipoprotéica	_____
Grupo Renutrido	Ração normoprotéica	Ração hipoprotéica	Ração normoprotéica



[1] Coleta de material para as análises

Figura 2 - Delineamento experimental

3.4 Obtenção de amostras de sangue

3.4.1 Sangue total

Amostras de sangue total foram obtidas por punção do plexo axilar de camundongos previamente anestesiados com xilazina (16 mg/kg de peso corporal) e cetamina (120 mg/kg de peso corporal), utilizando-se EDTA 10% (sal sódico) como anticoagulante, na proporção de 50 μL de EDTA para cada 1,0 mL de sangue.

3.4.2 Soro

Amostras de sangue obtidas de acordo com o descrito no item 3.4.1, mas sem o uso de anticoagulante, permaneceram em repouso durante 2 horas à temperatura ambiente. Após retração do coágulo, foram centrifugadas (2000 rpm, durante 20 minutos, a 4°C) e o soro obtido foi armazenado a -40°C até a realização das análises de proteínas totais e albumina.

Amostras utilizadas para as determinações de insulina, glicose, corticosterona e IGF-1 foram obtidas de animais mantidos em jejum durante 8 horas por decaptação. O soro foi obtido como descrito no parágrafo anterior e armazenado a -80°C até a realização das análises.

3.4.3 Plasma

Amostras de sangue foram obtidas de acordo com o descrito no item 3.4.1 utilizando-se heparina como anticoagulante na proporção de 40 μL de heparina (25000UI/5mL) (LIQUEMINE, ROCHE) para 1,0 mL de sangue. Após coleta, o sangue foi imediatamente centrifugado (2000 rpm durante 20 minutos, a 4°C) e o plasma obtido foi armazenado a -80°C até a realização da determinação de glutamina.

3.5 Realização do hemograma e contagem de reticulócitos

Amostras de sangue total obtidas de acordo com o descrito no item 3.4.1 foram utilizadas para a determinação do número total de hemácias e leucócitos, hematócrito, hemoglobina e índices hematimétricos. Estas análises foram realizadas no analisador automático de células sangüíneas ABC Vet (ABX DIAGNOSTICS). Também foram preparadas extensões sangüíneas coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947) para a identificação e quantificação de leucócitos em microscópio óptico.

Os reticulócitos foram analisados, com auxílio de microscópio óptico, em extensões submetidas à coloração supra-vital com Novo Azul de Metileno, preparadas imediatamente após a coleta de sangue (BRECHER, 1949). Foram avaliados 20 campos por lâmina, estabelecendo-se a porcentagem de reticulócitos em relação ao número total de hemácias.

3.6 Determinação de proteínas totais e albumina séricas

A determinação de proteínas totais e albumina foi realizada em amostras de soro obtidas de acordo com o descrito no item 3.4.2. A concentração de proteínas séricas totais foi realizada pelo método de Biureto (GORNAL et al., 1949) (*kit* LABTEST – Proteínas Totais), enquanto a concentração sérica de albumina foi realizada pelo método do Verde de Bromo Cresol (DOUMAS, 1971) (*kit* LABTEST – Albumina).

3.7 Determinação da concentração sérica de glicose

Amostras de soro obtidas de acordo com o descrito no item 3.4.2 foram utilizadas para a determinação da concentração sérica de glicose de acordo com o método de

BERGMEYER (1974). Este se baseia na avaliação da quantidade de quinonimina produzida em função da glicose oxidada (*kit* LABTEST – Glicose PAP Liquiform).

3.8 Determinação de insulina, IGF-1 e corticosterona séricos

As análises foram conduzidas com amostras de soro obtidas de acordo com o descrito no item 3.4.2. A determinação da concentração de insulina e IGF-1 foi feita utilizando-se o método de imunoensaio do tipo ELISA, utilizando-se o *kit* Rat/Mouse Insulin ELISA (LINCO) e o *kit* Mouse IGF-1 Quantikine ELISA (R&D SYSTEM), respectivamente. A determinação da concentração de corticosterona foi feita pelo método de imunoensaio indireto, utilizando-se o *kit* Corticosterone EIA (IDS).

3.9 Determinação da concentração plasmática de glutamina

Para esta análise foram utilizadas amostras de plasma coletadas de acordo com o descrito no item 3.4.3, armazenadas não mais do que 7 dias. A determinação da concentração de glutamina foi realizada utilizando-se o *kit* Glutamine and Glutamate Determination (SIGMA-ALDRICH) segundo a metodologia descrita por LUND (1986), que se baseia na conversão de NAD^+ para NADH (cuja concentração é medida espectrofotometricamente, em comprimento de onda 340 nm). Esta conversão é proporcional à quantidade de L-glutamina inicial.

3.10 Análises teciduais: fígado e músculo

3.10.1 Obtenção de fígado e do músculo gastrocnêmio

Animais anestesiados de acordo com o descrito no item 3.4.1 foram exsanguinados por venossecção e sacrificados por deslocamento cervical, procedendo-se à retirada do fígado e dos músculos gastrocnêmios direito e esquerdo, que foram imediatamente colocados em

nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados a -80°C até a extração. O fígado e o músculo gastrocnêmio foram utilizados para a avaliação do conteúdo de proteína, DNA e RNA tecidual, atividade da enzima glutamina sintetase e glutamina muscular.

3.10.2 Proteína, DNA e RNA tecidual

3.10.2.1 Extração de proteína, DNA e RNA

O fígado e o gastrocnêmio esquerdo obtidos de acordo com o item anterior foram pulverizados mecanicamente. Ao tecido pulverizado acrescentou-se 6 mL de uma solução de ácido tricloroacético 10% gelado. Esta suspensão foi centrifugada (3000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C), sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressupensos em 10 mL de ácido perclórico 2% gelado. Novamente a suspensão foi centrifugada (3000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C), sendo o sobrenadante descartado. Após ser ressuspenso em 10 mL de hidróxido de sódio 0,3N, o sedimento foi incubado em "banho-maria" a 37°C durante 1 hora. Após este tempo, a suspensão foi homogeneizada, sendo 2 mL retirados e armazenados a –40°C para a determinação de proteína. O restante da suspensão foi resfriada em gelo e acrescida de 2 mL de ácido perclórico 20%. Após homogeneização, a suspensão permaneceu em banho de gelo por 10 minutos, sendo posteriormente centrifugada (3000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C). O sobrenadante obtido foi retirado e armazenado a -40°C para a determinação de RNA total. Adicionou-se 10 mL de ácido perclórico 2% ao sedimento e, após homogeneização, a suspensão foi centrifugada (3000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C). O sobrenadante foi descartado e 10 mL de ácido perclórico 8% foram adicionados ao sedimento, sendo que essa suspensão foi incubada a 70°C durante 45 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (3000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C), sendo que o sobrenadante obtido foi armazenado a -40°C para a determinação de DNA total. O processo de extração foi baseado na metodologia padronizada pelo Laboratório de Bioquímica da Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

3.10.2.2 Determinação de proteína tecidual

A concentração de proteínas totais do fígado e do músculo gastrocnêmio foi determinada nos extratos obtidos conforme mencionado no item anterior, sendo utilizada a metodologia descrita por LOWRY (1951), na qual é utilizado o reagente Folin-Ciocalteau para a quantificação das proteínas.

3.10.2.3 Determinação de RNA tecidual

A determinação de RNA total foi realizada a partir da leitura, em espectrofotômetro, dos extratos de fígado e do músculo gastrocnêmio obtidos de acordo com o descrito no item 3.10.2.1. Os extratos foram diluídos em ácido perclórico 2% (proporção de 1:20) e lidos em comprimento de onda de 260 nm contra um branco de água deionizada. Após a leitura, as amostras foram neutralizadas com hidróxido de sódio 6M (100 µL de hidróxido de sódio 6M para cada 2 mL de amostra), sendo utilizadas para a determinação de proteína residual conforme o método de LOWRY (1951). A absorbância obtida na determinação de proteína foi descontada daquela obtida na leitura de RNA, e a absorbância resultante foi utilizada no cálculo da concentração total de RNA tecidual de acordo com o método proposto por MUNRO;FLECK (1966).

3.10.2.4 Determinação de DNA tecidual

A determinação da concentração total de DNA foi realizada em extratos de fígado e de músculo gastrocnêmio obtidos de acordo com o descrito no item 3.10.2.1. À 500 µL de amostra foram adicionados 1 mL de reagente difenilamina (1,5 g de difenilamina; 100 mL de ácido acético glacial; 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado; 500 µL de acetaldeído), sendo essa suspensão incubada durante 3 horas a 50°C. Após este tempo, foi realizada a leitura das amostras em comprimento de onda de 600 nm e a absorbância obtida foi utilizada para calcular a concentração total de RNA tecidual.

3.10.3 Glutamina

3.10.3.1 Extração de glutamina muscular

O músculo gastrocnêmio direito foi pulverizado mecanicamente e acrescido de 1 mL de ácido perclórico 0,05M. Após homogeneização a suspensão foi centrifugada (3000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C). Ao sobrenadante foi adicionado 600 µL de bicarbonato de potássio 0,5M. Após agitação da suspensão, esta foi colocada em banho de gelo durante alguns minutos para sedimentação do precipitado formado. O sobrenadante foi retirado e acrescido de 400 mL de água deionizada, sendo agitado vigorosamente. O extrato obtido foi utilizado no mesmo dia para a determinação de glutamina muscular.

3.10.3.2 Determinação de glutamina muscular

A partir do extrato muscular obtido conforme descrito no item anterior foi realizada a determinação de glutamina muscular de acordo com a metodologia de LUND (1986), utilizando-se o *kit* Glutamine and Glutamate Determination (SIGMA-ALDRICH). A concentração de glutamina foi expressa por grama de tecido.

3.10.4 Glutamina sintetase

3.10.4.1 Extração de glutamina sintetase muscular

O músculo gastrocnêmio direito obtido de acordo com o item 3.10.1 foi pulverizado mecanicamente. Adicionou-se 1 mL de imidazol 50mM ao tecido pulverizado, sendo a suspensão centrifugada em seguida (4500 rpm, durante 15 minutos, a 4°C). O sobrenadante obtido foi congelado a -80°C, ficando armazenado por um prazo não superior a 21 dias.

3.10.4.2 Atividade de glutamina sintetase

A determinação da atividade de glutamina sintetase foi realizada em extratos do músculo gastrocnêmio obtidos conforme descrito no item anterior. Adicionou-se a 300 µL de amostra, 20 µL de ADP (8mM), 100 µL de arsenato de sódio (78 g/L), 80 µL de cloreto de manganês (3,146 g/L), 400 µL de glutamina (18,2625 g/L em imidazol 5,957 g/L) e 100 µL de hidroxilamina (15,32ml/L). O branco da reação foi constituído por todos os reagentes, com exceção da amostra e de ADP (substituídos por água deionizada e imidazol 50mM). Todos os tubos (branco e amostras) foram incubados a 37°C durante 20 minutos. Posteriormente, adicionou-se em todos os tubos (inclusive o branco), 2 mL de uma solução de STOP (cloreto de ferro III 2,42% e ácido tricloroacético 1,45% em HCl 1,82%). As suspensões foram centrifugadas (3000 rpm durante 10 minutos, a temperatura ambiente) e a partir do sobrenadante foi lida a absorbância em comprimento de onda de 540 nm (MINET et al, 1997). O cálculo da atividade foi feito a partir de uma curva padrão de glutamina sintetase.

3.11 Teste de tolerância oral à glicose (OGTT)

Os animais de todos os grupos foram submetidos a jejum de 8 horas, após o qual tiveram sua glicemia avaliada (tempo 0). Em seguida, receberam, por gavagem, uma solução de dextrose (200 mg/mL), na dose de 1 g/Kg de peso corporal (sendo que o volume total administrado não excedeu 500 µL) (FRAULOB et al., 2010). A glicemia desses animais foi avaliada nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração da solução de dextrose. Os valores obtidos foram utilizados para determinar a curva glicêmica após sobrecarga de dextrose. As amostras de sangue para determinação da glicemia foram obtidas por punção da veia caudal dos animais. A glicemia foi determinada no glicosímetro Accu-Chek Performa® (Roche Diagnostics®).

3.12 Teste de tolerância à insulina (ITT) intraperitonial

Para a determinação da curva glicêmica após administração de insulina, foi injetado, intraperitonialmente, em animais que permaneceram em jejum por 8 horas, uma dose de insulina humana (Humulin NPH Lilly®) na dose de 0,75U/Kg de peso corporal. A glicemia foi determinada com glicosímetro Accu-Chek Performa® (Roche Diagnostics®) em amostras de sangue obtidas por punção da veia caudal nos tempos 0 (antes da administração de insulina), 10, 20, 30, 40 e 50 minutos após administração de insulina (SOUZA et al., 2010). Os valores obtidos foram utilizados para calcular a constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática (K_{itt}) de acordo com método proposto por BONORA et al (1989).

3.13 Obtenção de células da medula óssea (MO) e realização do mielograma

Animais anestesiados de acordo com o descrito no item 3.4.1 foram exsanguinados por venossecção e sacrificados por deslocamento cervical. Procedeu-se à retirada do fêmur esquerdo, seguida do corte das epífises. As células da MO foram obtidas por lavagem da cavidade femural com 0,5 mL de meio de cultura McCOY´S 5A® modificado (SIGMA®, CHEMICAL COMPANY, USA). A suspensão celular obtida foi utilizada para contagem do número total de células nucleadas em câmara de Neubauer (utilizando-se como diluente o líquido de Turk) e para a confecção de lâminas obtidas por citocentrifugação e coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947), que foram analisadas em microscópio óptico a fim de se realizar a identificação e quantificação das populações celulares (contando-se, no mínimo, 300 células por lâmina).

3.14 Obtenção de células do baço e realização do esplenograma

Animais anestesiados de acordo com o descrito no item 3.4.1 foram exsanguinados por venossecção e sacrificados por deslocamento cervical, procedendo-se à retirada do

baço. Este foi dissociado mecanicamente em placa de Petri contendo meio de cultura McCOY´S 5A modificado (SIGMA®, CHEMICAL COMPANY, USA) para obtenção das células esplênicas. O material obtido foi transferido para tubo de ensaio plático e de fundo cõnico e permaneceu em repouso durante 10 minutos, sendo o sobrenadante coletado, centrifugado (1000 rpm durante 10 minutos, a 4°C) e ressuspenso em meio de cultura McCOY´S 5A modificado (SIGMA®, CHEMICAL COMPANY, USA), de modo a se obter uma suspensão celular livre do estroma. Esta suspensão foi utilizada para contagem do número total de células nucleadas em câmara de Neubauer (utilizando-se como diluente o líquido de Turk) e para a confecção de lâminas obtidas por citocentrifugação e coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947), que foram analisadas em microscópio óptico a fim de se realizar a identificação e quantificação das populações celulares (contando-se, no mínimo, 300 células por lâmina).

3.15 Obtenção de células da cavidade peritonial

Animais anestesiados de acordo com o descrito no item 3.4.1 foram exsanguinados por venossecção e sacrificados por deslocamento cervical. Após sacrifício, a cavidade peritonial foi lavada com 5 mL de meio McCoy's 5A® modificado (SIGMA®, CHEMICAL COMPANY, USA), ph 7,4, estéril e apirogênico, aspirando-se, em seguida, o lavado contendo as células. A viabilidade da suspensão celular obtida foi avaliada em câmara de Neubauer utilizando-se azul de tripano 0,1%. Todas as amostras obtidas apresentaram viabilidade acima de 90%.

A análise morfológica das células presentes no lavado peritonial foi realizada em lâminas obtidas por citocentrifugação e coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947), analisadas em microscópio óptico para identificação e quantificação dos tipos celulares (contando-se, no mínimo, 200 células por lâmina).

3.16 Cultura de células peritoniais

Células obtidas de acordo com o descrito no item anterior foram plaqueadas na concentração de $1x10^6$/mL em placa de cultura de 24 poços e incubadas durante 1 hora, a 37°C, 5% CO_2 e em atmosfera úmida. Após este tempo, os poços foram lavados com meio de cultura a fim de se remover as células não aderentes e enriquecer a preparação com macrófagos peritoniais (PAPADIMITRIOU; BRUGGEN, 1988). As células aderidas foram cultivadas na presença ou ausência de 1,25 µg/mL de LPS (O55:B5) (SIGMA-ALDRICH) durante 30 minutos, 24 e 48 horas, a 37°C, 5% CO_2 e em atmosfera úmida. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -40°C até a determinação de óxido nítrico e de citocinas.

3.17 Avaliação da síntese de citocinas

A análise de citocinas foi realizada em amostras do sobrenadante de cultura de células peritoniais obtido após 24 horas de cultivo de acordo item anterior. A concentração de IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α e IFN-γ foi determinada por meio de imunoensaio do tipo ELISA, utilizando-se *kit* Quantikine (R&D System, USA), segundo metodologia escrita pelo fabricante.

3.18 Avaliação da síntese de óxido nítrico

A análise da síntese de óxido nítrico foi conduzida em amostras do sobrenadante de cultura de células peritoniais obtido após 24 e 48 horas de cultivo conforme item 3.16. A determinação foi realizada em placa de 96 poços segundo a metodologia de GRIESS (1879), na qual o óxido nítrico é convertido a nitrito, sendo esta última a espécie detectada colorimetricamente.

3.19 Avaliação da síntese de peróxido de hidrogênio

A determinação de peróxido de hidrogênio foi realizada pelo método de oxidação da peroxidase dependente do vermelho de fenol descrito por PICK; MIZEL (1981). Células peritoniais residentes foram obtidas por lavagem da cavidade peritonial com 5 mL de PBS (pH7,4) estéril e gelado. O lavado peritonial foi centrifugado (1000 rpm durante 5 minutos, a 4°C) e o sedimento ressuspenso em 1 mL de PBS (pH7,4). Após a determinação da viabilidade celular com azul de tripano 0,1%, as células foram novamente centrifugadas (1000 rpm durante 5 minutos, a 4°C) e o sedimento ressuspenso em solução de vermelho de fenol, na proporção de 1 mL da solução de vermelho de fenol para cada $2,0x10^6$ células. Em placa de 96 poços, cada amostra foi plaqueada em octuplicata, na presença ou ausência de PMA (*phorbol miristate acetate*) (SIGMA-ALDRICH) (10 ng/poço). A placa foi incubada a 37°C, 5% CO_2 e em atmosfera úmida durante 1 hora. Após este período, o sobrenadante foi transferido para outra placa e a reação interrompida adicionando-se 10 µL de hidróxido de sódio 1M em cada poço. Foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro no comprimento de onda de 630 nm. Os valores foram obtidos em comparação com uma curva-padrão de peróxido de hidrogênio e expressos em nmol/$2x10^5$ células.

3.20 Teste de adesão de células da cavidade peritonial

Células da cavidade peritonial obtidas de acordo com o descrito no item 3.15 foram plaqueadas em placa de 96 poços na concentração de $1x10^5$/150 µL e incubadas durante 1 hora, a 37°C, 5% CO_2 e em atmosfera úmida. Após este tempo, os poços foram lavados com meio de cultura a fim de se remover as células não aderentes e enriquecer a preparação com macrófagos peritoniais (PAPADIMITRIOU; BRUGGEN, 1988). As células aderidas foram cultivadas na presença ou ausência de 1,25 µg/mL de LPS (cepa O55:B5) (SIGMA-ALDRICH), durante 2 e 24 horas a 37°C,5% CO_2 e em atmosfera úmida. A quantidade de células aderidas foi avaliada pelo método do cristal violeta (LEE; WARREN, 1987). Os poços

foram lavados com PBS pH 7,4 e as células fixadas com 30 µL de paraformaldeído 4% durante 10 minutos, em temperatura ambiente. Após a fixação, 50 µL de solução de cristal violeta em metanol (0,25 g de cristal violeta; 10 mL de metanol PA; 40 mL de água deionizada) foi adicionada em cada poço. A placa foi mantida ao abrigo da luz, durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Após lavagem dos poços com PBS pH 7,4, adicionou-se 50 µL de citrato de sódio 0,1M pH 4,2 . O sobrenadante foi transferido para outra placa e sua absorbância lida em comprimento de onda de 550 nm. Os resultados foram expressos em absorbância/$1x10^5$ células.

3.21 Teste de espraiamento de células da cavidade peritonial

Células da cavidade peritonial obtidas de acordo com o descrito no item 3.15 foram plaqueadas na concentração de $5x10^5$/mL em placa de cultura de 24 poços contendo, em cada poço, uma lamínula de vidro redonda e estéril. A placa foi incubada durante 1 hora, a 37°C, 5% CO_2 e em atmosfera úmida. Após este tempo, os poços foram lavados com meio de cultura a fim de se remover as células não aderentes e enriquecer a preparação com macrófagos peritoniais (PAPADIMITRIOU; BRUGGEN, 1988). As células aderidas foram cultivadas na presença ou ausência de 1,25 µg/mL de LPS (cepa O55:B5) (SIGMA-ALDRICH), durante 2 e 24 horas a 37°C e 5% CO_2. Após a incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS pH 7,4 e coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947) para avaliação morfológica das células presentes na preparação. Foram consideradas como células espraiadas aquelas que estavam aderidas à lamínula emitindo pseudópodes (RABINOVITCH; DESTEFANO, 1973).

3.22 Teste de fagocitose e atividade fungicida, *in vitro*, de células peritoniais

3.22.1 Obtenção de soro homólogo normal (SHN)

Após serem anestesiados de acordo com o descrito no item 3.4.1, procedeu-se à coleta de sangue de 10 camundongos Swiss, machos, adultos por punção axilar, sem uso de anticoagulante. Após retração do coágulo, o sangue foi centrifugado (2000 rpm, durante 20 minutos, a 4°C) para obtenção do soro. Com as amostras constituiu-se um *pool*, que foi filtrado e esterilizado em condições assépticas, utilizando-se membrana de 0,22 μm, e posteriormente fracionado em volumes de 2 mL e armazenado a -80°C até o uso. O soro obtido nessas condições foi utilizado para opsonização de *Cândida albicans*. Todo o processamento foi realizado em condições assépticas, sendo que os materiais utilizados estavam estéreis.

3.22.2 Preparo e opsonização da suspensão de *Candida albicans*

As leveduras foram obtidas após cultura de 24 horas em meio ágar-Sabouraud (Difco®). A suspensão de *Candida albicans* foi preparada em 3 mL de tampão PBS Dulbecco estéril (pH 7,4) e mantida durante 3 minutos em tubo Falcon®. Após este tempo, o sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo Falcon® (constituindo a **Suspensão A**). A partir da suspensão A, foi preparada uma nova suspensão de *Candida albicans* em PBS Dulbecco estéril (pH 7,4) e SHN, perfazendo um total de $3,75 \times 10^6$/1,5 mL (constituindo a **Suspensão B**). Esta suspensão foi incubada a 37°C, sob agitação de 10 rpm, durante 30 minutos. Todo esse procedimento foi realizado em condições assépticas e empregando-se materiais estéreis.

3.22.3 Obtenção da suspensão de células peritoniais

Animais anestesiados conforme descrito no item 3.4.1 foram exsanguinados por venossecção e sacrificados por deslocamento cervical. Células da cavidade peritonial foram obtidas de acordo com o descrito no item 3.15. A suspensão de células foi ajustada para a concentração de 0,75 x 10^6/mL e mantida no gelo até o momento do uso (constituindo a **Suspensão C**).

3.22.4 Ensaios de fagocitose e de atividade fungicida

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

Tabela 5 - Valores de escore para atividade fungicida

RESULTADO	ESCORE
nº de macrófagos com zero *Candida albicans* morta	x0
nº de macrófagos com 1 a 2 *Candida albicans* mortas	X1
nº de macrófagos com 3 a 4 *Candida albicans* mortas	X2
nº de macrófagos com + 4 *Candida albicans* mortas	X3

3.23 Avaliação da expressão do receptor de LPS

Em amostras de células peritoniais obtidas de acordo com o descrito no item 3.15, os antígenos de superfície CD14 e TLR4/MD2 foram detectados por citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos. Uma vez que se desejava avaliar a expressão desses antígenos em macrófagos, também foi utilizado anticorpo anti-F4/80, que é um marcador de macrófagos murinos (Tabela 6).

Após a coleta, a viabilidade das células do lavado peritonial foi determinada com azul de tripano 0,1% e alíquotas de $1,5x10^6$/mL foram incubadas a 37°C, 5%CO_2 e em atmosfera úmida, durante 1 hora na presença ou ausência de 1,25 µg/mL de LPS (cepa O55:B5) (SIGMA-ALDRICH). As amostras foram lavadas com PBS-BSA-azida (BSA 0,5% e azida 0,01%) e incubadas com 5 uL de anticorpos monoclonais durante 20 minutos, sob agitação, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz (Tabela 7). Após este período, foram centrifugadas (1500 rpm, 4°C, durante 5 minutos) e lavadas duas vezes com PBS-BSA-azida. Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspenso em 500 µL de PBS-BSA-azida e submetido à análise por citometria de fluxo em um citômetro modelo FACS Calibur (BD) com um laser de argônio (488 nm). Os resultados foram analisados empregando-se o programa Cell Quest. Foram utilizados controles de cadeia conjugados aos fluorocromos PE e FITC (Tabela 6). A viabilidade das amostras utilizadas foi sempre superior a 90%.

Tabela 6 - Anticorpos monoclonais

ANTICORPOS MONOCLONAIS		
Anticorpo	**Cadeia**	**Fluorocromo**
CD14 clone rmC53 (BD Biosciences)	Rat IgG1a, κ	FITC
TLR4/MD2 clone MTS510 (eBiosciences)	Rat IgG2a, κ	PE
F4/80 clone BM8 (eBiosciences)	Rat IgG1a, κ	FITC
F4/80 clone BM8 (eBiosciences)	Rat IgG2a, κ	PE

Tabela 7 – Imunofenopipagem

TUBO	MARCAÇÃO
Células peritoniais não estimuladas	CD14 FITC
Células peritoniais estimuladas por LPS	F4/80 PE
Células peritoniais não estimuladas	TLR4/MD2 PE
Células peritoniais estimuladas por LPS	F4/80 FITC
Células peritoniais não estimuladas	CD14 FITC
Células peritoniais estimuladas por LPS	TLR4/MD2 PE

3.24 Avaliação da via de ativação do fator de transcrição NFκB

A expressão das proteínas MyD88, TRAF-6, IκKβ, IκBa e NFκB, bem como das formas fosforiladas de IκBa e NFκB, foi determinada pela técnica de *Western Blotting"*em SDS-PAGE.

3.24.1 Obtenção de células peritoniais e preparo do lisado de proteínas

Células da cavidade peritonial obtidas e cultivadas por 30 minutos de acordo com os itens 3.15 e 3.16, foram utilizadas no preparo do lisado de proteínas. Após lavagem com PBS pH 7,4, as células foram mantidas em 150 µL de tampão de extração RIPA (PIERCE®) contendo inibidores de proteases e fosfatases (PMSF 1mM, NaF 50mM, β-glicerolfosfato 4mM, leupeptina 10µ/mL e aprotinina 10µ/mL) durante 1 hora, a 4°C, sob agitação. A suspensão obtida foi centrifugada (14000xg durante 15 minutos, a 4°C), sendo 25 µL do sobrenadante separados para determinação da concentração de proteínas e 120 µL misturados ao tampão Laemmli (300mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 10%, glicerol 50%, β-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,01%), na proporção de 4:1 (amostra - tampão). A mistura foi levada à ebulição durante 5 minutos, resfriada e armazenada a -40°C até ser submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.24.2 Quantificação da concentração de proteínas

A concentração protéica das amostras obtidas conforme descrito no item anterior foi determinada utilizando-se o Pierce® BCA Protein Assay *kit*, que se baseia na reação de biureto.

3.24.3 Preparo do gel de poliacrilamida e realização da eletroforese

Para a realização da eletroforese, foram preparados géis em bicamada. A camada superior (gel de empilhamento) foi composta por acrilamida 5%, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1%. A camada inferior (gel de separação) foi constituída por acrilamida 10%, 380 mM Tris-HCl pH 8,8, SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1%. Como padrão de peso molecular, foi utilizado *Rainbow Molecular Weight Marker* (Amersham®). As amostras foram aplicadas no gel na concentração de 5 a 10 µg/poço. A eletroforese foi realizada com uma voltagem de 60 a 90V no gel de empilhamento, e 150 a 170V no gel de separação.

3.24.4 Transferência de proteínas para a membrana de PVDF

A transferência foi realizada em sistema semi-seco, sendo a membrana de PVDF ativada durante 1 minuto em metanol PA antes do uso. Após os papéis de filtro (3 mm, Whatman®) ficarem embebidos em tampão de transferência (Tris base 0,3%, glicina 1,44%, metanol PA 20%), procedeu-se à montagem do "sanduíche" da seguinte forma: 3 a 5 folhas de papel de filtro, membrana de PVDF (ativada em metanol PA), gel, 3 a 5 papéis de filtro. A Transferência foi realizada sob corrente de 70 mA, de 60 a 105 minutos.

A eficiência da transferência foi confirmada corando-se a membrana por 5 a 10 minutos com Ponceau (Ponceau 0,1%, ácido acético glacial 1%) e verificando-se o aparecimento de bandas de cor avermelhadas.

3.24.5 *Imunoblotting*

Após lavagem da membrana com TBS-Tween (0,24% Tris-HCl pH 7,60, cloreto de sódio 0,8%, Tween 0,1%), os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados com leite desnatado Molico® 5% (em tampão TBS-Tween) por 90 minutos, sob agitação. Em seguida ao

bloqueio, a membrana foi novamente lavada com TBS-Tween e incubada "overnight" com anticorpo primário específico diluído em TBS-Tween (1: 1000 para NFκB (Cell Signaling®), TRAF-6 (Chemicon®), IκKβ (Cell Signaling®) e NFκB fosforilado (Cell Signaling®); 1:250 para MyD88 (Upstate®), IκBa (Cell Signaling®) e IκBa fosforilado (Cell Signaling®)). A membrana foi novamente lavada com TBS-Tween e incubada com anticorpos secundários anti-IgG de coelho ou camundongo conjugados à peroxidase de raiz forte, diluídos 1:2000 em TBS-Tween, durante 1 hora, sob agitação.

3.24.6 Revelação com sistema quimioluminescente

Após lavagem da membrana com TBS-Tween, a revelação foi realizada utilizando-se o "kit" ECL Plus (Amersham®) (luminol, fenol e peróxido de hidrogênio), com aquisição da imagem e análise no digitalizador de imagem ImageQuant 400 (GE Healthcare®).

3.25 Determinação da ativação do fator NFκB

A ativação de NFκB foi determinada pela técnica de EMSA ("Eletrophoretic Mobility Shift Assay").

3.25.1 Obtenção de células peritoniais e execução do EMSA

Células da cavidade peritonial obtidas de acordo com o descrito no item 3.15 e cultivadas por 30 minutos de acordo com o item 3.16, na concentração de $5x10^6$ células/mL, foram extraídas com tampão de extração nuclear a fim de separar a fração nuclear onde se localiza a forma ativa do fator de transcrição NFκB. Uma alíquota dessa fração foi separada para determinação da concentração de proteínas sendo o restante armazenado a -80°C.

A sonda para ligação foi preparada incubando-se oligonucleotídeos, T4 polinucleotídeo quinase (BMI Fermentas®) e [P^{32}] ATP, durante 90 minutos, a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de tampão de extração e o produto foi passado em coluna MicroSpin S-300 HR (Amersham®). A fração com maior radioatividade foi utilizada no ensaio.

Na etapa seguinte, 10 µg de extrato nuclear foram incubados por 20 minutos à temperatura ambiente, em tampão de ligação (glicerol 4%, $MgCl_2$ 0,3 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, 0,1 mg/mL de DNA de timo de bezerro) com oligonucleotídeos NF-κB consenso e a sonda preparada.

As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 6% e a eletroforese foi realizada a 80V nos primeiros 30 minutos e a 150V durante 90 minutos. A emissão de radiação das amostras foi avaliada após exposição ao filme fotográfico por 1 semana. Os oligonucleotídeos que se ligaram ao NFκB apresentaram-se como bandas retardadas durante a eletroforese em comparação aos oligonucleotídeos livres.

3.26 Análise estatística

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade e classificados em paramétricos ou não paramétricos, de acordo com sua distribuição em relação à curva de Gauss. Posteriormente, foram submetidos ao teste t, comparando-se os grupos experimentais dois a dois. Foram consideradas significativas as análises que apresentaram $p \leq 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prisma versão 4.0.

4. RESULTADOS

4.1 Concentração de proteína das rações

A concentração média de proteína das rações utilizadas ao longo do experimento foi 12,89% ± 1,04 para a dieta normoprotéica (20 lotes) e 2,58% ± 0,29 (20 lotes) para a dieta hipoprotéica. Ambas as concentrações diferem estatisticamente ($p<0,0001$).

4.2 Avaliação do estado nutricional

4.2.1 Análise do consumo de ração, proteínas e água

Em ambas as linhagens de camundongos estudadas, embora o Grupo Desnutrido tenha apresentado maior consumo de ração em relação ao Grupo Controle PD esse aumento não se refletiu em maior consumo de proteínas. Ao contrário, o consumo desse nutriente foi significativamente inferior ao dos animais controles, visto que a ração hipoprotéica apresenta apenas 2% de proteína em sua composição (Figuras 3A, 3B, 4A e 4B). Além disso, a avaliação do consumo de água dos camundongos **Swiss Webster** mostrou aumento significativo do consumo de água dos animais desnutridos em relação aos animais controles (Figura 3C).

O Grupo Renutrido apresentou o mesmo comportamento em ambas as linhagens. O consumo de ração e proteínas retornou ao normal, sendo semelhante ao apresentado pelo Grupo Controle PR (Figuras 3A, 3B, 4A e 4B). A normalização do comportamento alimentar estaria relacionada ao restabelecimento da quantidade adequada de proteína na ração, enquanto o aumento da ingestão de proteínas seria o reflexo da ingestão de uma ração com concentração protéica de 12%. Por outro lado, o consumo de água do Grupo Renutrido não retornou ao normal, permanecendo semelhante ao do Grupo Desnutrido (Figura 3C).

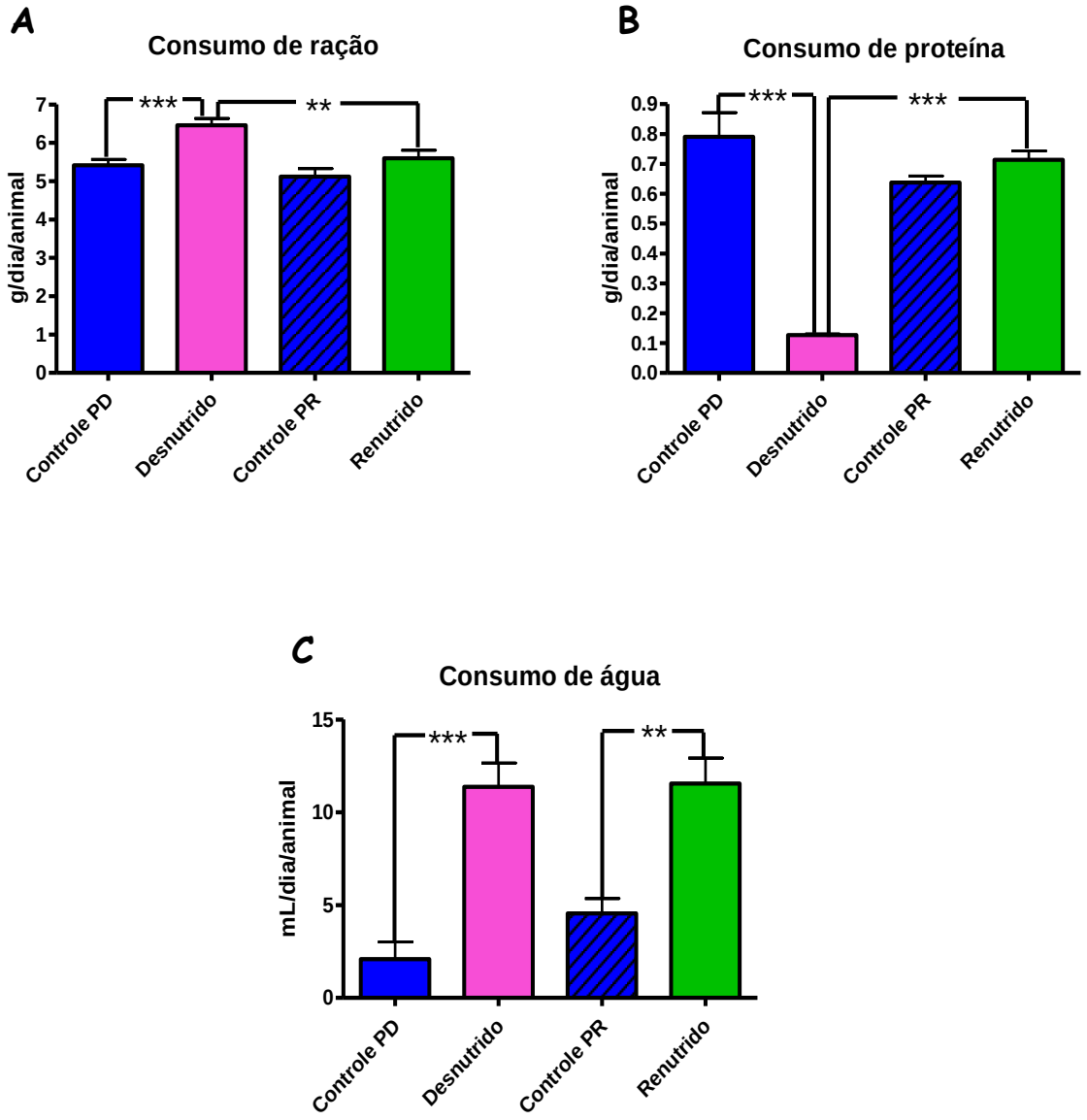


Figura 3. Resultados, em valores médios±SDM, do consumo de ração (A), proteínas (B) e água (C) de **camundongos Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=19), Desnutrido (n=29), Controle PR (n=18) e Renutrido (n=27). ** Valores significativos para p<0,01; *** Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais avaliados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

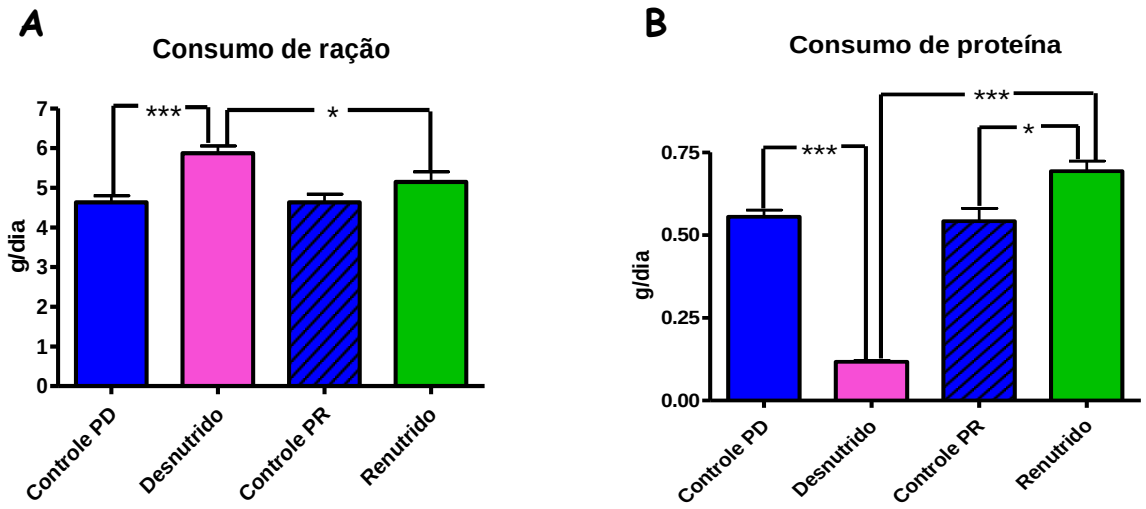
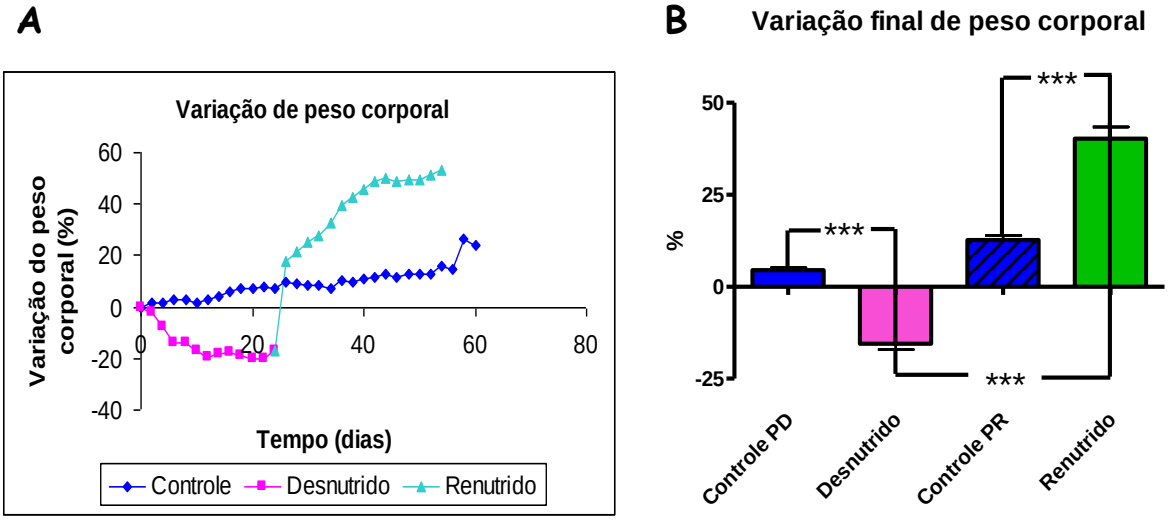


Figura 4. Resultados, em valores médios±SDM, do consumo de ração (A) e proteínas (B) de **camundongos C57BL/6J** dos grupos Controle PD (n=17), Desnutrido (n=27), Controle PR (n=18) e Renutrido (n=29). * Valores significativos para p<0,05; *** Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais avaliados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

4.2.2 Análise do peso corporal

Após o período de adaptação, os animais de ambas as linhagens foram separados nos grupos controle e desnutrido, sendo a média de peso corporal entre estes dois grupos estatisticamente semelhante. Para camundongos **Swiss Webster**, obteve-se 41,65 ± 4,62 e 42,08 ± 2,86, respectivamente, sendo p=0,93; para camundongos **C57BL/6J**, as médias foram 25,42 ± 2,04 e 25,46 ± 2,47, respectivamente, sendo p=0,91, de acordo com o teste t não pareado bicaudal. O cuidado para que os grupos controle e desnutrido tivessem média de peso corporal semelhante no início do processo de desnutrição foi para evitar variações de consumo de água e ração relativas às diferenças de peso corporal entre esses grupos. Em ambas as linhagens, ao final do período de desnutrição, houve redução significativa do peso corporal dos animais do Grupo Desnutrido em relação aos animais do Grupo Controle PD, evidenciando a influência da baixa ingestão de proteínas nesse parâmetro (Figuras 5A, 5B, 5C, 5D e Tabelas 8A e 8B). Ao final do período de desnutrição, a perda de peso corporal dos animais desnutridos foi 15,52% ± 5,43 (média ± SDM), enquanto os animais controles apresentaram ganho de peso corporal de 4,47% ± 2,42 (média ± SDM), ambos em relação ao peso inicial (ou seja, o peso que possuíam no início do processo de desnutrição) (Figuras 5B e 5D). Ao final do período de renutrição, os animais do Grupo Renutrido apresentaram aumento significante de peso corporal em relação ao Grupo Desnutrido, sendo que na linhagem **Swiss Webster,** o ganho de peso foi superior ao do Grupo Controle PR (40,28% ± 12,07 e 12,71% ± 12,07, média ± SDM, respectivamente) (Figuras 5A, 5B, 5C, 5D e Tabelas 8A e 8B). Esse comportamento reflete o aumento de consumo de proteínas pelos animais renutridos.

Camundongos Swiss Webster



Camundongos C57BL/6J

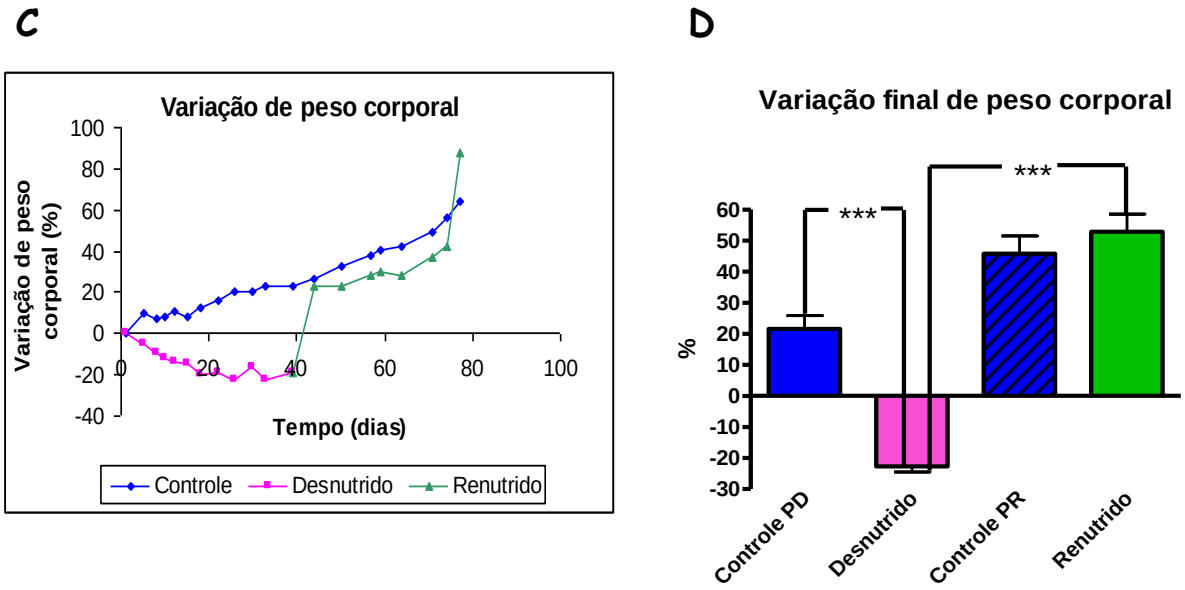


Figura 5. Resultados representam variação de peso corporal em função do tempo (A) e (C) e variação final do peso corporal (média±SDM) (B) e (D) de **camundongos Swiss Webster** e **C57BL/6J** dos grupos Controle PD (n=16), Desnutrido (n=27), Controle PR (n=18) e Renutrido (n=29). *** Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais avaliados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

Tabela 8A - Peso corporal ao longo do protocolo experimental (Swiss Webster)

Grupo experimental	Peso corporal inicial (Média ± SDM)	Peso corporal ao final do Período de Desnutrição (Média ± SDM)	Peso corporal ao final do Período de Renutrição (Média ± SDM)
Controle PD (n=19)	43,85 g ± 4,46	53,75 g ± 2,60	_____
Desnutrido (n=29)	41,87 g ± 2,91	37,29 g ± 3,19	_____
Controle PR (n=18)	38,90g ± 2,96	_____	44,64g ± 5,34
Renutrido (n=27)	42,09 g ± 2,95	30,66 g ± 1,56	47,04 g ± 5,06

Tabela 8B – Peso corporal ao longo do protocolo experimental (C57BL/6J)

Grupo experimental	Peso corporal inicial (Média ± SDM)	Peso corporal ao final do Período de Desnutrição (Média ± SDM)	Peso corporal ao final do Período de Renutrição (Média ± SDM)
Controle PD (n=16)	24,27 g ± 2,72	32,70 g ± 1,96	_____
Desnutrido (n=27)	24,08 g ± 3,52	20,60 g ± 4,37	_____
Controle PR (n=18)	24,23 g ± 0,72	_____	38,65g ± 2,75
Renutrido (n=29)	23,92 g ± 1,44	20,40 g ± 3,54	35,14 g ± 3,16

Resultados, em valores médios±SDM, do peso corporal de camundongos **Swiss Webster e C57BL/6J** dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido no início do período experimental e no fim dos processos de desnutrição e renutrição. **n** representa número de animais avaliados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição. n representa número de animais avaliados

4.2.3 Avaliação da concentração sérica de proteínas totais e albumina

Ambas as linhagens de camundongos apresentaram o mesmo comportamento em relação à concentração de proteínas totais e albumina. Em camundongos **Swiss Webster**, houve redução significativa da concentração de proteínas totais e albumina do Grupo Desnutrido (5,26 g/dL ± 0,50 e 1,75 g/dL ± 0,19, respectivamente) em relação ao Grupo Controle PD (6,06 g/dL ± 1,28 e 2,17 g/dL ± 0,27, respectivamente). Da mesma forma, em camundongos **C57BL/6J** também verificou-se diminuição significante da concentração de proteínas totais e albumina do Grupo Desnutrido (3,72 g/dL ± 0,71 e 1,59 g/dL ± 0,22, respectivamente) em relação ao Grupo Controle PD (5,12 g/dL ± 1,34 e 2,27 g/dL ± 0,36, respectivamente). O comportamento apresentado pelo Grupo Desnutrido é decorrente da baixa ingestão de proteínas e indica quadro de desnutrição protéica (Figuras 6A, 6B, 6C e 6D). Após o retorno a uma dieta normoprotéica, novamente o comportamento foi semelhante nas duas linhagens estudadas. Em camundongos **Swiss Webster**, o Grupo Renutrido apresentou aumento da concentração sérica de proteínas totais e albumina (5,96 g/dL ± 0,94 e 2,12 g/dL ± 0,26, respectivamente), sendo que estes parâmetros foram semelhantes aos apresentados pelos animais do Grupo Controle PR (5,92 g/dL ± 0,77 e 2,20 g/dL ± 0,22, respectivamente). Em camundongos **C57BL/6J**, o Grupo Renutrido também apresentou aumento da concentração de proteínas totais e albumina (5,29 g/dL ± 0,58 e 2,00 g/dL ± 0,41, respectivamente), igualando os valores obtidos pelo Grupo Controle PR (5,38 g/dL ± 1,53 e 1,98 g/dL ± 0,47, respectivamente (Figuras 6A, 6B, 6C e 6D). Esses resultados evidenciam que o restabelecimento da quantidade normal de proteína na ração levou à normalização da síntese de proteínas totais e albumina, aparentemente revertendo o quadro de desnutrição protéica.

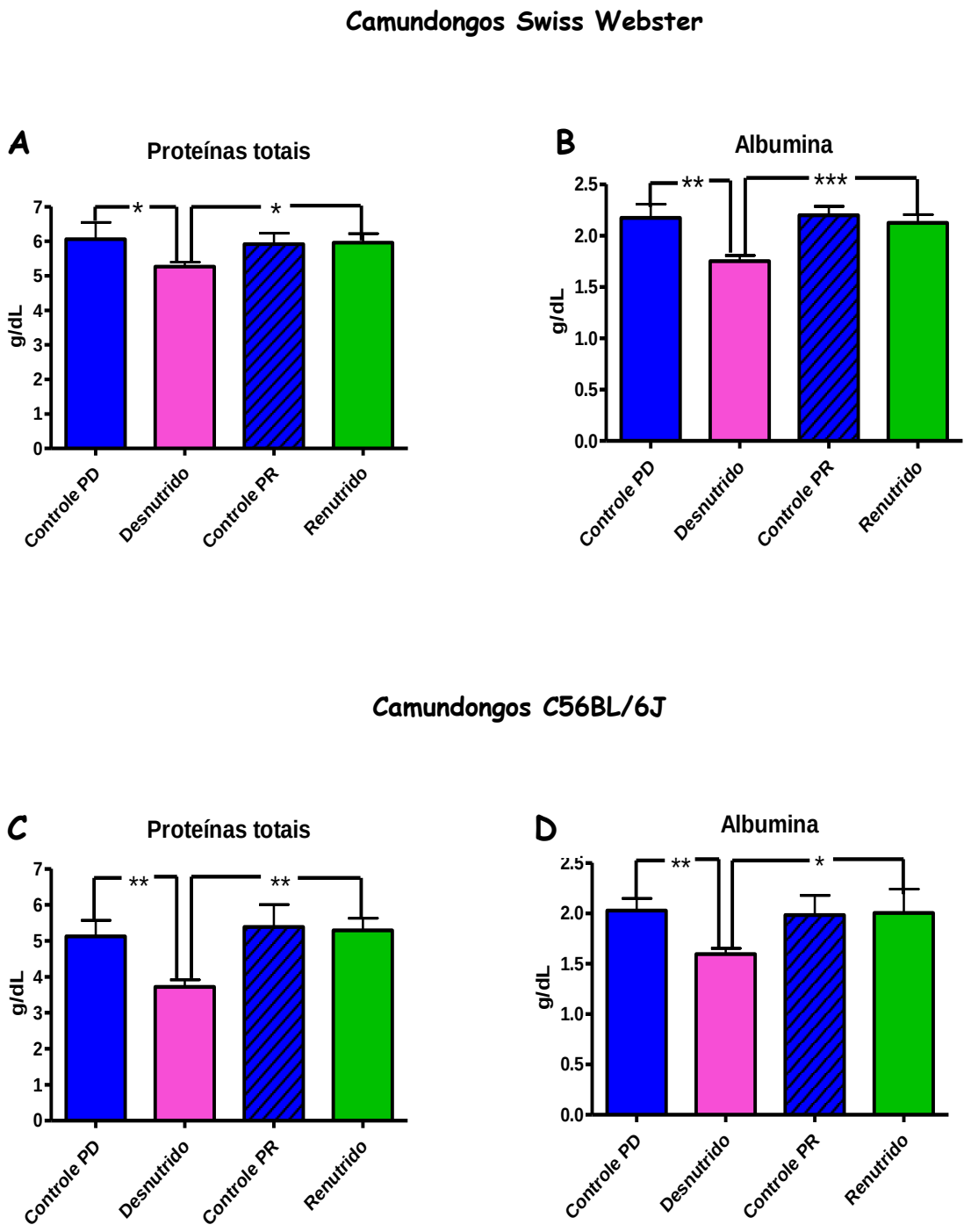


Figura 6. Resultados, em valores médios±SDM, da concentração sérica de proteínas totais (A) e (C) e albumina (B) e (D) de **camundongos Swiss Webster** e **C57BL/6J** dos grupos Controle PD (n=9), Desnutrido (n=15), Controle PR (n=6) e Renutrido (n=11) * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,01. **n** representa número de animais avaliados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

4.2.4 Avaliação da concentração sérica de glicose e insulina

Em animais **Swiss Webster** o Grupo Desnutrido apresentou comportamento hipoglicêmico (73,21 mg/dL ± 12,61) em relação ao Grupo Controle PD (146,70 mg/dL ± 23,05). Após o período de renutrição, a glicemia do Grupo Renutrido (116,20 mg/dL ± 22,69) aumentou quando comparada ao Grupo Desnutrido, porém, continuou significativamente inferior à apresentada pelo Grupo Controle PR (148,30 mg/dL ± 15,44) (Figura 7).

Após o período de desnutrição a concentração sérica de insulina dos animais do Grupo Desnutrido foi significativamente inferior à dos animais do Grupo Controle PD (0,10 ng/mL ± 0,09 e 2,05 ng/mL ± 0,74, respectivamente) em decorrência da baixa ingestão de proteína. Por outro lado, o retorno a uma dieta normoprotéica levou ao aumento significante de insulina sérica do Grupo Renutrido (0,45 ng/mL ± 0,37) comparado com o Grupo Desnutrido. Esse aumento, porém, não foi suficiente para normalizar os níveis de insulina, visto que a concentração de insulina sérica permaneceu significantemente inferior à do Grupo Controle PR (2,23 ng/mL ± 1,19), indicando uma reversão parcial da insulinemia encontrada nos animais submetidos ao processo de renutrição (Figura 8).

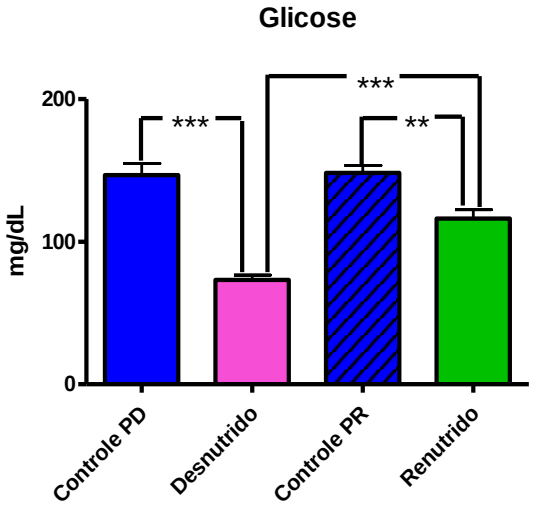


Figura 7. Resultados, em valores médios±SDM, da concentração sérica de glicose de camundongos **Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=9), Desnutrido (n=15), Controle PR (n=9) e Renutrido (n=13). ** Valores significativos para p<0,01. *** Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais avaliados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

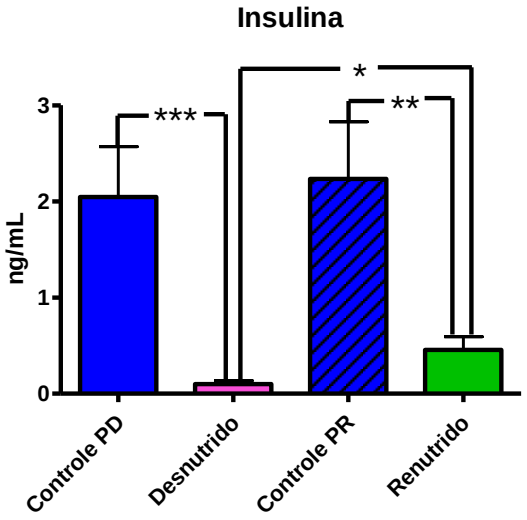


Figura 8. Resultados, em valores médios±SDM, da concentração sérica de insulina dos camundongos **Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=4), Desnutrido (n=8), Controle PR (n=4) e Renutrido (n=7). * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,01. *** Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

4.2.5 Avaliação da tolerância oral à glicose (OGTT) e da tolerância à insulina (ITT)

Em camundongos **Swiss Webster,** os animais do Grupo Desnutrido apresentaram maior tolerância à administração oral de glicose em comparação ao Grupo Controle PD. Esse comportamento pode ser evidenciado tanto na análise da glicose sérica ao longo do tempo avaliado (Figura 9A), quanto na análise da área sob a curva (AUC) (Figura 9B). Após o restabelecimento da ração normoprotéica, o Grupo Renutrido continuou apresentando o mesmo comportamento do Grupo Desnutrido, mostrando maior tolerância à glicose em relação ao grupo Controle PR (Figuras 9A e 9B).

Após o teste de ITT, o Grupo Desnutrido apresentou menor K_{itt} (constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática) em relação ao Grupo Controle PD, evidenciando maior sensibilidade à insulina. O Grupo Renutrido, por sua vez, manteve o mesmo comportamento apresentado pelo Grupo Desnutrido. Dessa forma, é possível observar que, mesmo após o período de renutrição, a sensibilidade à insulina permaneceu alterada (Figura 10).

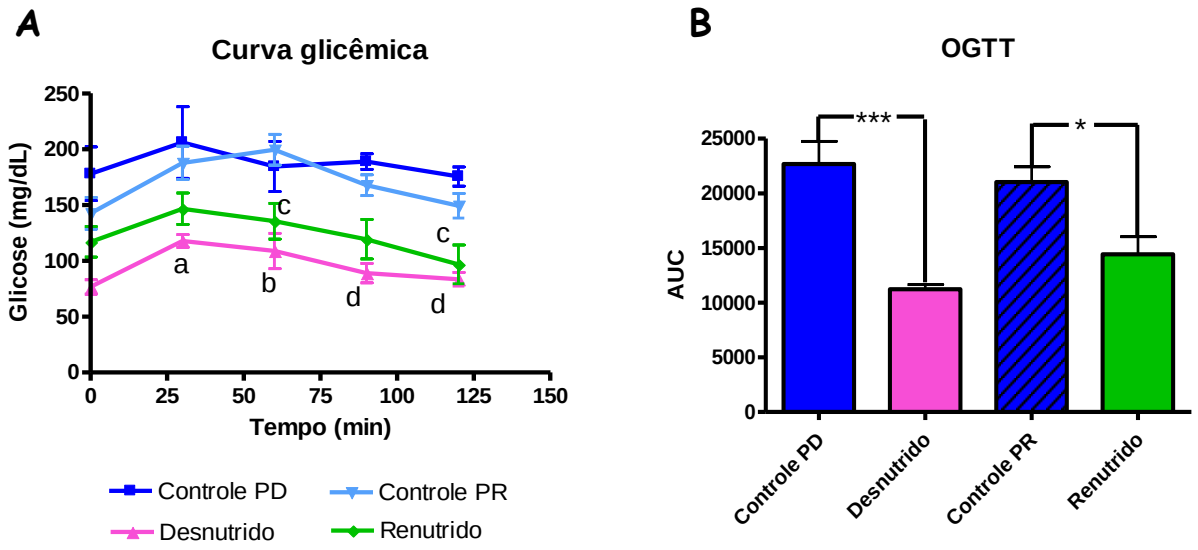


Figura 9. Resultados, em valores médios±SDM, da concentração sérica de glicose (A) e área sob a curva da glicemia ao longo do tempo (B) dos **camundongos Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=4), Desnutrido (n=5), Controle PR (n=4) e Renutrido (n=5). * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,01. [a] p<0,01 quando compara-se Grupo Desnutrido e Grupo Controle PD. [b] p<0,05 quando compara-se Grupo Desnutrido com Grupo Controle PD. [c] p<0,05 quando compara-se Grupo Renutrido com Grupo Controle PR. [d] p<0,001 quando compara-se Grupo Desnutrido com Grupo Controle PD. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

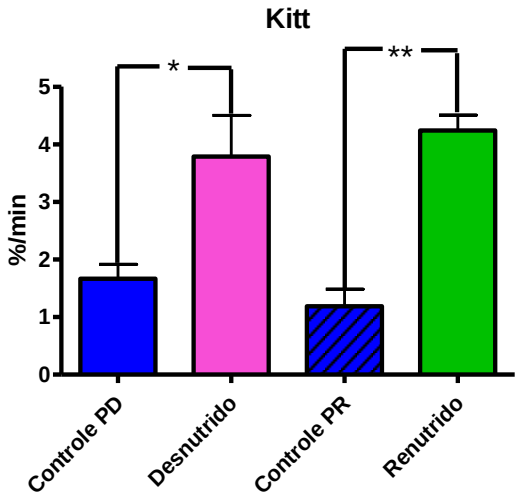


Figura 10. Resultados, em valores médios±SDM, do K_{itt} dos camundongos **Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=4), Desnutrido (n=5), Controle PR (n=4) e Renutrido (n=5). * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,01. n representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

4.2.6 Avaliação da concentração sérica de IGF-1

Camundongos **Swiss Webster** pertencentes ao Grupo Desnutrido apresentaram redução significativa da concentração sérica de IGF-1 em relação aos animais do Grupo Controle PD (477,5 ng/mL ± 78,71 e 938,7 ng/mL ± 62,20, respectivamente) em decorrência da baixa ingestão de proteínas. Esse quadro foi parcialmente revertido após o processo de renutrição, visto que o Grupo Renutrido mostrou aumento significante desse hormônio em relação ao Grupo Desnutrido (697,1 ng/mL ± 52,72 e 477,5 ng/mL ± 78,71, respectivamente). No entanto, esses valores permaneceram inferiores aos apresentados pelos animais do Grupo Controle PR (902,9 ng/mL ± 137,2), indicando que o restabelecimento da quantidade normal de proteína na ração não foi suficiente para normalizar a produção de IGF-1 (Figura 11).

4.2.7 Avaliação da concentração sérica de corticosterona

A redução da quantidade de proteína na ração hipoprotéica promoveu aumento significativo da concentração de corticosterona sérica em camundongos **Swiss Webster** do Grupo Desnutrido em relação aos animais do Grupo Controle PD (113,8 ng/mL ± 47,06 e 14,75 ng/mL ± 13,65, respectivamente) devido ao estresse metabólico gerado pelo quadro de desnutrição protéica (Figura 12). Após o período de renutrição, os animais do Grupo Renutrido apresentaram redução dos níveis do glicocorticóide, alcançando os valores apresentados pelos animais do Grupo Controle PR (8,43 ng/mL ± 3,25 e 17,80 ng/mL ± 13,02, respectivamente) (Figura 12). Esse quadro indica que o retorno à concentração adequada de proteína a ração levou a uma redução do estresse fisiológico dos animais renutridos, tendo como reflexo a redução da liberação desse hormônio na circulação.

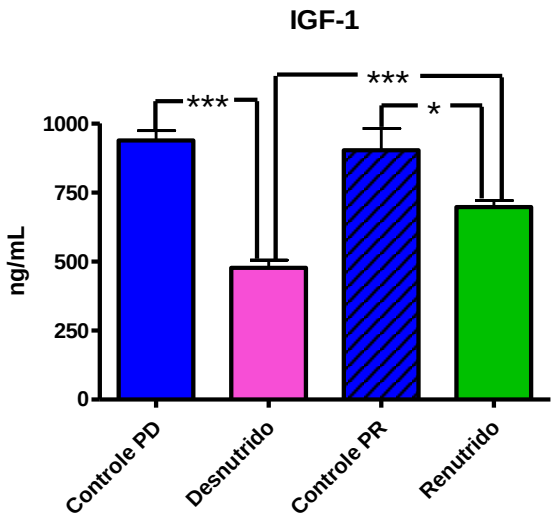


Figura 11. Resultados, em valores médios±SDM, da concentração sérica de IGF-1 dos **camundongos Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=3), Desnutrido (n=8), Controle PR (n=3) e Renutrido (n=5). * Valores significativos para p<0,05. *** Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

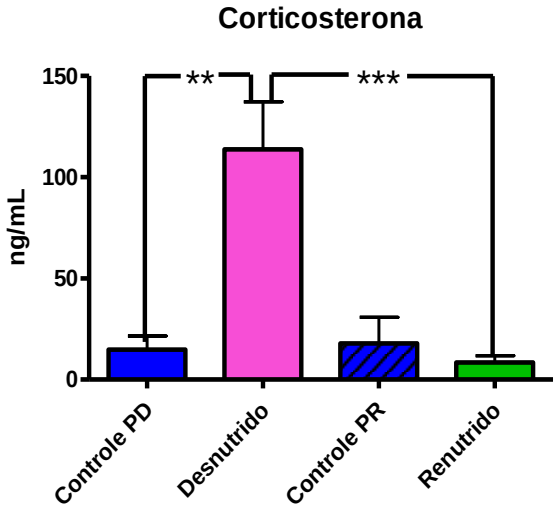


Figura 12. Resultados, em valores médios±SDM, da concentração sérica de corticosterona dos **camundongos Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=5), Desnutrido (n=4), Controle PR (n=5) e Renutrido (n=7). ** Valores significativos para p<0,01. *** Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

4.2.8 Análise do metabolismo da glutamina

4.2.8.1 Glutamina plasmática

A concentração plasmática de glutamina de camundongos **Swiss Webster** do Grupo Desnutrido foi significativamente superior àquela apresentada pelo Grupo Controle PD (0,98 mM/L ± 0,18 e 0,75 mM/L ± 0,02, respectivamente). Esse quadro foi revertido após o período de renutrição, visto que houve redução da concentração plasmática desse aminoácido no Grupo Renutrido, sendo semelhante àquela apresentada pelo Grupo Controle PR (0,77 mM/L ± 0,01 e 0,76 mM/L ± 0,02, respectivamente) (Figura 13A).

4.2.8.2 Glutamina muscular

Os camundongos **Swiss Webster** do Grupo Desnutrido apresentaram redução significativa da glutamina muscular em relação ao Grupo Controle PD (5160 µM/g ± 1143 e 11368 µM/g ± 5673, respectivamente) após o período de desnutrição. A concentração muscular desse aminoácido voltou a aumentar no Grupo Renutrido, que apresentou valores semelhantes aos do Grupo Controle PR (10413 µM/g ± 1734 e 8626 µM/g, respectivamente) (Figura 13B).

4.2.8.3 Atividade de glutamina sintetase muscular

A atividade de glutamina sintetase aumentou em decorrência da desnutrição, visto que camundongos **Swiss Webster** do Grupo Desnutrido apresentaram valores significativamente maiores que aqueles apresentados pelo Grupo Controle PD (4,35 µg/h/mg ± 0,87 e 0,55 µg/h/mg ± 0,06, respectivamente). O processo de renutrição promoveu o restabelecimento da atividade normal dessa enzima, uma vez que tanto o Grupo Renutrido quanto o Grupo Controle PR apresentaram valores semelhantes (0,84 µg/h/mg ± 0,21 e 0,85 µg/h/mg ± 0,11) (Figura 13C).

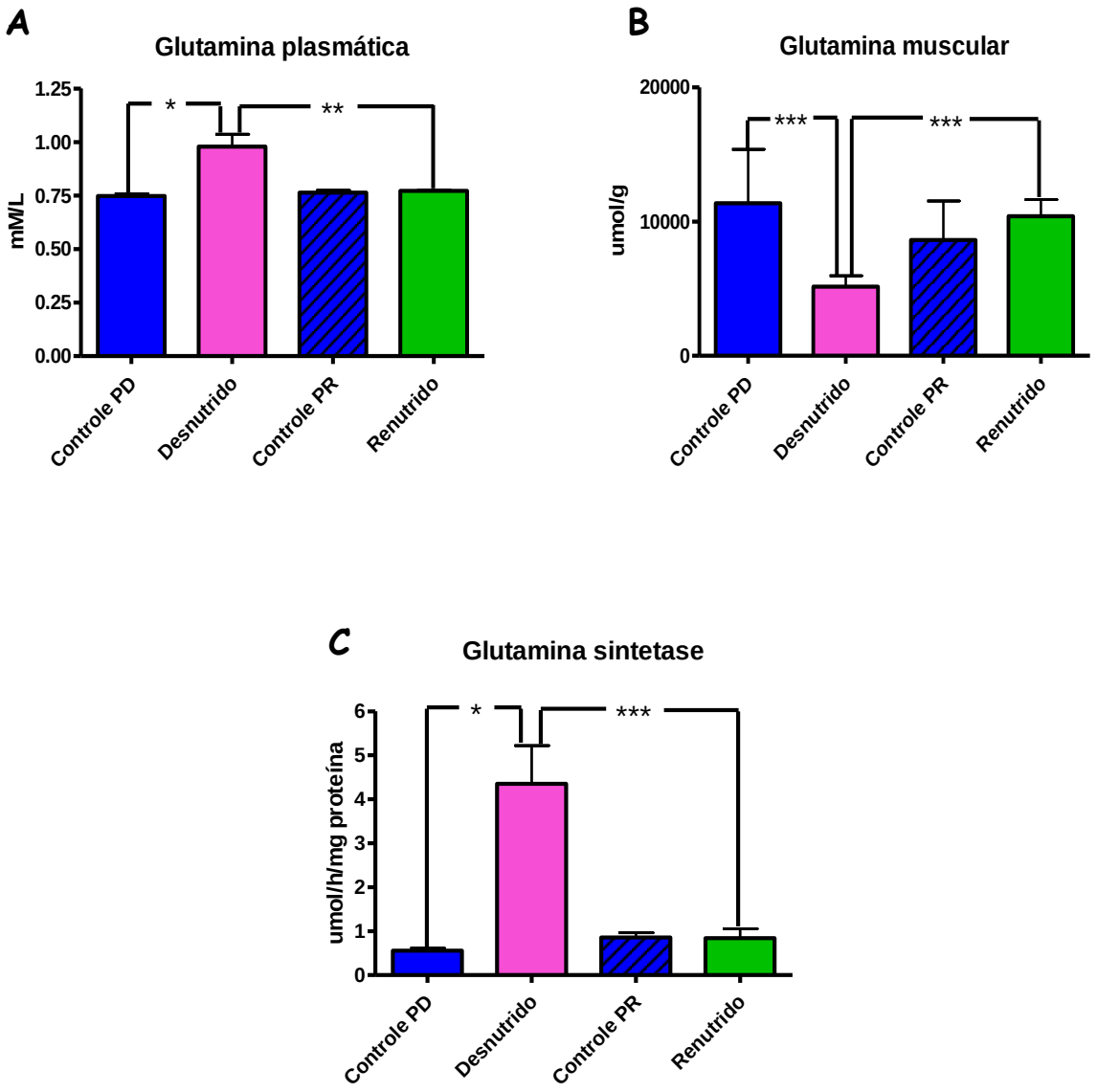


Figura 13. Resultados, em valores médios±SDM, da concentração plasmática de glutamina (A), glutamina muscular (B) e atividade de glutamina sintetase (C) de **camundongos Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=5), Desnutrido (n=10), Controle PR (n=5) e Renutrido (n=10). * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,01. *** Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

4.2.9 Análise de proteína, DNA e RNA totais em fígado e músculo gastrocnêmio

4.2.9.1 Gastrocnêmio

A redução da quantidade de proteína na ração não alterou de forma significativa o peso absoluto e o peso relativo do músculo gastrocnêmio dos grupos experimentais (Tabela 9), porém levou a uma redução do conteúdo total de proteína, DNA e RNA desse músculo nos animais do Grupo Desnutrido (3,25 mg/100 mg tecido ± 0,82; 0,07 µg/100 mg tecido ± 0,03 e 11,15 µg/100 mg tecido ± 2,66, respectivamente) em relação ao Grupo Controle PD (5,21 mg/100 mg tecido ± 0,30; 0,12 µg/100 mg tecido ± 0,03 e 32,74 µg/100 mg tecido ± 15,55, respectivamente). Esses resultados indicam comprometimento da síntese protéica muscular. Após o período de renutrição, os animais do Grupo Renutrido apresentaram aumento significativo da quantidade total de proteínas, DNA e RNA (11,95 mg/100 mg tecido ± 1,13; 0,28 µg/100 mg tecido ± 0,05 e 68,21 µg/100 mg tecido ± 9,02, respectivamente), ultrapassando os valores obtidos pelo Grupo Controle PR (6,52 mg/100 mg tecido ± 1,03; 0,18 µg/100 mg tecido ± 0,05 e 43,90 µg/100 mg tecido ± 15,07, respectivamente), indicando o restabelecimento da síntese protéica (Figuras 14A, 14B e 14C).

Tabela 9 - Peso absoluto e relativo do músculo gastrocnêmio direito

Grupo experimental	Peso absoluto (g)	Peso relativo (g/ g peso corporal)
Controle PD (n=7)	0,30 ± 0,09	0,0063 ± 0,0015
Desnutrido (n=8)	0,24 ± 0,05	0,0064 ± 0,0012
Controle PR (n=7)	0,26 ± 0,04	0,0066 ± 0,0023
Renutrido (n=9)	0,20 ± 0,10	0,0051 ± 0,0026

Resultados, em valores médios±SDM do peso absoluto e relativo do músculo gastrocnêmio direito dos animais dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido. **n** representa número de animais avaliados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

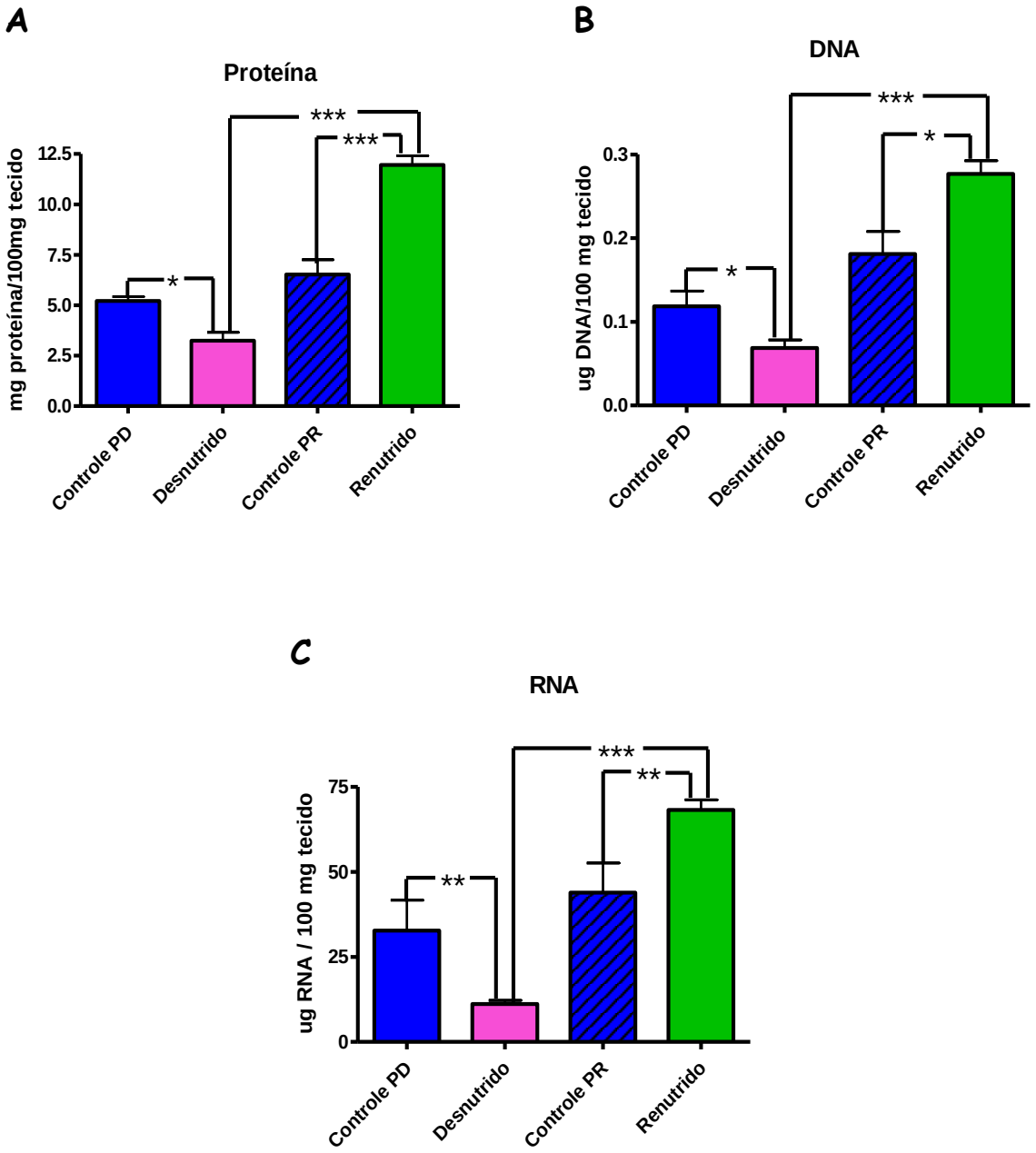


Figura 14. Resultados, em valores médios±SDM, do conteúdo total de proteína (A), DNA (B) e RNA (C) do músculo gastrocnêmio de **camundongos Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=7), Desnutrido (n=8), Controle PR (n=7) e Renutrido (n=9). * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,01. *** Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

4.2.9.2 Fígado

Em termos absolutos, observou-se redução significativa do peso do fígado dos animais **Swiss Webster** do Grupo Desnutrido em comparação aos animais do Grupo Controle PD. Esse quadro foi completamente revertido após o período de renutrição, encontrando-se valores semelhantes para o peso desse órgão tanto no Grupo Renutrido quanto no Grupo Controle PD. No entanto, o peso relativo do fígado foi semelhante entre os grupos experimentais, indicando que o aumento ou redução desse órgão acompanhou o peso corporal dos animais (Tabela 10).

Assim como observado no músculo gastrocnêmio, a redução de proteína na dieta levou a uma redução do conteúdo total de proteína, DNA e RNA do fígado de camundongos **Swiss Webster** do Grupo Desnutrido (29,48 mg/100 mg tecido ± 3,71; 2,13 µg/100 mg tecido ± 0,15 e 131,8 µg/100 mg tecido ± 20,27, respectivamente) em relação ao Grupo Controle PD (6605 mg/100 mg tecido ± 1020; 2,85 µg/100 mg tecido ± 0,20 e 526,9 µg/100 mg tecido ± 49,48, respectivamente). Esses resultados indicam comprometimento da síntese protéica hepática. Após o período de renutrição, os animais do Grupo Renutrido apresentram aumento significativo da quantidade total de proteínas e RNA, mas não de DNA (5413 mg/100 mg tecido ± 750,9; 273,4 µg/100 mg tecido ± 63,64 e 0,84 µg/100 mg tecido ± 0,10, respectivamente), alcançando o Grupo Controle PR em relação aos dois primeiros parâmetros (6,52 mg/100 mg tecido ± 1,03; 43,90 µg/100 mg tecido ± 15,07 e 0,18 µg/100 mg tecido ± 0,05, respectivamente) (Figuras 15A, 15B e 15C).

Tabela 10 - Peso absoluto e relativo do fígado

Grupo experimental	Peso absoluto (g)	Peso relativo (g/ g peso corporal)
Controle PD (n=5)	2,05 ± 0,16	0,040 ± 0,002
Desnutrido (n=6)	1,52 ± 0,07	0,041 ± 0,002
Controle PR (n=5)	2,10 ± 0,28	0,045 ± 0,003
Renutrido (n=6)	2,19 ± 0,11	0,046 ± 0,002

Resultados, em valores médios±SDM do peso absoluto e relativo do fígado dos animais dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido. n representa número de animais avaliados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

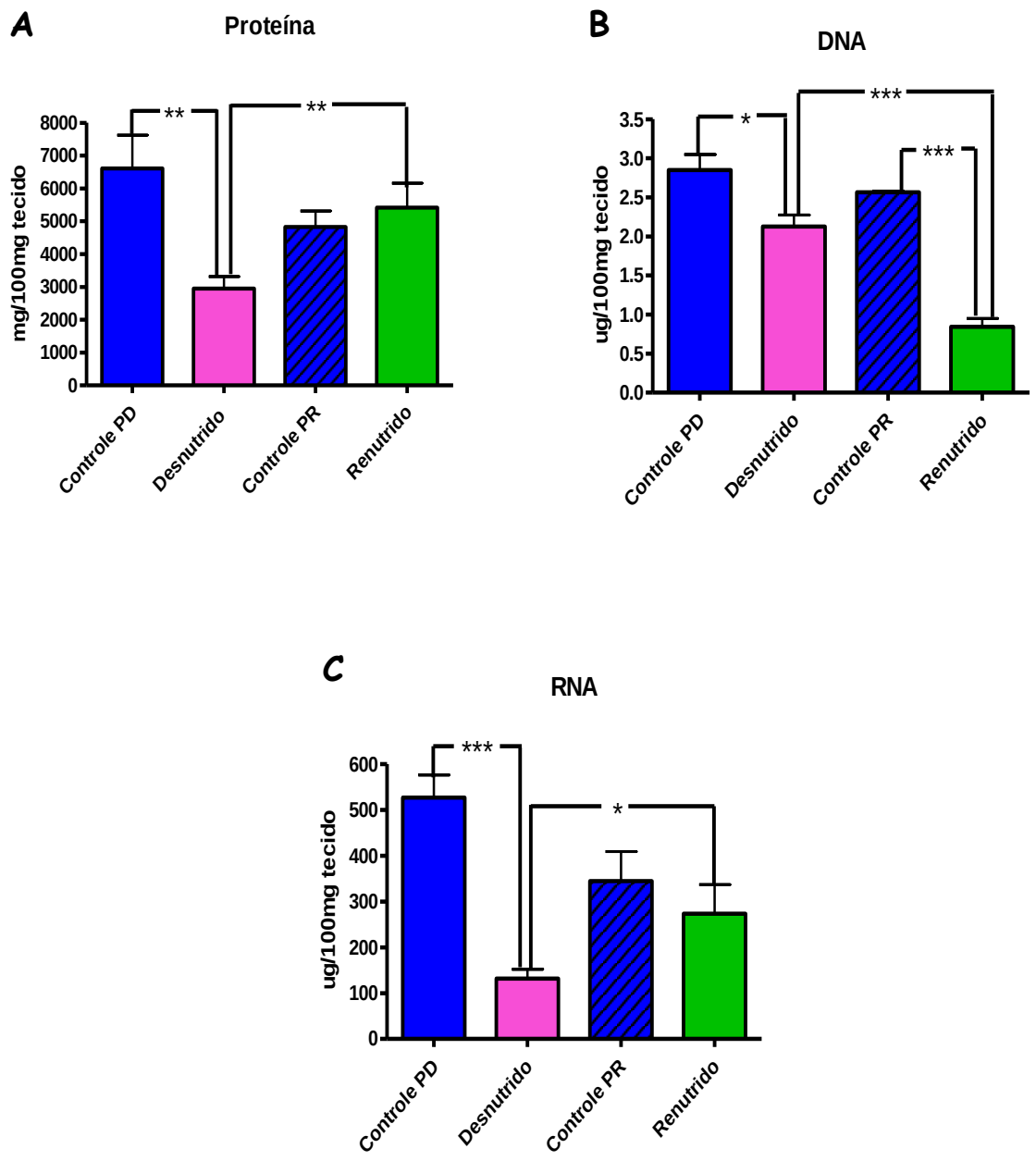


Figura 15. Resultados, em valores médios±SDM, do conteúdo total de proteína (A), DNA (B) e RNA (C) do fígado de **camundongos Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=5), Desnutrido (n=6), Controle PR (n=5) e Renutrido (n=6). * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,01. *** Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

4.3 Avaliação hematológica

4.3.1 Hemograma

4.3.1.1 Eritrograma

Camundongos de ambas as linhagens apresentaram redução dos parâmetros relativos à série eritrocitária após o período de desnutrição, demonstrando que a diminuição do consumo de proteína acarretou em um quadro de anemia. Na linhagem **Swiss Webster**, o Grupo Desnutrido apresentou redução significativa do número de hemácias, volume hematócrito e hemoglobina ($8,09 \times 10^6/mm^3 \pm 0,89$; 34,09% ± 3,45; 11,53g/dL ± 0,83, respectivamente) em relação ao Grupo Controle PD ($9,48 \times 10^6/mm^3 \pm 0,61$; 42,13% ± 6,30; 14,27g/dL ± 1,46, respectivamente) (Figuras 16A, 16B e 16C). Na linhagem **C57BL/6J**, o Grupo Desnutrido apresentou diminuição significativa do número de hemácias, volume hematócrito e hemoglobina ($7,87 \times 10^6/mm^3 \pm 1,02$; 33,96% ± 4,3 e 11,67g/dL ± 1,21, respectivamente) em relação ao Grupo Controle PD ($9,14 \times 10^6/mm^3 \pm 1,53$; 38,28% ± 4,3 e 12,44g/dL ± 0,61, respectivamente) (Figuras 17A, 17B e 17C). O retorno a uma dieta normoprotéica, promoveu reversão de todas as alterações encontradas em ambas as linhagens. Em camundongos **Swiss Webster**, o Grupo Renutrido mostrou aumento significativo do número de hemácias, do volume hematócrito e hemoglobina ($9,55 \times 10^6/mm^3 \pm 1,00$; 10,42% ± 4,18; 13,95g/dL ± 0,91, respectivamente), apresentando valores semelhantes aos encontrados no Grupo Controle PR ($9,61 \times 10^6/mm^3 \pm 0,75$; 41,17% ± 6,74; 13,56g/dL ± 1,14, respectivamente) (Figuras 16A, 16B e 16C). Em animais **C57BL/6J**, o Grupo Renutrido voltou a mostrar aumento significante do número de hemácias, do volume hematócrito e hemoglobina ($8,58 \times 10^6/mm^3 \pm 0,75$; 37,63% ± 3,47; 12,55g/dL ± 0,48, respectivamente), igualando os valores obtidos pelo Grupo Controle PR ($8,57 \times 10^6/mm^3 \pm 0,32$; 38,17% ± 1,89; 12,17g/dL ± 0,49, respectivamente) (Figuras 17A, 17B e 17C). Em relação aos índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM), não foi observada nenhuma diferença entre os grupos de ambas as linhagens. O mesmo foi observado em relação à porcentagem de reticulócitos de camundongos da linhagem **Swiss Webster** (Tabelas 11 e 12).

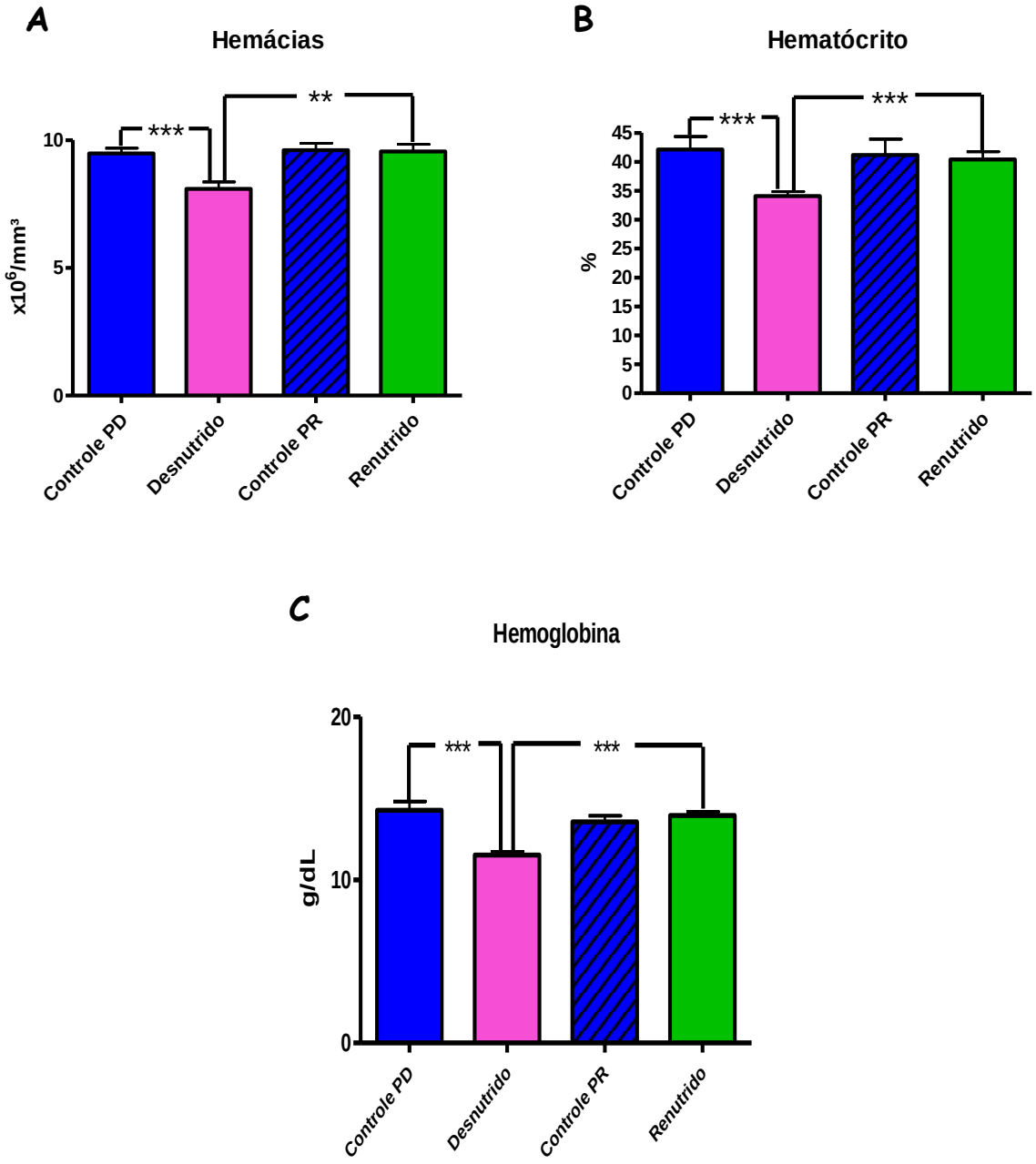


Figura 16. Resultados, em valores médios±SDM, do número de hemácias (A), volume hematócrito (B) e hemoglobina (C) de **camundongos Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=9), Desnutrido (n=18), Controle PR (n=9) e Renutrido (n=15). ** Valores significativos para p<0,01. *** Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

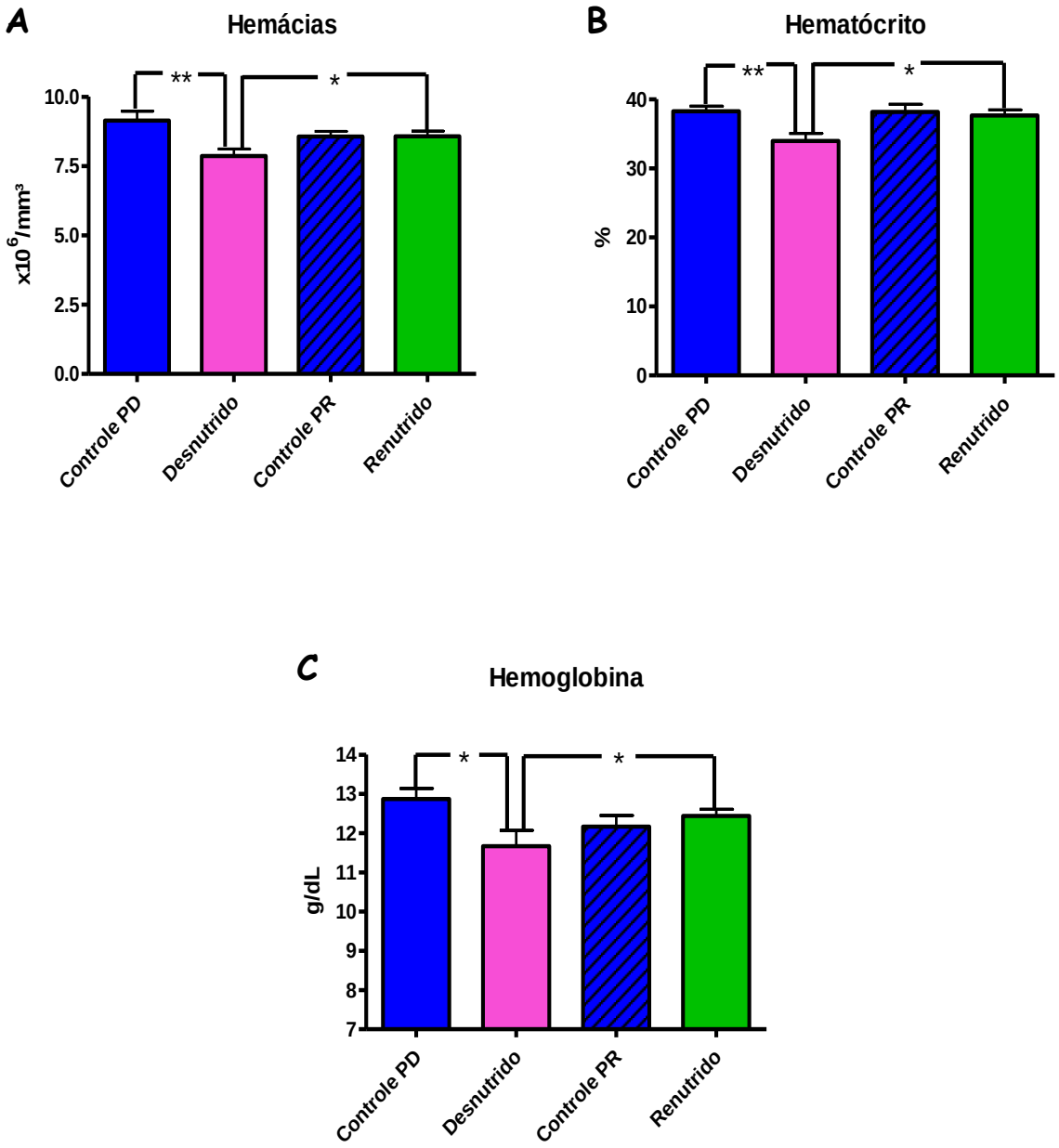


Figura 17. Resultados, em valores médios±SDM, do número de hemácias (A), volume hematócrito (B) e hemoglobina (C) de **camundongos C57BL/6J** dos grupos Controle PD (n=20), Desnutrido (n=16), Controle PR (n=13) e Renutrido (n=17). * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,01. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

Tabela 11 – Índices hematimétricos e porcentagem de reticulócitos de camundongos Swiss Webster

Grupo experimental	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Reticulócitos (%)
Controle PD (n=10)	40,90 ± 5,86	14,15 ± 1,73	32,08 ± 0,91	2,60 ± 0,20
Desnutrido (n=13)	39,26 ± 5,45	13,66 ± 1,13	33,41 ± 2,17	2,56 ± 0,27
Controle PR (n=10)	39,84 ± 6,52	13,97 ± 1,41	33,56 ± 2,31	3,02 ± 0,77
Renutrido (n=18)	41,87 ± 5,90	14,55 ± 1,47	33,96 ± 2,40	2,53 ± 0,42

Tabela 12 – Índices hematimétricos de camundongos C57BL/6J

Grupo experimental	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
Controle PD (n=20)	42,63 ± 6,23	14,46 ± 2,32	34,04 ± 3,85
Desnutrido (n=16)	41,67 ± 9,62	15,34 ± 1,77	35,62 ± 5,12
Controle PR (n=13)	44,67 ± 0,58	14,20 ± 0,26	31,90 ± 0,44
Renutrido (n=17)	43,94 ± 1,43	13,99 ± 0,42	31,89 ± 0,64

Resultados, em valores médios±SDM, dos valores de VCM, HCM, CHCM e reticulócitos de **camundongos Swiss Webster** e **C57BL/6J** dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido. **n** representa número de animais avaliados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição. **n** representa número de animais analisados.

4.3.1.2 Leucograma

O consumo de uma dieta hipoprotéica acarretou em redução do número de leucócitos circulantes dos animais de ambas as linhagens. Camundongos **Swiss Webster** do Grupo Desnutrido apresentaram leucopenia significativa quando comparados ao Grupo Controle PD (1364/mm^3 ± 559,3 e 3457/mm^3 ± 956,6, respectivamente) (Figura 18A), às custas, principalmente, de linfocitopenia e neutropenia absolutas. Também foi observada redução do número absoluto de eosinófilos e monócitos (Tabelas 13 e 14). Após o período de renutrição, a leucopenia, foi revertida nos animais do Grupo Renutrido (3014/mm^3 ± 767,5), sendo que o número total de leucócitos deste grupo foi semelhante ao encontrado para o Grupo Controle PR (3531/mm^3 ± 11,58,0) (Figura 18A). Tanto a linfocitopenia quanto a neutropenia absolutas dos animais renutridos também foram revertidas com a introdução da dieta normoprotéica. Houve aumento do número de eosinófilos, porém o número de monócitos permaneceu reduzido (Tabelas 13 e 14). Camundongos **C57BL/6J** do Grupo Desnutrido também apresentaram leucopenia significativa quando comparados ao Grupo Controle PD (1325/mm^3 ± 716,3 e 2381/mm^3 ± 1020,0, respectivamente). Esse quadro foi revertido após o período de renutrição, visto que o número de leucócitos, tanto do Grupo Renutrido, quanto do Grupo Controle PR, foi semelhante (2700/mm^3 ± 1102 e 2840/mm^3 ± 1737, respectivamente) (Figura 18B).

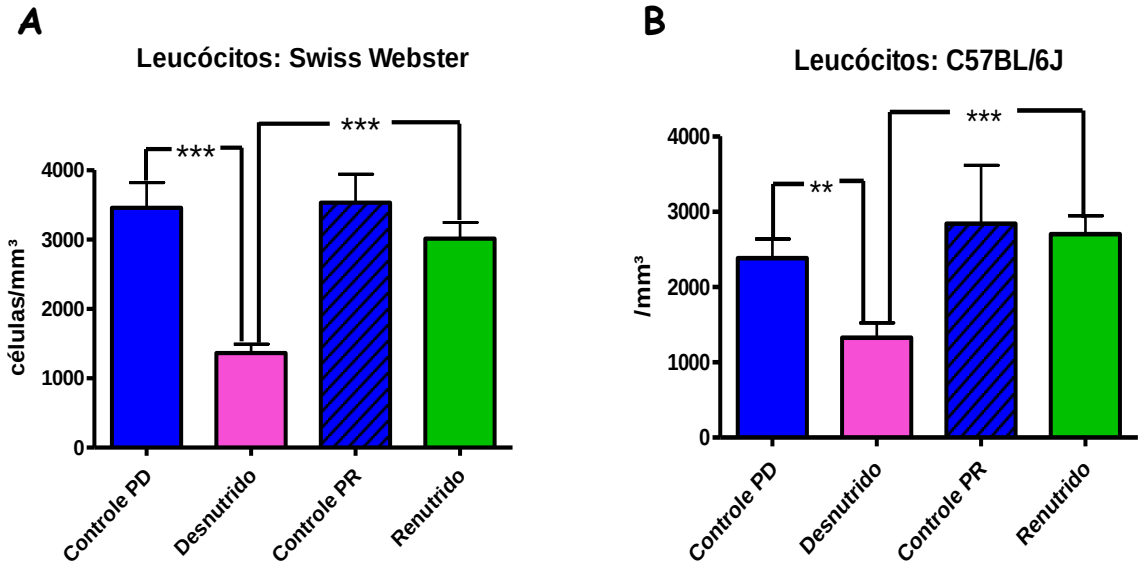


Figura 18. Resultados, em valores médios±SDM, do número de leucócitos de **camundongos Swiss Webster** (A) e **C57BL/6J** (B) dos grupos Controle PD (n=8), Desnutrido (n=16), Controle PR (n=8) e Renutrido (n=11). ** Valores significativos para p<0,01. *** Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

Tabela 13 – Contagem relativa de leucócitos no sangue periférico: Swiss Webster

	Controle PD	Desnutrido	Controle PR	Renutrido
Linfócitos (%)	85,00 ± 4,55	87,33 ± 4,47	86,60 ± 5,68	87,00 ± 4,47
Neutrófilos segmentados (%)	13,75 ± 4,57	12,88 ± 3,09	14,00 ± 2,58	14,00 ± 4,05
Eosinófilos (%)	0,50 ± 0,10	0,22 ± 0,04	1,00 ± 0,70	0,37 ± 0,05
Monócitos (%)	0,75 ± 0,09	0,44 ± 0,07	0,60 ± 0,09	0,25 ± 0,05
Basófilos (%)	0	0	0	0

Resultados, em valores médios±SDM, do número relativo de linfócitos, neutrófilos segmentados, eosinófilos, monócitos e basófilos de **camundongos Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=5), Desnutrido (n=9), Controle PR (n=5) e Renutrido (n=8). **n** representa número de animais avaliados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

Tabela 14 – Contagem absoluta de leucócitos no sangue periférico: Swiss Webster

	Controle PD	Desnutrido	Controle PR	Renutrido
Linfócitos (/mm³)	2164 ± 736,6**	1044,0 ± 456,5	1820,0 ± 604,8	1840,0 ± 827,3*
Neutrófilos segmentados (/mm³)	341,0 ± 150,7**	128,20 ± 38,87	237,9 ± 132,7	253,5 ± 121,6*
Eosinófilos (/mm³)	7,62 ± 1,52	2,28 ± 0,45	2,10 ± 1,31	9,00 ± 1,38
Monócitos (/mm³)	18,50 ± 2,25	5,42 ± 0,83	11,80 ± 1,62	3,87 ± 0,73
Basófilos (/mm³)	0	0	0	0

Resultados, em valores médios±SDM, do número absoluto de linfócitos, neutrófilos segmentados, eosinófilos, monócitos e basófilos de **camundongos Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=5), Desnutrido (n=9), Controle PR (n=5) e Renutrido (n=8). * Valores significativos para $p<0,05$ em comparação ao Grupo Desnutrido. ** Valores significativos para $p<0,01$ em comparação ao Grupo Desnutrido. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle de Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

4.3.2 Mielograma

Foi observada redução significativa da celularidade da medula óssea em decorrência do quadro de desnutrição protéica em ambas as linhagens de camundongos. Após o retorno a uma dieta normoprotéica, o quadro de hipoplasia medular foi completamente revertido. Camundongos **Swiss Webster** do Grupo Desnutrido apresentaram diminuição do número de células nucleadas em relação ao Grupo Controle PD ($1,86x10^7$/mL ±0,53 e $2,98x10^7$/mL ± 0,57, respectivamente). No entanto, verificou-se redução do número absoluto de cada um dos tipos celulares avaliado na medula óssea, sendo que a proporção relativa entre as linhagens foi mantida em ambos os grupos (Tabela 15A). O Grupo Renutrido por sua vez, mostrou valores semelhantes aos apresentados pelo Grupo Controle PR ($2,69x10^7$/mL ± 1,04 e $2,67x10^7$/mL ± 0,63, respectivamente) (Figura 19A). O número absoluto de cada linhagem voltou a aumentar, sendo mantida a proporção relativa entre elas (Tabela 15B). Da mesma forma, camundongos **C57BL/6J** do Grupo Desnutrido apresentaram redução do número de células nucleadas em comparação ao Grupo Controle PD ($3,51x10^7$/mL ± 0,65 e $4,42x10^7$/mL ± 0,60, respectivamente), sendo que, tanto o Grupo Renutrido quanto o Grupo Controle PR apresentaram valores semelhantes ($5,77x10^7$/mL ± 2,51 e $4,58x10^7$/mL ± 1,55, respectivamente) (Figura 19B).

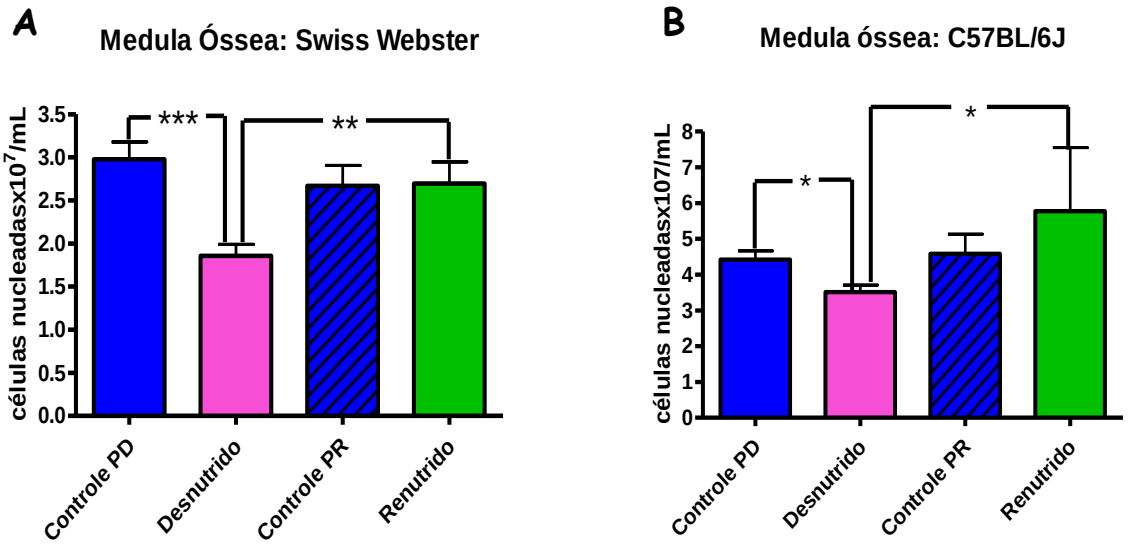


Figura 19. Resultados, em valores médios±SDM, do número de células nucleadas da medula óssea de camundongos **Swiss Webster** (A) e **C57BL/6J** (B) dos grupos Controle PD (n=8), Desnutrido (n=16), Controle PR (n=8) e Renutrido (n=14). * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,01. *** Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

Tabela 15A – Distribuição relativa das populações medulares: Swiss Webster

Tipo celular	Controle PD (%)	Desnutrido (%)	Controle PR (%)	Renutrido (%)
Blasto	2,37±1,17	1,60±0,78	1,63±0,61	1,70±0,90
Forma jovem	1,60±0,71	1,43±0,06	0,70±0,06	1,30±1,00
Forma em anel	3,57±0,67	3,87±0,85	3,07±1,26	7,10±0,57*
Segmentado	48,13±6,40	50,63±3,82	40,67±6,13	42,15±2,05
Eosinófilo	2,65±0,49	1,83±0,64	1,77±0,62	1,55±0,64
Monócito/macrófago	0,15±0,01	0,27±0,03	1,05±0,15	0,55±0,05
Plasmócito	0,20±0,02	0,37±0,02	0,07±0,01	0,20±0,02
Linfoblasto/Linfócito	17,70±2,26	13,93±0,35	19,47±3,75	17,90±0,85
Proeritroblasto/ Eritroblasto basófilo	3,17±0,98	3,47±0,84	3,53±1,61	3,15±2,15
Eritroblasto policromático	18,93±7,10	20,03±4,73	25,93±10,94	21,05±7,95
Eritroblasto ortocromático	2,03±0,85	1,37±0,84	0,90±0,30	2,30±1,50
Megacariócito	1,27±0,57	1,20±0,20	1,37±0,50	1,05±0,07

Resultados, em valores médios±SDM, da porcentagem das populações medulares de **camundongos Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=5), Desnutrido (n=9), Controle PR (n=5) e Renutrido (n=8). * Valores significativos para p<0,05 em comparação ao Grupo Desnutrido. ** Valores significativos para p<0,01 em comparação ao Grupo Desnutrido. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle de Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

Tabela 15B – Distribuição absoluta das populações medulares: Swiss Webster

Tipo celular	Controle PD ($x10^7$/mL)	Desnutrido ($x10^7$/mL)	Controle PR ($x10^7$/mL)	Renutrido ($x10^7$/mL)
Blasto	0,07±0,03	0,021±0,001	0,06±0,02	0,04±0,02
Forma jovem	0,05±0,01	0,027±0,001	0,019±0,003	0,035±0,002
Forma em anel	0,11±0,02	0,07±0,02	0,10±0,03	0,19±0,01**
Segmentado	1,43±0,19	0,94±0,07*	1,08±0,16	1,12±0,05
Eosinófilo	0,09±0,02	0,03±0,01*	0,06±0,01	0,04±0,02
Monócito/macrófago	0,004±0,002	0,005±0,002	0,028±0,006	0,015±0,001
Plasmócito	0,122±0,021	0,064±0,015*	0,119±0,009	0,084±0,06
Linfoblasto/Linfócito	0,48±0,09	0,26±0,06*	0,52±0,10	0,48±0,23***
Proeritroblasto/ Eritroblasto basófilo	0,68±0,07	0,37±0,09*	0,86±0,07	0,56±0,30
Eritroblasto policromático	0,07±0,03	0,02±0,01	0,03±0,01	0,06±0,06
Eritroblasto ortocromático	0,06±0,02	0,02±0,01	0,03±0,01	0,06±0,04
Megacariócito	0,032±0,007	0,022±0,004	0,042±0,015	0,028±0,001
Relação grânulo/eritrocitária	2,91±1,63	2,68±0,62	2,03±1,25	2,20±0,78

Resultados, em valores médios±SDM, dos valores absolutos das populações medulares de **camundongos Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=5), Desnutrido (n=9), Controle PR (n=5) e Renutrido (n=8). * Valores significativos para $p<0,05$ em comparação ao Grupo Desnutrido. ** Valores significativos para $p<0,01$ em comparação ao Grupo Desnutrido. n representa número de animais analisados. Controle PD = Controle de Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

4.3.3 Esplenograma

A dieta hipoprotéica provocou diferentes comportamentos nas linhagens analisadas. Camundongos **Swiss Webster** do Grupo Desnutrido apresentaram redução do peso absoluto do baço em relação ao Grupo Controle PD, sendo essa redução revertida após o período de renutrição. Já em relação ao peso relativo, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos (Tabela 16). O Grupo Desnutrido também apresentou significativa redução da celularidade em relação ao Grupo Controle PD ($3,25x10^7$/mL ± 2,77 e $7,31x10^7$/mL ± 2,89, respectivamente). Essas alterações evidenciam a hipoplasia esplênica encontrada em decorrência do baixo consumo de proteína. Após o processo de renutrição, os animais do Grupo Renutrido apresentaram aumento da celularidade ($6,62x10^7$/mL ± 2,74) em comparação ao Grupo Desnutrido. Esse valor foi semelhante ao apresentado pelo Grupo Controle PR ($8,37x10^7$/mL ± 0,75) (Figura 20A). Por outro lado, a celularidade dos camundongos **C57BL/6J** não sofreu alteração com a dieta hipoprotéica, mostrando que essa linhagem não apresentou alteração no setor esplênico em decorrência da desnutrição protéica. No entanto, o Grupo Renutrido mostrou aumento significativo do número de células nucleadas em relação ao Grupo Desnutrido (Figura 20B). Em ambas as linhagens não houve alteração na distribuição relativa das populações (Tabela 17A). Em relação ao número absoluto, verificou-se redução dos tipos celulares no Grupo Desnutrido, retornando à contagem normal no Grupo Renutrido (Tabela 17B).

Tabela 16 – Peso absoluto e relativo do baço de camundongos Swiss Webster

Grupo experimental	Peso absoluto do baço (g)	Peso relativo do baço (g/g de peso corporal)
Controle PD (n=5)	0,11 ± 0,02	0,0022 ± 0,0004
Desnutrido (n=10)	0,08 ± 0,02	0,0024 ± 0,0006
Controle PR (n=5)	0,12 ± 0,03	0,0025 ± 0,0004
Renutrido (n=10)	0,11 ± 0,02	0,0023 ± 0,0004

Resultados, em valores médios±SDM, do peso absoluto e relativo do baço dos animais dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

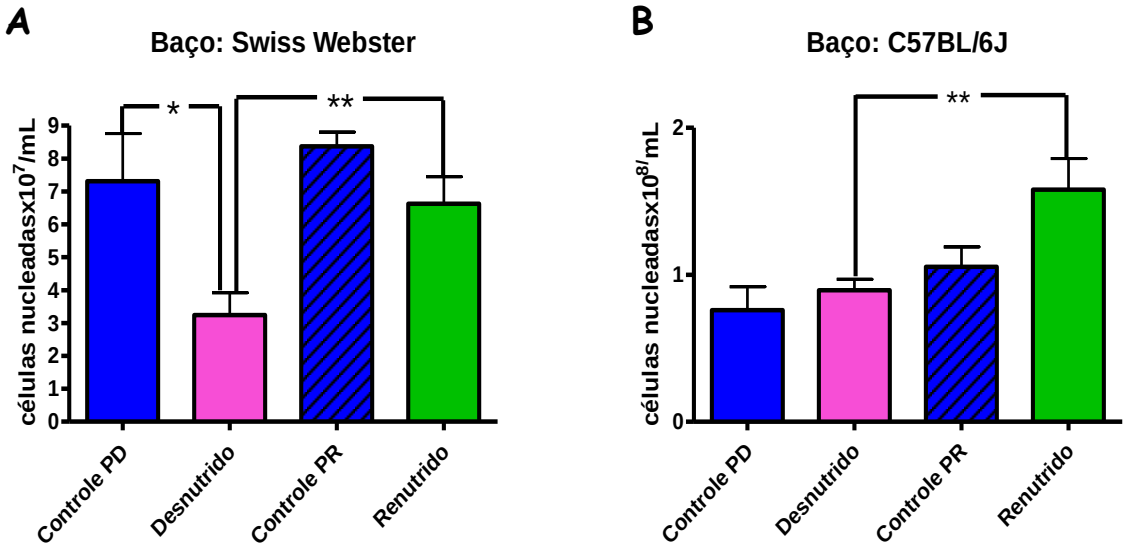


Figura 20. Resultados, em valores médios±SDM, do número de células nucleadas do baço de camundongos **Swiss Webster** (A) e **C57BL/6J** (B) dos grupos Controle PD (n=8), Desnutrido (n=17), Controle PR (n=8) e Renutrido (n=11). * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,01. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

Tabela 17A - Distribuição relativa das populações esplênicas: Swiss Webster

Tipo celular	Controle PD (%)	Desnutrido (%)	Controle PR (%)	Renutrido (%)
Blasto	0	0	0	0
Forma jovem	0	0	0	0
Forma em anel	0,45±0,07	0,17±0,03	0,33±0,17	0,33±0,03
Segmentado	4,63±0,55	3,60±1,42	3,17±0,76	3,30±0,61
Eosinófilo	0,50±0,01	0,50±0,01	0,12±0,01	0,33±0,03
Monócito/macrófago	0	0	0	0
Plasmócito	0,17±0,01	0,50±0,01	0,33±0,17	0,33±0,18
Linfócito/linfoblasto	24,87±1,50	22,13±1,70	23,60±0,46	22,77±2,46
Proeritroblasto/ Eritroblasto basófilo	0,67±0,33	0,33±0,29	0,83±0,44	0,17±0,17
Eritroblasto policromático	67,70±1,93	72,77±4,31	71,57±0,59	72,43±3,16
Eritroblasto ortocromático	1,00±0,01	0	0,33±0,03	0,33±0,17
Megacariócito	0	0	0	0

Resultados, em valores médios±SDM, dos valores relativos das populações esplênicas de **camundongos Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=5), Desnutrido (n=9), Controle PR (n=5) e Renutrido (n=8). * Valores significativos para p<0,05 em comparação ao Grupo Desnutrido. ** Valores significativos para p<0,01 em comparação ao Grupo Desnutrido. n representa número de animais analisados. Controle PD = Controle de Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

Tabela 17B - Distribuição absoluta das populações esplênicas: Swiss Webster

Tipo celular	Controle PD ($x10^8$/mL)	Desnutrido ($x10^8$/mL)	Controle PR ($x10^8$/mL)	Renutrido ($x10^8$/mL)
Blasto	0	0	0	0
Forma jovem	0	0	0	0
Forma em anel	0,033±0,005	0,005±0,003*	0,020±0,023	0,022±0,002
Segmentado	0,34±0,04	0,12±0,08*	0,26±0,06	0,22±0,04
Eosinófilo	0,04±0,01	0,02±0,01	0,010±0,001	0,02±0,01
Monócito/macrófago	0	0	0	0
Plasmócito	0,012±0,001	0,016±0,001	0,028±0,014	0,022±0,019
Linfoblasto/Linfócito	1,82±0,11	0,72±0,05***	1,98±0,04	1,51±0,16**
Proeritroblasto/ Eritroblasto basófilo	0,05±0,04	0,011±0,009	0,07±0,04	0,011±0,001
Eritroblasto policromático	4,95±0,14	2,36±0,14***	5,99±0,05	4,80±0,21
Eritroblasto ortocromático	0,073±0,007	0,028±0,002	0	0,022±0,011
Megacariócito	0	0	0	0
Relação grânulo/eritrocitária	0,081±0,008	0,057±0,034	0,046±0,011	0,054±0,014
Relação linfo/eritrocitária	0,36±0,02	0,31±0,04	0,33±0,01	0,32±0,05

Resultados, em valores médios±SDM, dos valores absolutos das populações esplênicas de **camundongos Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=5), Desnutrido (n=9), Controle PR (n=5) e Renutrido (n=8). * Valores significativos para $p<0,05$ em comparação ao Grupo Desnutrido. ** Valores significativos para $p<0,01$ em comparação ao Grupo Desnutrido. n representa número de animais analisados. Controle PD = Controle de Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

4.4 Avaliação de macrófagos peritoniais

4.4.1 Células nucleadas do lavado peritonial

A dieta hipoprotéica promoveu redução da celularidade do lavado peritonial em ambas as linhagens avaliadas, sendo esse quadro revertido após o período de renutrição. Em camundongos **Swiss Webster**, o Grupo Desnutrido apresentou redução significativa do número de células nucleadas em relação ao Grupo Controle PD ($2,44x10^6$/mL ± 0,75 e $3,02x10^6$/mL ± 0,76, respectivamente), enquanto o Grupo Renutrido mostrou recuperação da celularidade, tendo comportamento semelhante ao apresentado pelo Grupo Controle PR ($3,13x10^6$/mL ± 1,20 e $2,99x10^6$/mL ± 1,11, respectivamente) (Figura 21A). Em relação à população peritonial, não houve variação da porcentagem dos tipos celulares nos grupos avaliados (com exceção da porcentagem de mastócitos, reduzida no Grupo Desnutrido), Porém, houve importante redução do número absoluto de mastócitos, linfócitos e macrófagos. Estes tipos celulares, reduzidos no Grupo Desnutrido, voltaram a aumentar no Grupo Renutrido (Tabela 18). Na linhagem **C57BL/6J**, animais do Grupo Desnutrido também apresentaram diminuição da celularidade em relação ao Grupo Controle PD ($2,01x10^6$/mL ± 0,78 e $3,14x10^6$/mL ± 0,97, respectivamente). Após a renutrição, animais do Grupo Renutrido e do Grupo Controle PD apresentaram número de células nucleadas semelhante ($4,39x10^6$/mL ± 1,45 e $3,76x10^6$/mL ± 1,59, respectivamente) (Figura 21B).

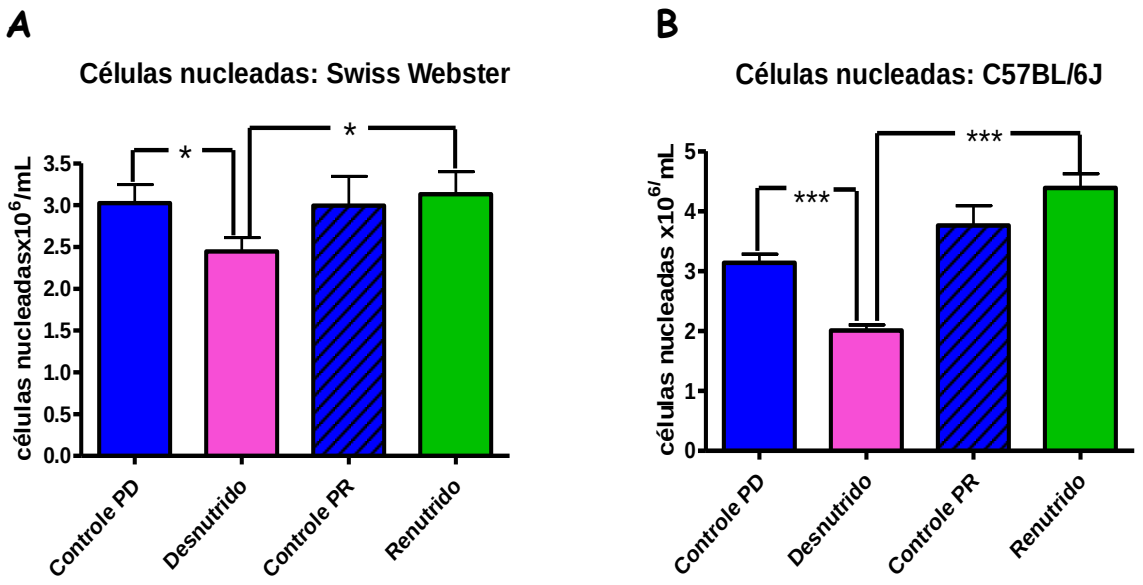


Figura 21. Resultados, em valores médios±SDM, do número de células nucleadas peritoniais de camundongos **Swiss Webster** (A) e **C57BL/6J** (B) dos grupos Controle PD (n=12), Desnutrido (n=20), Controle PR (n=12) e Renutrido (n=16). * Valores significativos para p<0,05. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

Tabela 18 – Distribuição relativa e absoluta das populações da cavidade peritonial

Grupos experimentais	Macrófagos		Linfócitos		Mastócitos	
	%	x10^6/mL	%	x10^6/mL	%	x10^6/mL
Controle PD (n=6)	70,55±9,60	2,47±0,66	26,92±9,19	1,07±0,52	2,24±0,71	0,068±0,021
Desnutrido (n=6)	70,28±5,55	1,72±0,14*	28,00±5,32	0,64±0,10*	1,18±0,56*	0,029±0,014*
Controle PR (n=6)	70,07±3,30	2,10±0,10	28,07±3,26	0,94±0,16	2,40±1,10	0,072±0,033
Renutrido (n=8)	74,30±14,56	2,33±0,46**	28,67±13,31	1,12±0,28**	2,10±1,38	0,071±0,044**

Resultados, em valores médios±SDM, dos valores relativos e absolutos das populações esplênicas de camundongos **Swiss Webster** dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido. * Valores significativos para p<0,05 em comparação ao Grupo Controle PD. ** Valores significativos para p<0,01 em comparação ao Grupo Desnutrido. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle de Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

4.4.2 Avaliação da capacidade de adesão

A desnutrição protéica levou ao comprometimento da capacidade de adesão de macrófagos peritoniais nos tempos avaliados (2 e 24 horas). Mesmo após estímulo com LPS, o Grupo Desnutrido apresentou menor adesão tanto em 2 como em 24 horas (0,054±0,034 e 0,052±0,018, respectivamente) em relação ao Grupo Controle PD (0,2000±0,0002 e 0,13±0,01, respectivamente). O Grupo Renutrido continuou apresentando reduzida capacidade de adesão no tempo de 2 horas após estímulo com LPS (0,066±0,022) em relação ao Grupo Controle PR (0,12±0,01). No entanto, após 24 horas, tanto o Grupo Renutrido quanto o Grupo Controle PD apresentaram valores semelhantes (0,105±0,003 e 0,075±0,003, respectivamente), indicando recuperação tardia dessa função (Figuras 22A e 22B).

4.4.3 Avaliação da capacidade de espraiamento

Após o período de desnutrição, a capacidade de espraiamento de células peritonias oriundas de camundongos Swiss Webster foi reduzida nos tempos de 2 e 24 horas, mesmo após estímulo com LPS. No tempo de 2 horas, o Grupo Desnutrido apresentou valores de espraiamento, tanto na condição basal, quanto na condição estimulada, (3,12%±2,66 e 3,86%±2,37, respectivamente) inferiores aos apresentados pelo Grupo Controle PD (10,25%±2,47 e 19,00%±5,66, respectivamente). A porcentagem de células espraiadas do Grupo Renutrido, tanto no estado basal, quanto no estimulado (3,67%±1,24 e 7,92%±4,72, respectivamente) continuou inferior à porcentagem apresentada pelo Grupo Controle PR (17,75%±1,01 e 20,75%±3,18, respectivamente). No tempo de 24 horas, o Grupo Desnutrido continuou mostrando valores reduzidos nas condições sem estímulo e estimulada (54,50%±4,34 e 53,00%±7,46, respectivamente) em relação ao Grupo Controle PD (86,75%±1,77 e 95,88%±1,44, respectivamente). No entanto, o Grupo Renutrido apresentou aumento do espraiamento, tanto sem estímulo, quanto estimulado com LPS (87,67%±6,33 e 96,50%±1,47, respectivamente), igualando os valores do Grupo Controle PR (82,75%±3,18 e 92,50%±1,77, respectivamente), indicando um processo mais lento de recuperação (Figuras 23A e 23B).

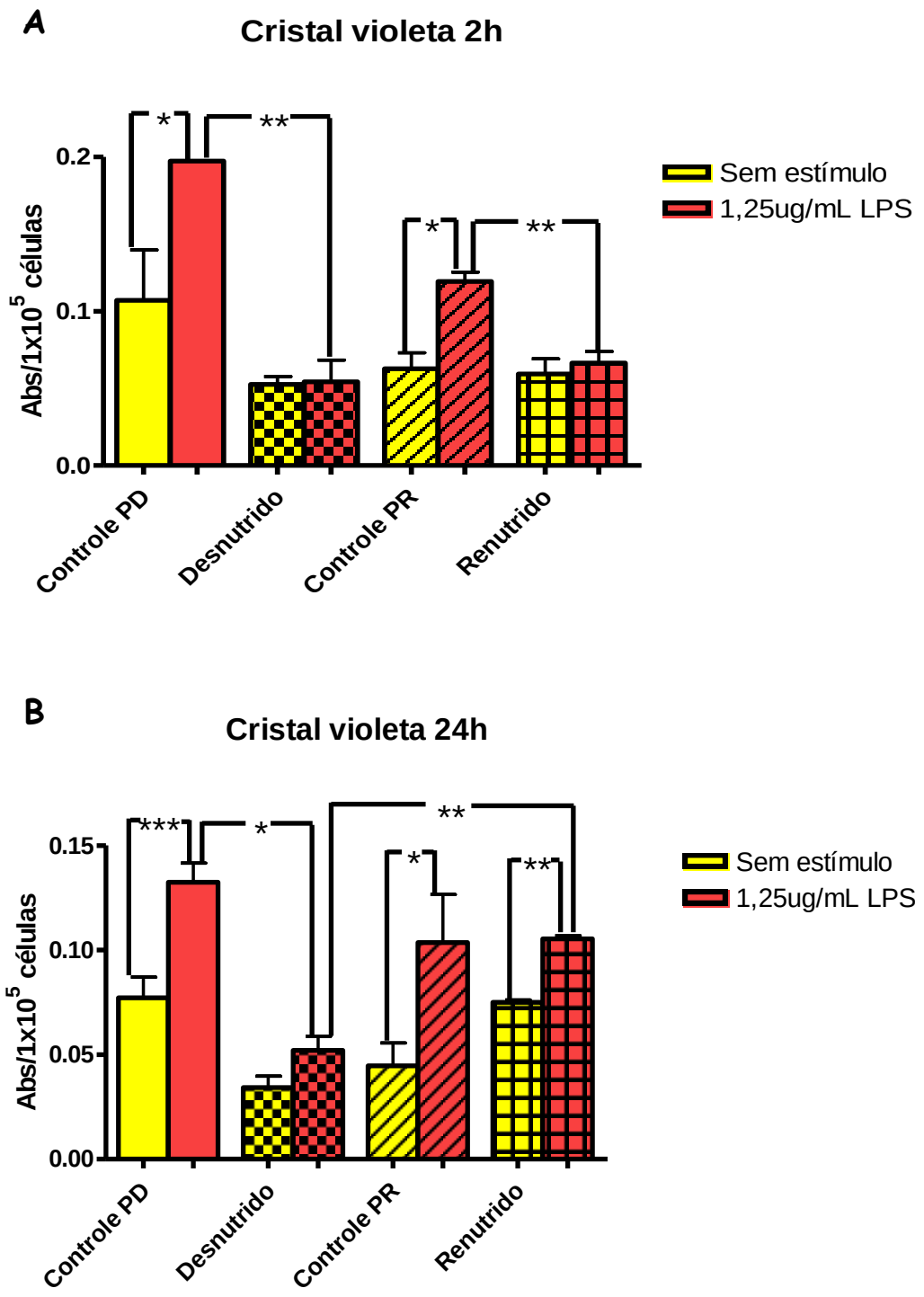


Figura 22. Resultados, em valores médios±SDM, da capacidade de adesão de células peritoniais de **camundongos Swiss Webster** nos tempos de 2 horas (A) e 24 horas (B) dos grupos Controle PD (n=6), Desnutrido (n=7), Controle PR (n=7) e Renutrido (n=7). * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,05. *** Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

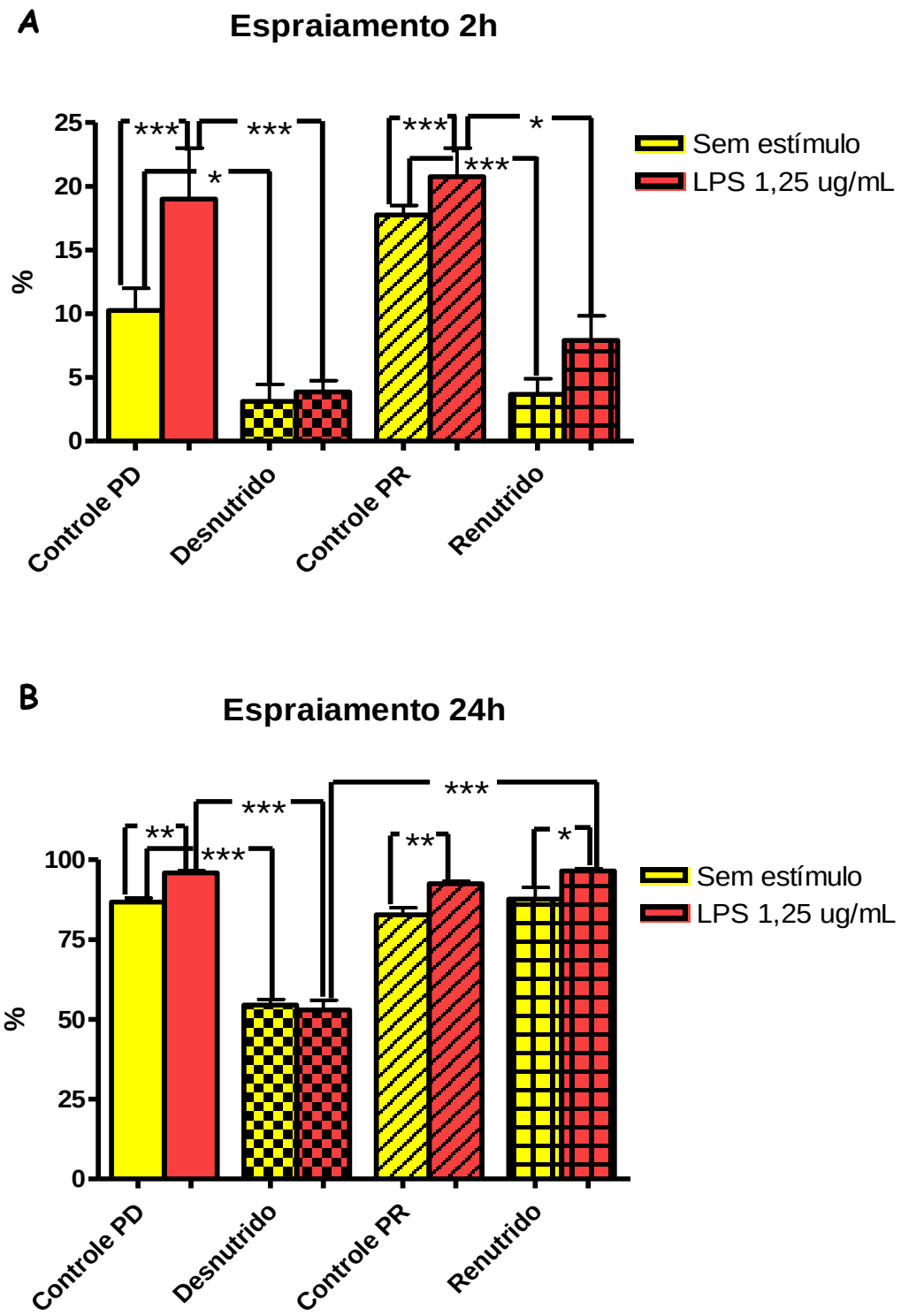


Figura 23. Resultados, em valores médios±SDM, da capacidade de espraiamento de células peritoniais de **camundongos Swiss Webster** nos tempos de 2 horas (A) e 24 horas (B) dos grupos Controle PD (n=6), Desnutrido (n=7), Controle PR (n=7) e Renutrido (n=7). * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,05. *** Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

4.4.4 Avaliação da fagocitose e atividade fungicida

A porcentagem de fagocitose de amostras de *Cândida albicans* não opsonizadas não diferiu entre os grupos experimentais nos tempos avaliados. Entretanto, após opsonização, todos os grupos apresentaram aumento da fagocitose em relação às amostras não opsonizadas em todos os tempos, com exceção do Grupo Desnutrido. Este apresentou fagocitose de *Cândida albicans* opsonizada significativamente inferior à apresentada pelo Grupo Controle PD nos tempos de 30, 60 e 90 minutos. No tempo de 120 minutos, o Grupo Desnutrido aumentou significativamente a fagocitose em relação às amostras não opsonizadas, mostrando valores semelhantes aos do grupo Controle PD. O Grupo Renutrido apresentou aumento significante da fagocitose de *Cândida albicans* opsonizada em relação às amostras não opsonizadas nos tempos de 30, 60 e 90 minutos, mostrando valores semelhantes aos apresentados pelo Grupo Controle PR (Tabela 19A).

Ambos os grupos controles apresentaram, nos tempos avaliados, aumento da atividade fungicida frente à *Cândida albicans* opsonizadas em relação à atividade apresentada em *Cândida albicans* não opsonizada. Em todos os tempos, a atividade fungicida observada no Grupo Desnutrido frente à *Cândida albicans* opsonizada foi semelhante à apresentada frente à *Cândida albicans* não opsonizada, sendo que a primeira foi significativamente inferior à atividade apresentada pelo Grupo Controle PD frente à *Cândida albicans* opsonizada. O Grupo Renutrido, por sua vez, mostrou, nos tempos de 30 e 60minutos, aumento da atividade fungicida frente à *Cândida albicans* opsonizada em relação à atividade frente à *Cândida albicans* não opsonizada, sendo que o *score* da primeira foi semelhante ao apresentado pelo Grupo Controle PR. No entanto, nos tempos de 90 e 120 minutos, a atividade fungicida do Grupo Renutrido frente à *Cândida albicans* opsonizada foi inferior à apresentada pelo Grupo Controle PD (no tempo de 120 minutos, p=0,056), sendo que no tempo de 120 minutos, o Grupo Renutrido apresentou *score* maior que o apresentado pelo Grupo Desnutrido (Tabela 19B).

Tabela 19A – Porcentagem de fagocitose de *Cândida albicans* não opsonizadas e opsonizadas

Tempos	Controle PD (n=5)		Desnutrido (n=5)		Controle PR (n=5)		Renutrido (n=5)	
	Sem opsonizar	SHN	Sem opsonizar	SHN	Sem opsonizar	SHN	Sem opsonizar	SHN
30min	11,7±2,5	27,7±3,7 [a]	12,2±4,1	17,8±4,5 [c]	11,7±2,5	28,7±4,6 [a]	16,5±1,8	28,3±0,8 [b]
60min	42,0±2,1	74,7±6,7 [a]	42,0±7,9	41,8±10,5 [c]	37,7±1,1	74,7±6,7 [a]	39,3±8,8	74,3±11,9 [a]
90min	58,6±5,1	85,8±10,6 [d]	40,3±4,7	46,5±5,7 [c]	55,7±6,7	85,8±10,6 [a]	56,0±6,4	84,0±6,4 [a]
120min	55,7±2,4	96,5±1,4 [e]	46,7±8,4	89,7±2,4 [e]	60,0±0,7	90,2±3,9 [e]	72,7±8,1	89,5±3,5

Resultados, em valores médios±SDM da fagocitose de camundongos Swiss Webster dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido. [a] p<0,05 e [b] p<0,001 quando comparamos grupo opsonizado com grupo não opsonizado. [c] p<0,05 quando comparamos com Grupo Controle PD e Grupo Renutrido opsonizados. [d] p<0,01 quando comparamos grupo opsonizado com grupo não opsonizado. [e] p<0,01 quando comparamos grupo opsonizado com grupo não opsonizado. n representa número de animais utilizados no experimento. Controle PD=Controle do Período de Desnutrição. Controle PR=Controle do Período de Renutrição.

Tabela 19B – Atividade fungicida em *Cândida albicans* não opsonizadas e opsonizadas

Tempos	Controle PD (n=5)		Desnutrido (n=5)		Controle PR (n=5)		Renutrido (n=5)	
	Sem opsonizar	SHN	Sem opsonizar	SHN	Sem opsonizar	SHN	Sem opsonizar	SHN
30min	1,0±0,7	6,2±2,5 [a]	0,33±0,05	0,50±0,07 [d]	0,7±0,3	4,7±0,7 [a]	1,0±0,6	7,3±2,3 [b]
60min	10,0±6,9	34,6±6,7 [b]	12,0±2,6	13,0±2,3 [d]	7,0±4,3	24,7±6,5 [b]	7,7±2,1	35,0±5,8 [a]
90min	16,0±7,1	60,0±9,9 [b]	18,2±6,6	21,0±7,0 [e]	34,5±4,9	75,0±5,7 [b]	20,5±9,5	35,5±18,5
120min	13,5±0,7	105,3±34,1 [b]	16,7±8,7	24,5±8,3 [d]	18,5±0,7	111,0±19,8 [b]	32,7±6,6	57,0±11,1

Resultados, em valores médios±SDM da atividade fungicida de camundongos Swiss Webster dos grupos Controle PD, Desnutrido, Controle PR e Renutrido. [a] p<0,01 e [b] p<0,05 quando comparamos grupo opsonizado com grupo não opsonizado. [d] p<0,05 quando comparamos com Grupo PD e Grupo Renutrido opsonizados. [e] p<0,05 quando comparamos com Grupo Controle PD. n representa número de animais utilizados no experimento. Controle PD=Controle do Período de Desnutrição. Controle PR=Controle do Período de Renutrição.

4.4.5 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos não estimulados foi semelhante em todos os grupos de camundongos **Swiss Webster**. Após estímulo com PMA, somente os grupos Controle PD, Controle PR e Renutrido apresentaram produção superior àquela apresentada pelos macrófagos na condição basal. Os macrófagos peritoniais dos animais do Grupo Desnutrido apresentaram redução significativa da produção de peróxido de hidrogênio em relação aos animais do Grupo Controle PD (10,85µmol ± 5,07 e 22,91µmol ± 4,17, respectivamente), mostrando comprometimento da função macrofágica decorrente da alimentação com uma dieta hipoprotéica. Quando os animais voltaram a ser submetidos a uma ração normoprotéica, a produção de peróxido de hidrogênio frente ao estímulo de PMA volta a aumentar. Dessa forma, encontramos valores similares para os grupos Renutrido e Controle PR (13,05µmol ± 0,74 e 18,29µmol ± 1,00, respectivamente) (Figura 24).

4.4.6 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO)

Em culturas de macrófagos não estimulados com LPS, a produção basal de óxido nítrico nos tempos avaliados não diferiu entre os grupos experimentais de ambas as linhagens de camundongos. Em camundongos **C57BL/6J**, culturas de 24 horas estimuladas com LPS mostraram aumento na produção de óxido nítrico em relação ao estado basal somente nos grupos Controle PD e Controle PR (137,5mM±52,96 e 112,8mM±88,58, respectivamente). Tanto o Grupo Desnutrido quanto o Grupo Renutrido apresentaram valores reduzidos de óxido nítrico (29,60mM±7,22 e 39,70mM±7,86, respectivamente) (Figura 25A). Avaliando-se a produção de óxido nítrico em 48 horas por camundongos **C57BL/6J**, observou-se diminuição significativa do Grupo Desnutrido em relação ao Grupo Controle PD (42,86mM±31,71 e 142,8mM±25,13, respectivamente). Após o período de renutrição, o Grupo Renutrido e o Grupo Controle PR apresentaram valores semelhantes (133,4mM±56,97 e 105,6mM±29,18, respectivamente), indicando reversão tardia das

alterações (Figura 25B). Em camundongos **Swiss Webster**, nas culturas de 48 horas em que houve estímulo com LPS, somente os grupos Controle PD, Controle PR e Renutrido apresentaram produção significativamente maior em relação ao estado basal. Verificou-se redução significativa da produção de óxido nítrico do Grupo Desnutrido em relação ao Grupo Controle PD (84,23µmol/mL ± 8,99 e 169,8µmol/mL ± 22,10, respectivamente), evidenciando comprometimento decorrente do quadro de desnutrição. No entanto, o restabelecimento da quantidade normal de proteína na ração levou à normalização da produção de óxido nítrico, visto que o Grupo Renutrido apresentou valores similares aos apresentados pelo Grupo Controle PR (153,2µmol/mL ± 48,76 e 176,4µmol/mL ± 105,6, respectivamente) (Figura 25C).

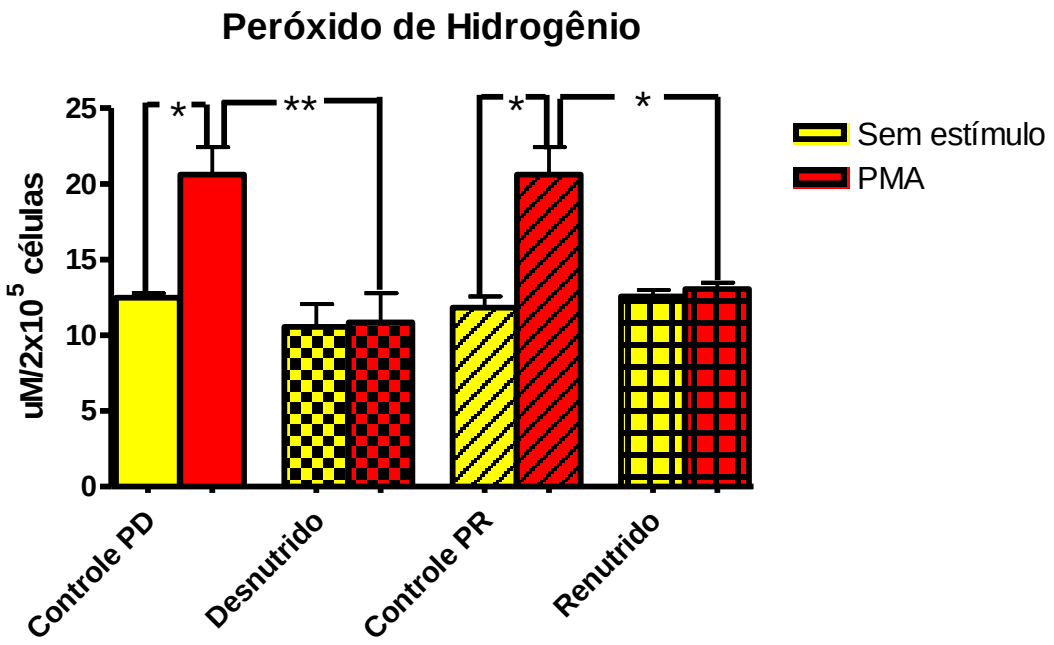


Figura 24. Resultados, em valores médios±SDM, da concentração de peróxido de hidrogênio produzida por macrófagos de **camundongos Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=3), Desnutrido (n=11), Controle PR (n=3) e Renutrido (n=4). * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,01. n representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

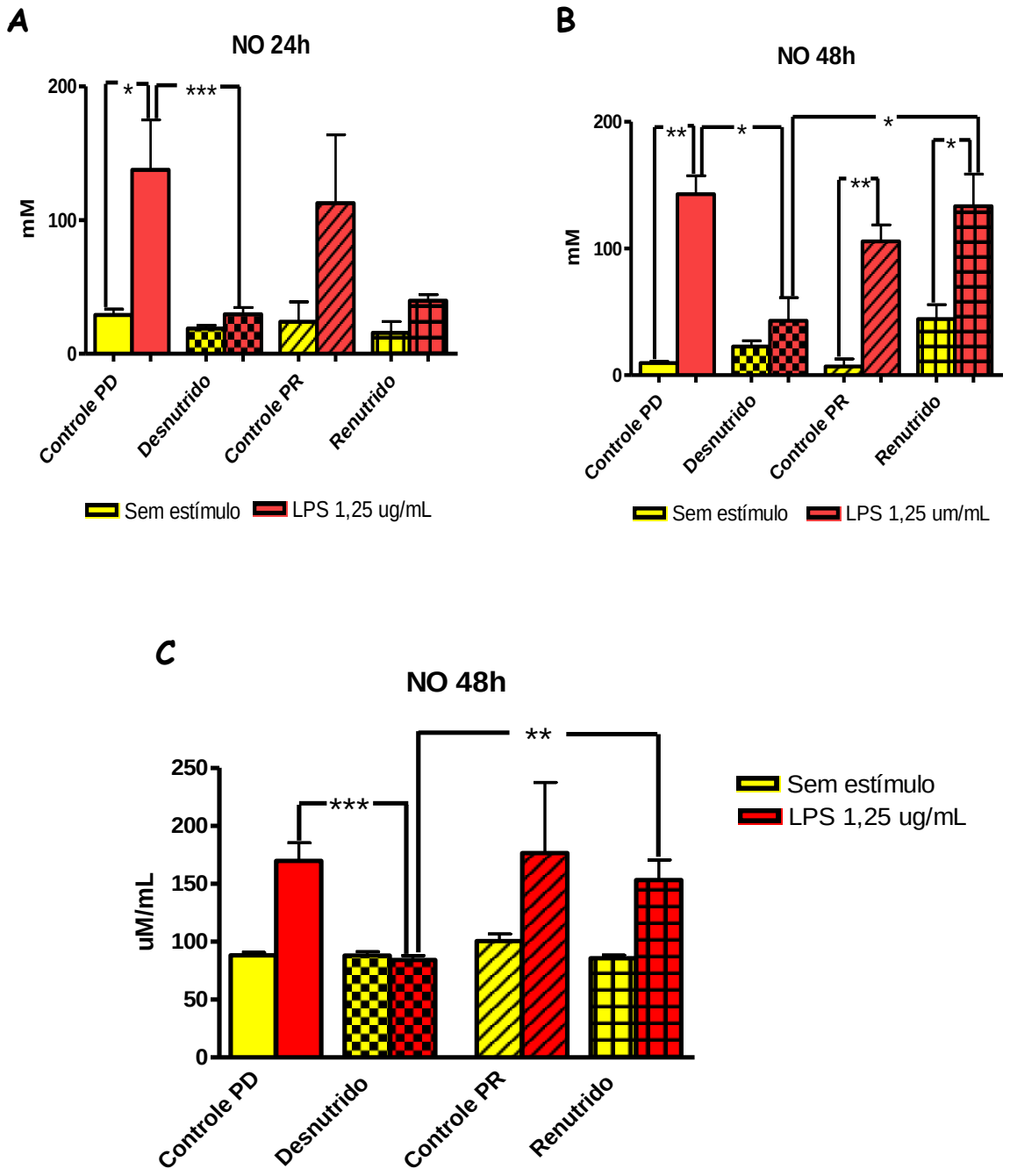


Figura 25. Resultados, em valores médios±SDM, da produção de óxido nítrico por **camundongos C57BL/6J** em 24 horas (A) e 48 horas (B) e **camundongos Swiss Webster** em 48 horas (C) dos grupos Controle PD (n=6), Desnutrido (n=7), Controle PR (n=7) e Renutrido (n=8). * Valores significativos para p<0,05. * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,05. *** Valores significativos para p<0,001. n representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

4.4.7 Avaliação da produção de citocinas

De modo geral, em ambas as linhagens de camundongos, após estímulo com LPS, houve redução na produção das citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β e IL-6) em decorrência do quadro de desnutrição. Embora o Grupo Desnutrido tenha apresentado aumento da produção dessas citocinas em relação ao estado basal, esse aumento foi inferior ao apresentado pelo Grupo Controle PD sob as mesmas condições, indicando alteração da função macrofágica. Não foi detectada produção de IFN-γ e IL-4 nas culturas analisadas.

A produção de IL-1β em condições basais não diferiu entre os grupos experimentais. Em camundongos **Swiss Webster**, após estímulo com LPS, a síntese desta citocina aumentou de forma significativa em todos os grupos. Porém, o aumento observado no Grupo Desnutrido foi significativamente inferior ao apresentado pelo Grupo Controle PD (41,80pg/mL ± 14,77 e 113,40pg/mL ± 21,21, respectivamente). O Grupo Renutrido apresentou aumento significativa da produção de IL-1β após estímulo, mas assim como o Grupo Desnutrido, sua produção foi significativamente inferior àquela apresentada pelo Grupo Controle PR (37,34pg/mL ± 21,57 e 98,51pg/mL ± 29,68, respectivamente) (Figura 26A). Em camundongos **C57BL/6J**, a produção desta citocina também aumentou em relação ao estado basal após estímulo com LPS. Ainda assim, o Grupo Desnutrido apresentou valores reduzidos em comparação ao Grupo Controle PD (49,73pg/mL±14,41 e 99,90pg/mL±17,31, respectivamente). O Grupo Renutrido, por sua vez, continuou apresentando valores inferiores aos do Grupo Controle PR (34,55pg/mL±13,40 e 74,50pg/mL±51,73, respectivamente) (Figura 27A).

Em culturas de macrófagos não estimuladas, a produção de IL-6 foi semelhante entre os grupos experimentais. Após estímulo com LPS, a produção desta citocina aumentou de forma significante em todos os grupos, sendo que esse aumento foi maior no Grupo Controle PD do que no Grupo Desnutrido (13329,0pg/mL ± 1334,0 e 8352,0pg/mL ± 1440 (p=0,0697), respectivamente). O Grupo Renutrido apresentou o mesmo comportamento do Grupo Desnutrido, aumentando a síntese de IL-6 em decorrência do estímulo com LPS,

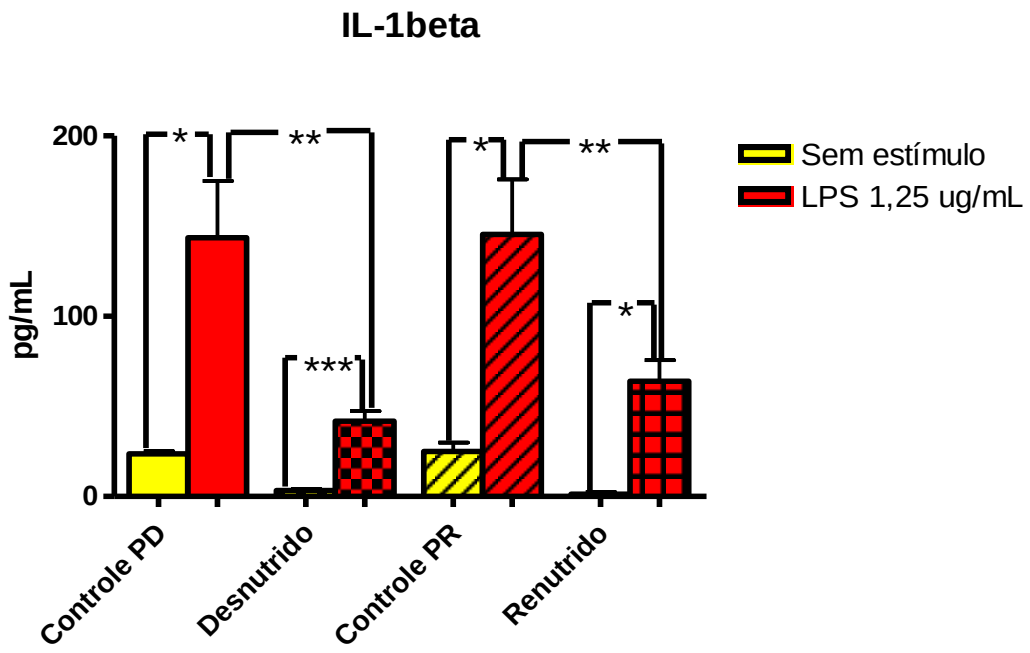
porém, de forma menos intensa do que o Grupo Controle PR (7770,0pg/mL ± 2248,0 e 11137,0pg/mL ± 19,94 (p=0,1269), respectivamente) (Figura 26B).

A produção de TNF-α na ausência de estímulo foi semelhante em todos os grupos experimentais. Em camundongos **Swiss Webster**, a síntese dessa citocina nas culturas estimuladas aumentou em relação ao estado basal nos grupos Controle PD (p=0,0554) e Controle PR (p=0,0806), bem como nos grupos Desnutrido e Renutrido, sendo significante nesses 2 últimos. Mesmo assim, a produção do Grupo Desnutrido foi significativamente inferior à do Grupo Controle PD (121,6pg/mL ± 1,53 e 293,4pg/mL ± 92,12, respectivamente). Após o período de renutrição, o Grupo Renutrido reverteu esse quadro, apresentando aumento da produção de TNF-α nas culturas estimuladas de forma similar ao Grupo Controle PR (251,90pg/mL ± 33,05 e 281,4pg/mL 98,8, respectivamente) (Figura 26C). Camundongos **C57BL/6J**, após estímulo com LPS, a produção de TNF-α foi significativamente superior em todos os grupos experimentais. No entanto, o Grupo Desnutrido apresentou valores inferiores aos apresentados pelo Grupo Controle PD (124,6pg/mL±21,28 e 231,2pg/mL±37,12, respectivamente). Porém, nessa linhagem, o Grupo Renutrido continuou apresentando comprometimento da produção dessa citocina, mostrando valores inferiores aos do Grupo Controle PR (102,8pg/mL±23,23 e 190,6pg/mL±54,04, respectivamente) (Figura 27B).

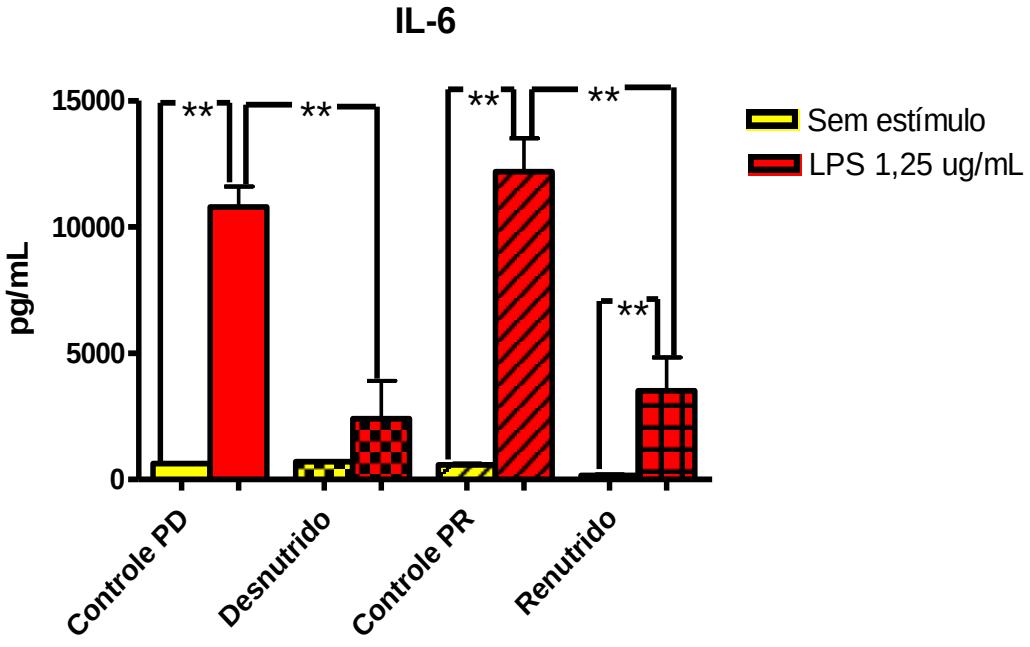
Em relação à produção de citocinas regulatórias, não foi detectada produção de IL-4 nas culturas analisadas. Em camundongos **Swiss Webster**, a produção de IL-10 por culturas não estimuladas de animais do Grupo Desnutrido foi superior à dos animais do Grupo Controle PD (727,2pg/mL ± 57,76 e 280,4pg/mL ± 10,47, respectivamente). O mesmo ocorreu com as culturas do Grupo Renutrido em relação às do Grupo Controle PR (760,0pg/mL ± 34,78 e 247,0pg/mL ± 36,77, respectivamente). Após o estímulo com LPS, todos os grupos apresentaram aumento da produção desta citocina em relação ao estado basal, sendo que nos grupos Controle PD (p=0,0677) e Desnutrido (p=0,0591) esse aumento não foi significativo, enquanto nos grupos Controle PR (p=0,0408) e Renutrido (p=0,0050) houve significância estatística. Assim como nas culturas sem estímulo, o Grupo Desnutrido

apresentou aumento significante da produção de IL-10 após estímulo com LPS em relação ao Grupo Controle PD (802,1pg/mL ± 75,53 e 490,6pg/mL ± 80,89, respectivamente). No Grupo Renutrido, também houve aumento da síntese de IL-10 em relação ao Grupo Controle PR (841,2pg/mL ± 25,99 e 410,1pg/mL ± 30,97, respectivamente), evidenciando a persistência do comprometimento na produção dessa citocina (Figura 26D). Em camundongos **C57BL/6J**, a produção basal de IL-10 foi semelhante entre os grupos experimentais. Após estímulo com LPS, o Grupo Desnutrido, apresentou valores superiores aos do Grupo Controle PD (816,3pg/mL±275,4 e 379,2±96,77, respectivamente). O Grupo Renutrido, por sua vez, apresentou redução da produção de IL-10, tendo o mesmo comportamento do Grupo Controle PR (386,7pg/mL±87,70 e 308,5pg/mL±148,6, respectivamente) (Figura 27C).

A


IL-1beta
200
100
0
pg/mL
*
**
***
*
**
*
Controle PD
Desnutrido
Controle PR
Renutrido
Sem estímulo
LPS 1,25 ug/mL

B


IL-6
15000
10000
5000
0
pg/mL
**
**
**
**
**
Controle PD
Desnutrido
Controle PR
Renutrido
Sem estímulo
LPS 1,25 ug/mL

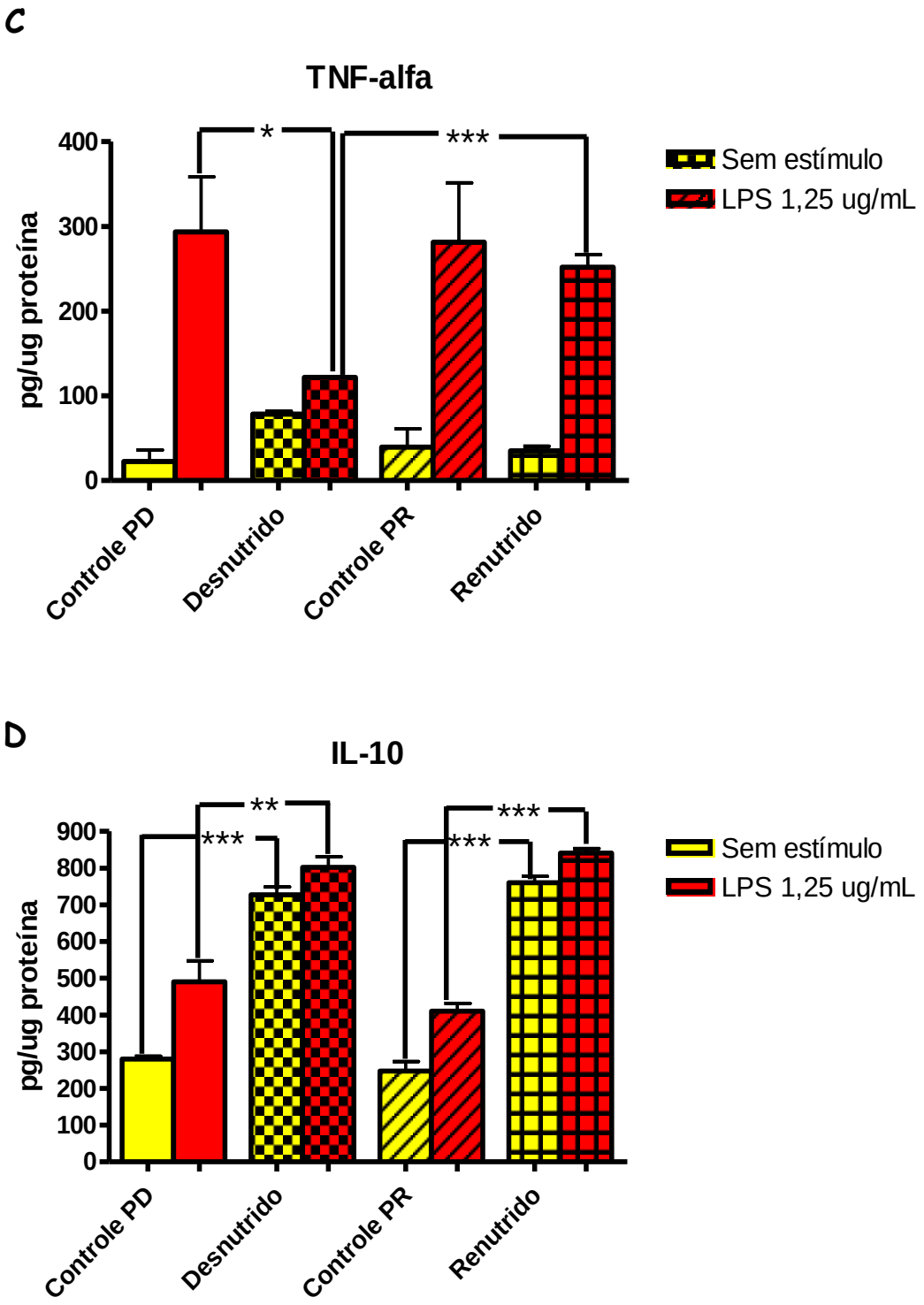
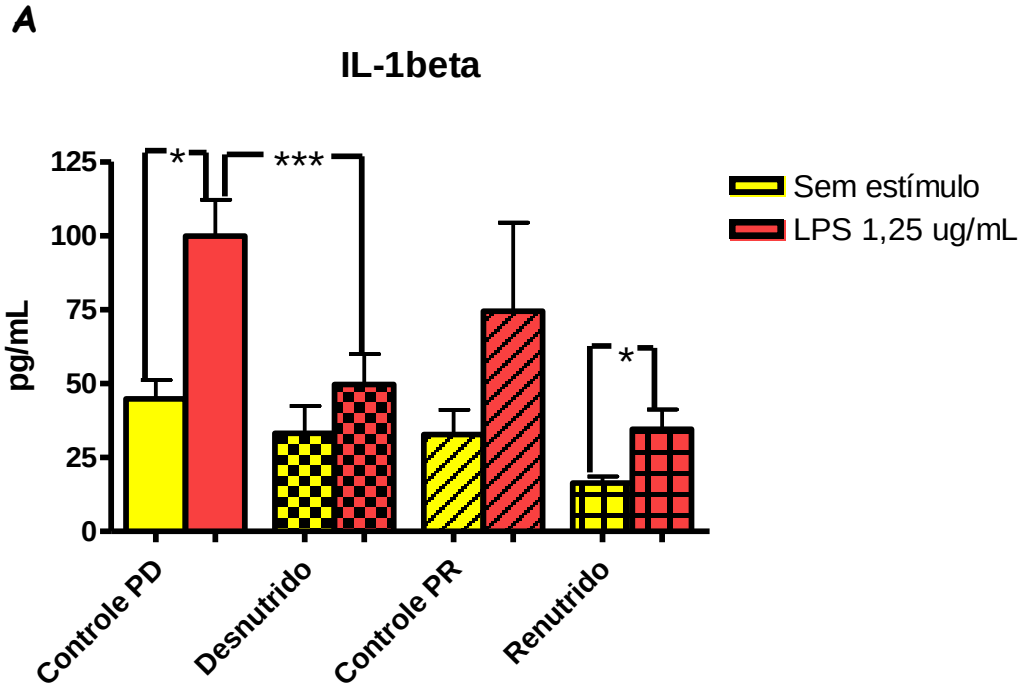
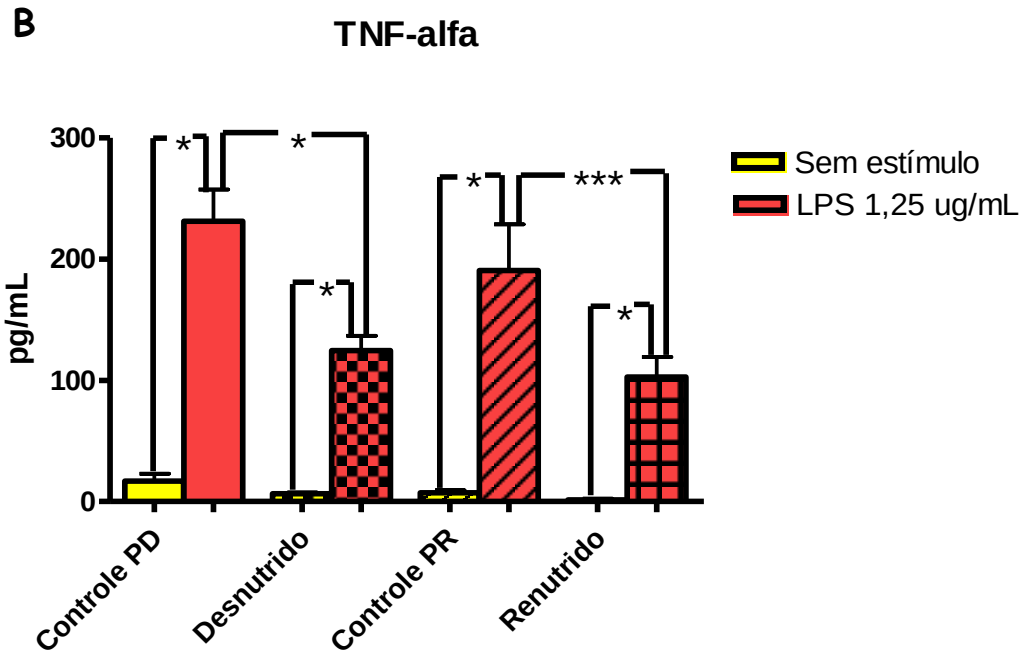


Figura 26. Resultados, em valores médios±SDM, da concentração de IL-1β (A), IL-6 (B), TNF-α (C) e IL-10 (D) produzidas por macrófagos de camundongos **Swiss Webster** dos grupos Controle PD (n=6), Desnutrido (n=9), Controle PR (n=6) e Renutrido (n=9). * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,01. *** Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.


A
IL-1beta
pg/mL
125
100
75
50
25
0
*
***
*
Sem estímulo
LPS 1,25 ug/mL
Controle PD
Desnutrido
Controle PR
Renutrido


B
TNF-alfa
pg/mL
300
200
100
0
*
*
*
*
***
*
Sem estímulo
LPS 1,25 ug/mL
Controle PD
Desnutrido
Controle PR
Renutrido

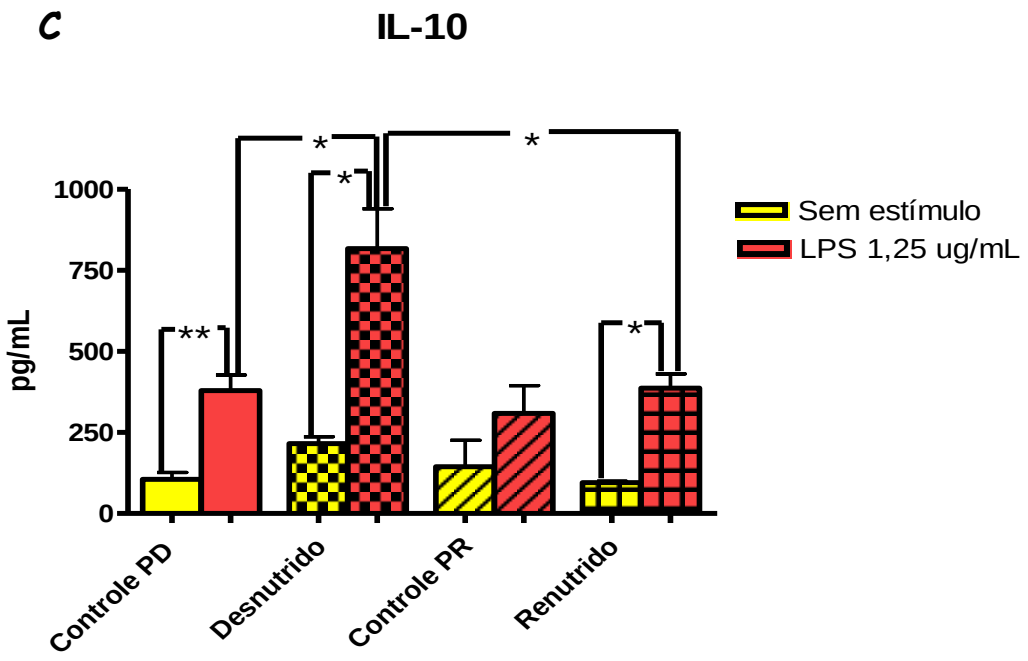


Figura 27. Resultados, em valores médios±SDM, da concentração de IL-1β (A), TNF-α (B) e IL-10 (C) produzidas por macrófagos de camundongos **C57BL/6J** dos grupos Controle PD (n=6), Desnutrido (n=9), Controle PR (n=6) e Renutrido (n=9). * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,01. *** Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais analisados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

4.4.8 Avaliação do receptor de LPS

O consumo de uma dieta hipoprotéica levou à redução da população de macrófagos de camundongos C57BL/6J que expressam de CD14, tanto em condições basais, como após estímulo inflamatório. Por outro lado, a população de macrófagos que expressa TLR4/MD2 apresentou alteração somente após o estímulo. Observou-se que o grupo Desnutrido apresentou diminuição da população que expressa CD14, tanto em condições basais, quanto após estímulo com LPS (2,32%±0,86 e 3,24%±1,51, respectivamente), em relação ao Grupo Controle PD (7,06%±0,67 e 8,42%±0,20, respectivamente). Após o período de renutrição, o Grupo Renutrido apresentou aumento da população que expressa esse receptor, tanto no estado basal, quanto no estado estimulado (5,44%±1,41 e 9,35%±0,27, respectivamente), alcançando os valores obtidos pelo Grupo Controle PR (4,93%±0,14 e 7,30%±0,71, respectivamente) (Figuras 28A e 28B).

O Grupo Desnutrido também apresentou redução da população que expressa TLR4/MD2 após estímulo com LPS em comparação ao Grupo Controle PD (9,48%±4,39 e 26,06%±6,73, respectivamente). No entanto, o retorno a uma dieta normoprotéica promoveu aumento da população que expressa esse receptor, visto que o Grupo Renutrido apresentou valores semelhantes aos do Grupo Controle PR (20,36%±3,61 e 27,15%±9,56, respectivamente) (Figuras 29A e 29B).

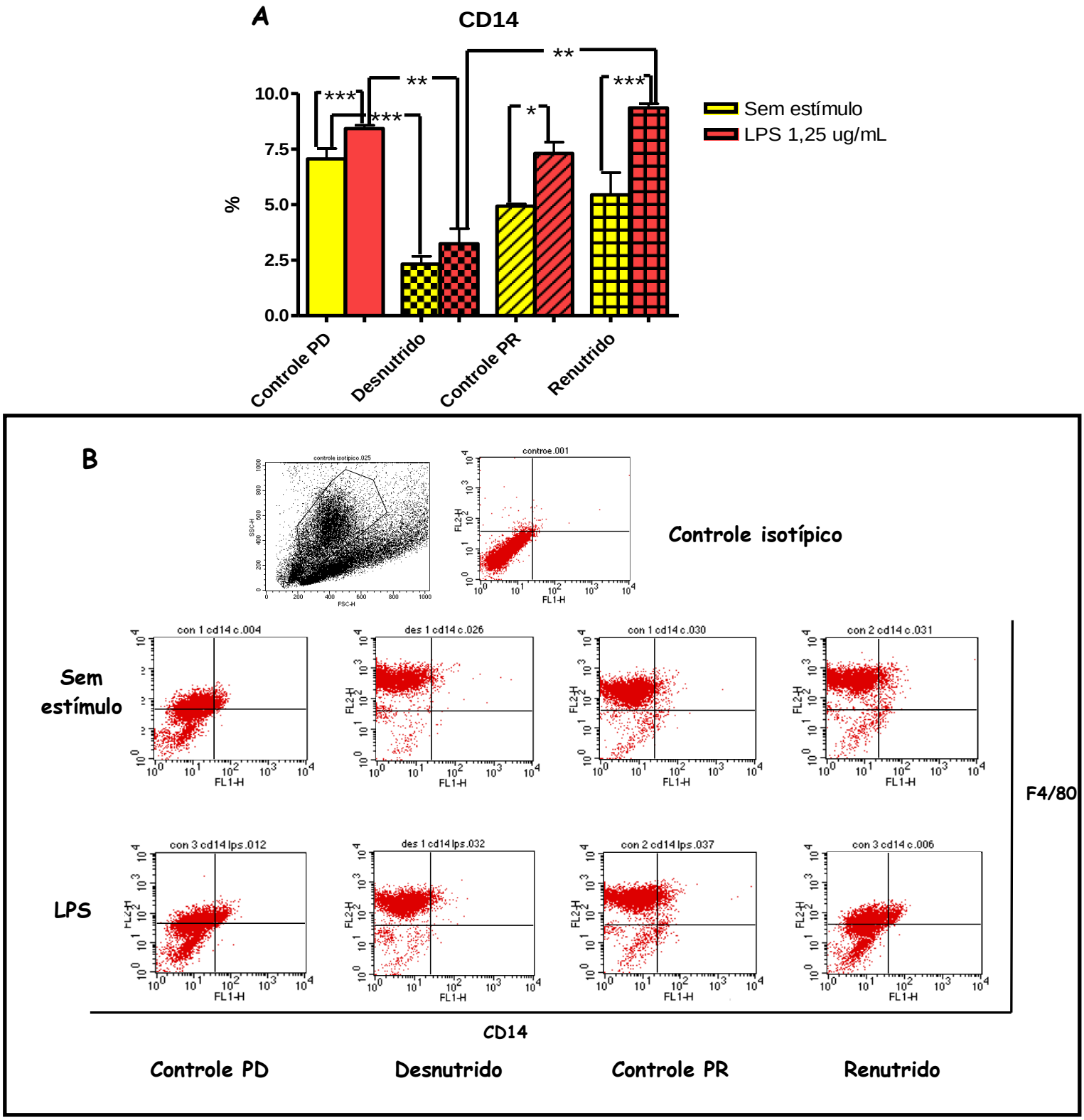


Figura 28. População de macrófagos expressando CD14 (A) e (B) de camundongos **C57BL/6J** dos grupos Controle PD (n=4), Desnutrido (n=7), Controle PR (n=4) e Renutrido (n=3). * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,01. ***Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais avaliados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição

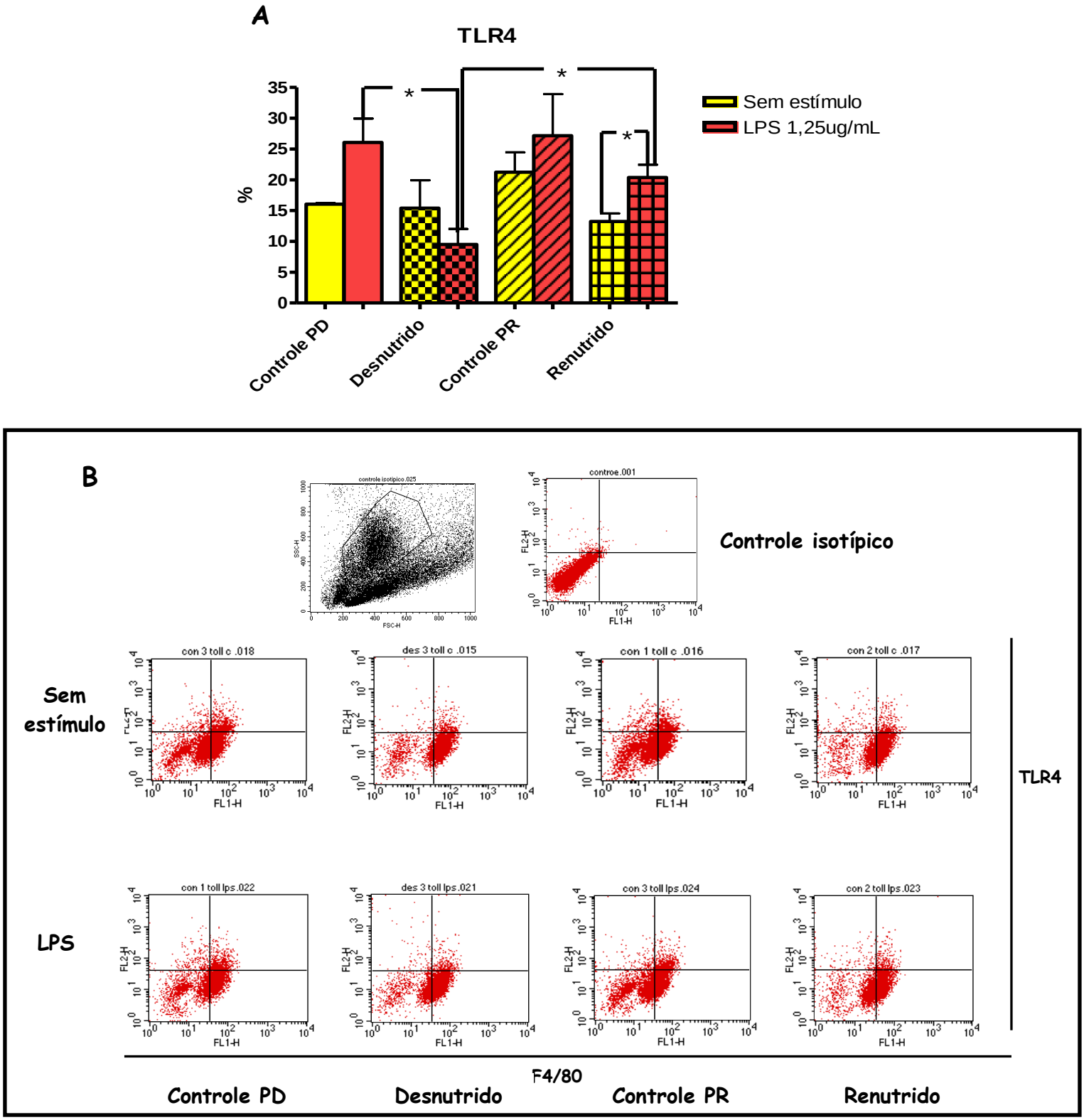


Figura 29. População de macrófagos expressando TLR4/MD2 (A) e (B) de camundongos ***C57BL/6J*** dos grupos Controle PD (n=4), Desnutrido (n=7), Controle PR (n=4) e Renutrido (n=3). * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,01. ***Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais avaliados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

4.4.9 Avaliação da ativação do fator de transcrição NFκB

Após estímulo com LPS, observou-se ativação de NFκB em todos os grupos experimentais. No entanto, a ativação apresentada por camundongos **C57BL/6J** do Grupo Desnutrido foi menor do que a observada no Grupo Controle PD (11,3% e 85,8%, respectivamente). O retorno à dieta normoprotéica não reverteu este quadro, visto que o Grupo Renutrido continuou apresentando menor porcentagem de ativação em comparação ao Grupo Controle PR (8,7% e 39,3%, respectivamente) (Figura 30).

4.4.10 Avaliação da via de sinalização do fator de transcrição NFκB

Para avaliação da via de sinalização de NFκB ativada por LPS e dependente de MyD88, foram escolhidas as proteínas MyD88, TRAF-6, IκKβ, IκBα e NFκB. Em amostras não estimuladas, essas proteínas não diferiram entre os grupos experimentais. A exceção foi o Grupo Controle PD, que apresentou aumento significante de IκKβ em relação ao Grupo Desnutrido (Figura 31C). Após estímulo com LPS, o Grupo Controle PD apresentou aumento significante de MyD88, TRAF-6 e IκKβ em relação às amostras não estimuladas. O Grupo Desnutrido, por sua vez, não apresentou aumento destas proteínas nas amostras estimuladas, permanecendo significativamente inferior ao Grupo Controle PD (Figuras 31A, 31B e 31C). A análise de IκBα mostrou redução significativa após estímulo no Grupo Controle PD em relação às amostras não estimuladas. Esse comportamento não foi observado no Grupo Desnutrido, que apresentou IκBα em amostras estimuladas significativamente superior ao apresentado pelo seu respectivo grupo controle e semelhante às amostras sem estímulo (Figura 31D). Em amostras estimuladas com LPS, o Grupo Renutrido apresentou aumento significante de MyD88 em relação às amostras não estimuladas e ao Grupo Desnutrido, porém, ainda inferior ao Grupo Controle PR (Figura 31 A). A proteína TRAF-6 permaneceu reduzida no Grupo Renutrido, enquanto IκKβ aumentou de forma significante em relação às amostras sem estímulo e ao Grupo Desnutrido,

apresentando valores semelhantes aos do Grupo Controle PR (Figuras 31B e 31C). Amostras estimuladas do Grupo Renutrido também apresentaram IκBa semelhante às amostras não estimuladas e significativamente superior ao apresentado pelo Grupo Controle PD (Figura 31D). O fator de transcrição NFκB não apresentou diferença em amostras sem estímulo e amostras estimuladas dos grupos experimentais (Figura 31E). A avaliação das formas fosforiladas de NFκB e IκBa mostrou aumento em decorrência do estímulo com LPS nos Grupos Controle PD e Controle PR. O Grupo Desnutrido apresentou redução das formas fosforiladas nas amostras estimuladas em relação ao Grupo Controle PD, sendo que a diminuição de IκBa fosforilado foi significante. O Grupo Renutrido apresentou aumento de NFκB e IκBa fosforilados após estímulo em relação às amostras não estimuladas, mostrando valores semelhantes aos do Grupo Controle PR (Figuras 31F e 31G). A relação NFκB fosforilado/NFκB total foi superior nos Grupos Controle PD e Controle PR nas amostras estimuladas com LPS. O Grupo Desnutrido apresentou proporção reduzida de NFκB fosforilado em relação ao seu respectivo grupo controle. O Grupo Renutrido apresentou aumento desta proporção em relação ao Grupo Desnutrido, mas ainda inferior ao Grupo Controle PR. A relação IκBa fosforilado/ IκBa total aumentou após estímulo com LPS e foi semelhante em todos os grupos experimentais (Figuras 31H e 31I).

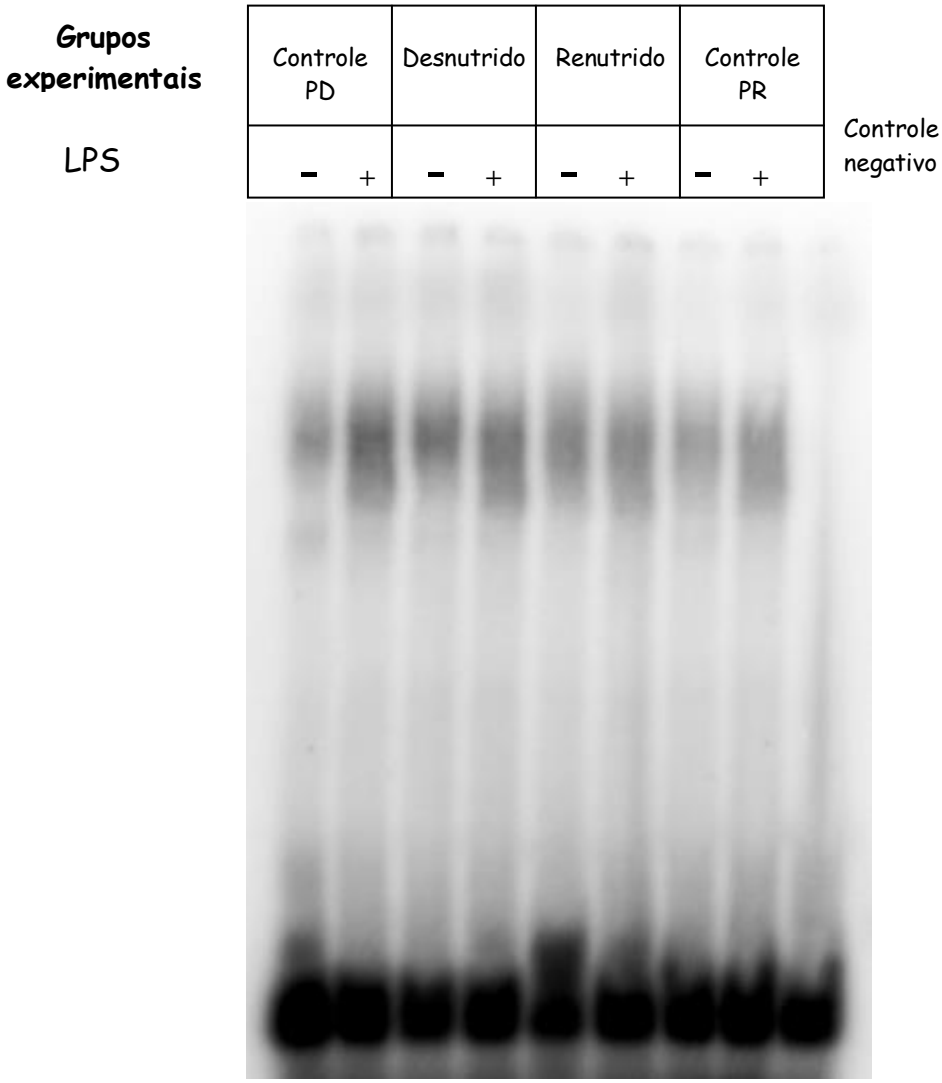
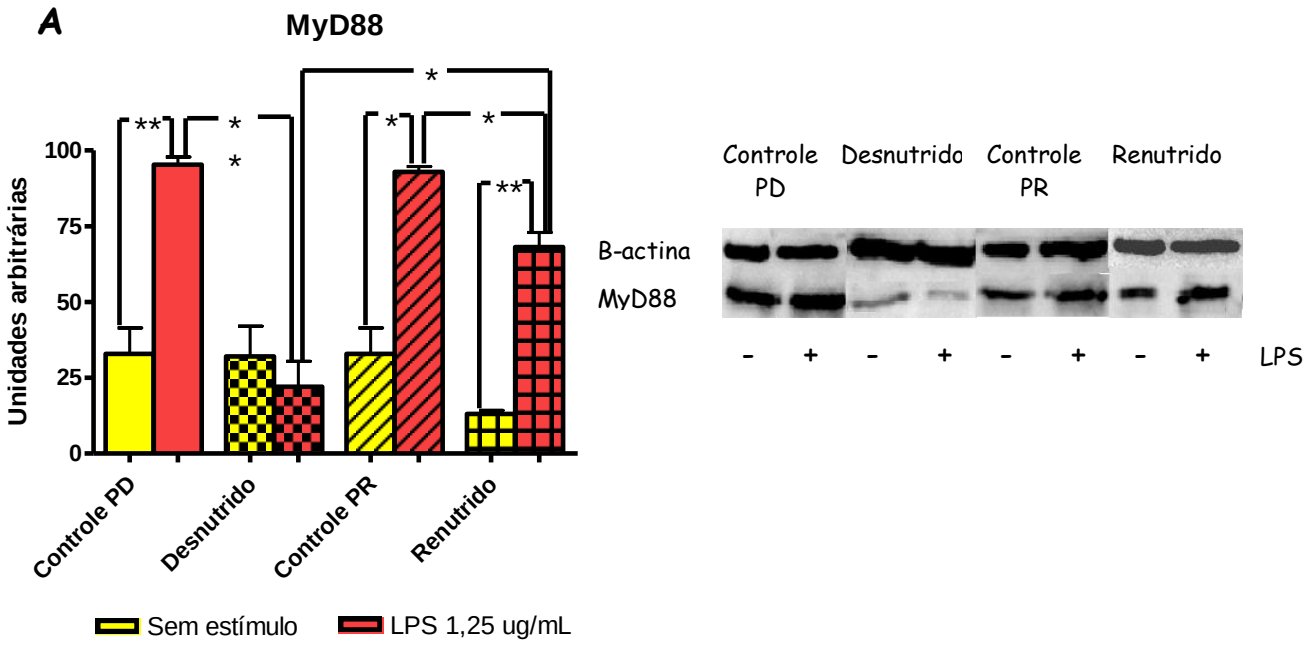
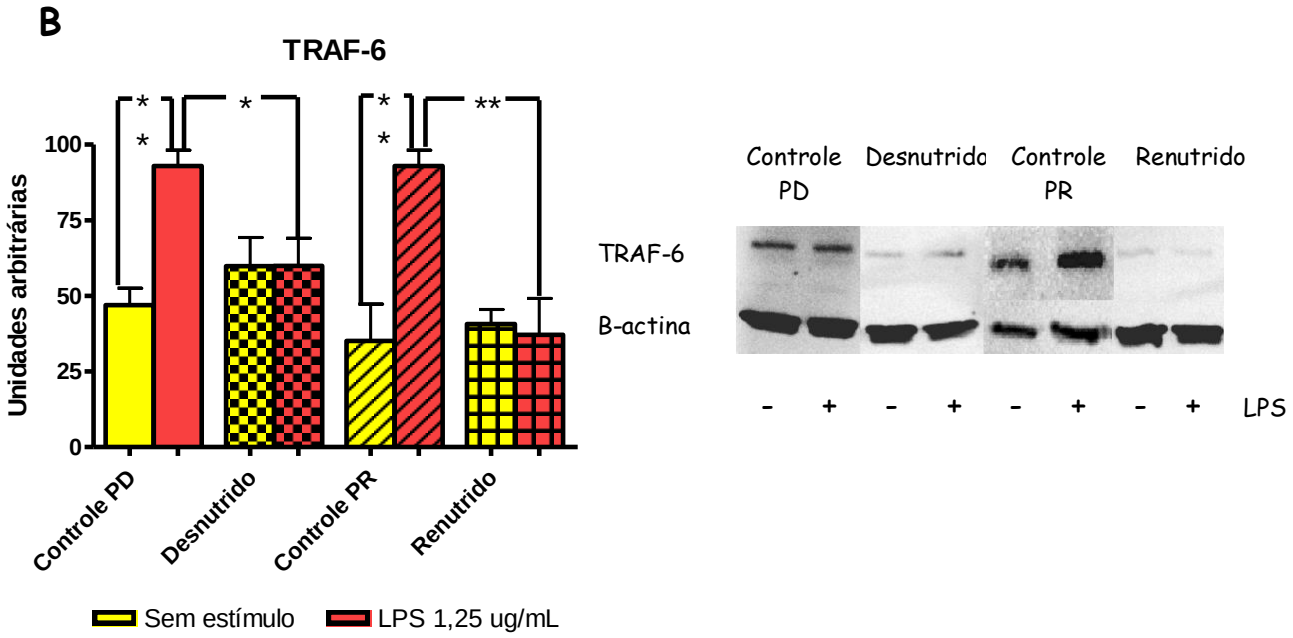
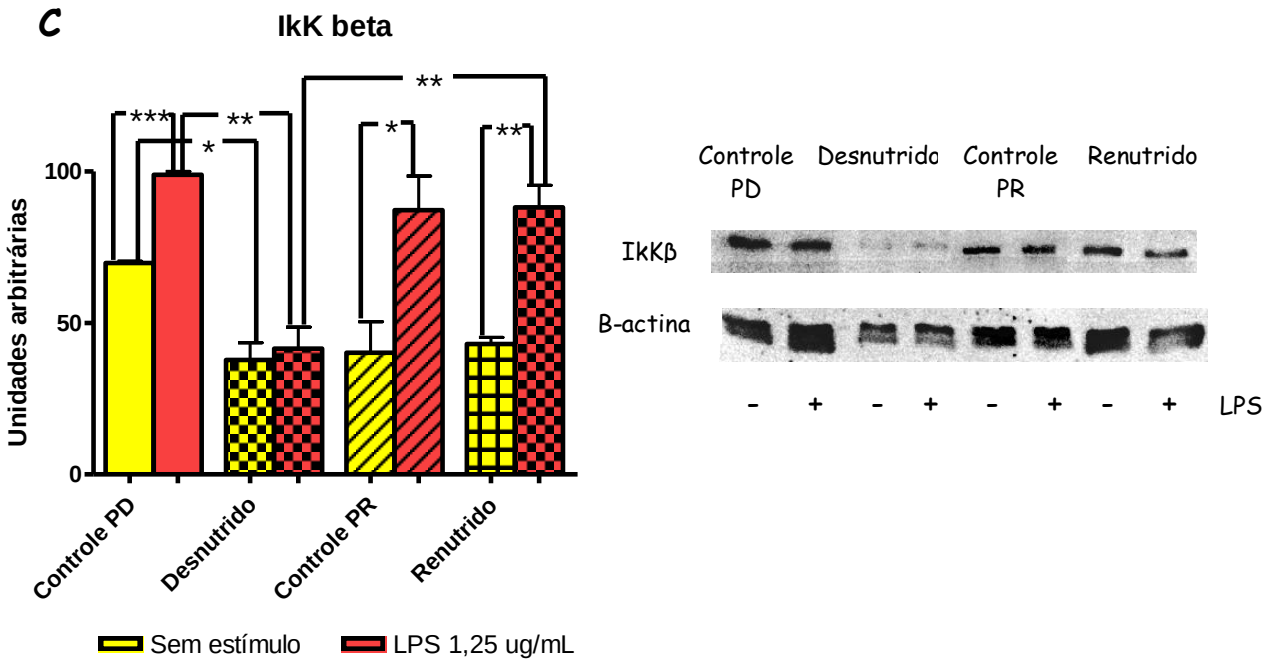
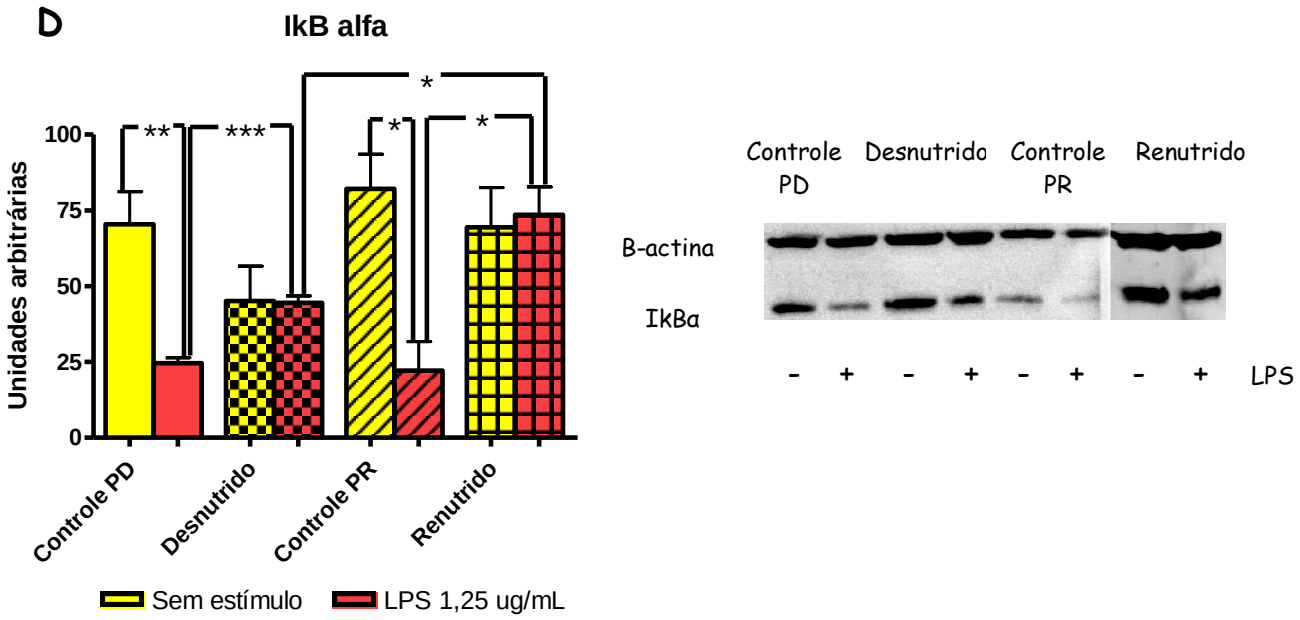


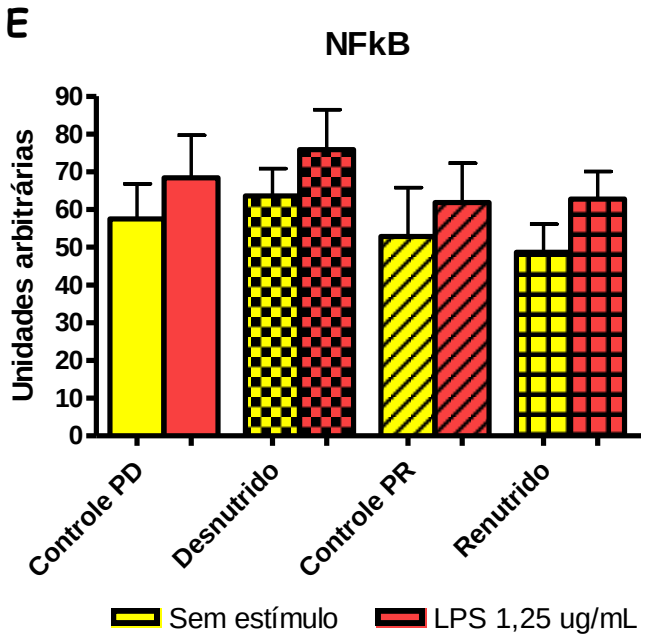
Figura 30. Ativação do fator NFκB em **camundongos C57BL/6J** dos grupos Controle PD (n=4), Desnutrido (n=4), Controle PR (n=4) e Renutrido (n=3). **n** representa número de animais avaliados. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

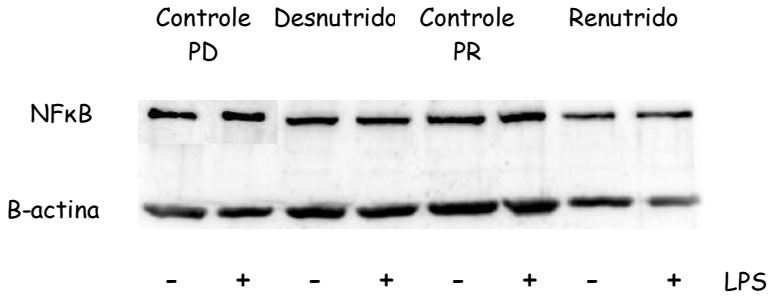

A
MyD88
Unidades arbitrárias
100
75
50
25
0
Controle PD
Desnutrido
Controle PR
Renutrido
Sem estímulo
LPS 1,25 ug/mL
Controle PD
Desnutrido
Controle PR
Renutrido
B-actina
MyD88
- + - + - + - + LPS


B
TRAF-6
Unidades arbitrárias
100
75
50
25
0
Controle PD
Desnutrido
Controle PR
Renutrido
Sem estímulo
LPS 1,25 ug/mL
Controle PD
Desnutrido
Controle PR
Renutrido
TRAF-6
B-actina
- + - + - + - + LPS

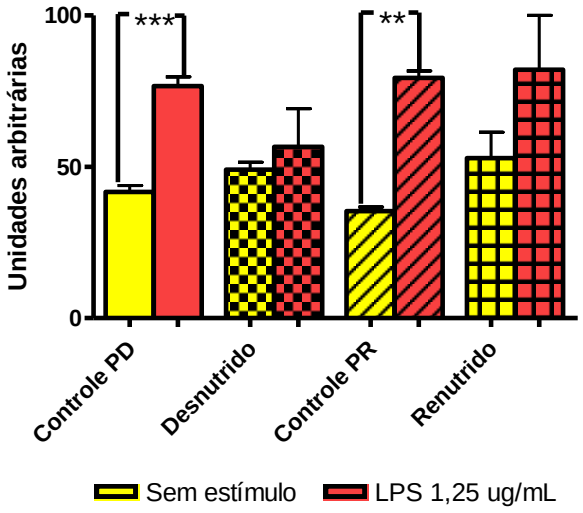

C
IkK beta
Unidades arbitrárias
100
50
0
***
**
*
**
*
**
Controle PD
Desnutrido
Controle PR
Renutrido
Sem estímulo
LPS 1,25 ug/mL
Controle PD
Desnutrido
Controle PR
Renutrido
IkKβ
B-actina
- + - + - + - + LPS

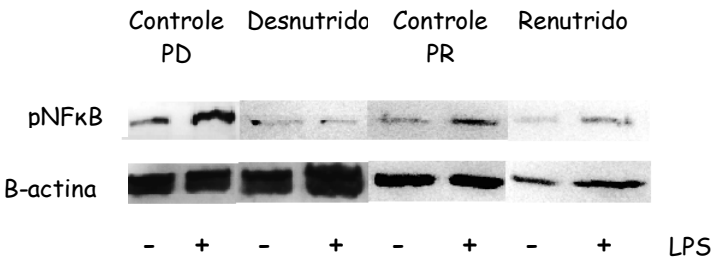

D
IkB alfa
Unidades arbitrárias
100
75
50
25
0
**
***
*
*
*
Controle PD
Desnutrido
Controle PR
Renutrido
Sem estímulo
LPS 1,25 ug/mL
Controle PD
Desnutrido
Controle PR
Renutrido
B-actina
IkBa
- + - + - + - + LPS


E
NFkB
Unidades arbitrárias
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Controle PD
Desnutrido
Controle PR
Renutrido
Sem estímulo
LPS 1,25 ug/mL

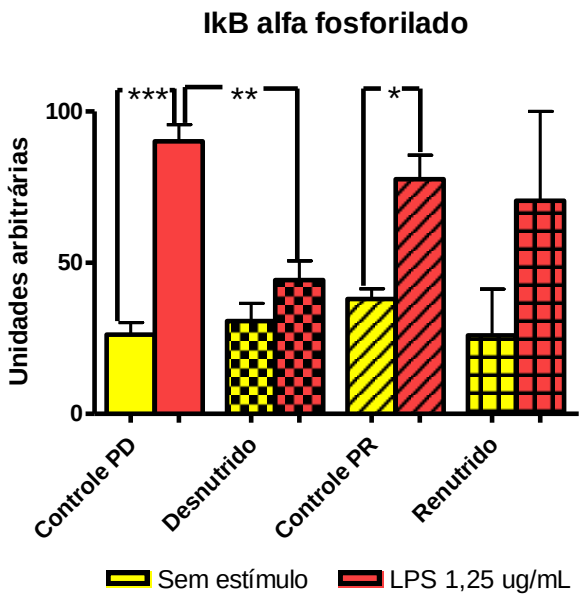

Controle PD
Desnutrido
Controle PR
Renutrido
NFκB
B-actina
- + - + - + - + LPS

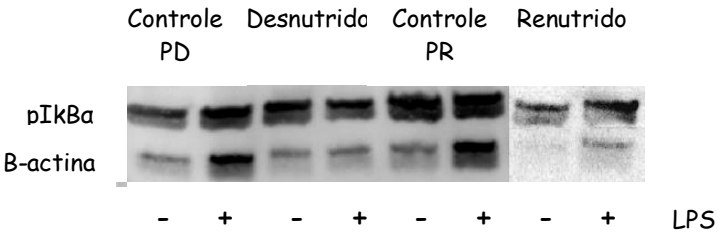
F


NFkB fosforilado
Unidades arbitrárias
100
50
0
***
**
Controle PD
Desnutrido
Controle PR
Renutrido
Sem estímulo
LPS 1,25 ug/mL


Controle PD
Desnutrido
Controle PR
Renutrido
pNFκB
B-actina
- + - + - + - +
LPS

G


IkB alfa fosforilado
Unidades arbitrárias
100
50
0
***
**
*
Controle PD
Desnutrido
Controle PR
Renutrido
Sem estímulo
LPS 1,25 ug/mL


Controle PD
Desnutrido
Controle PR
Renutrido
pIkBα
B-actina
- + - + - + - +
LPS

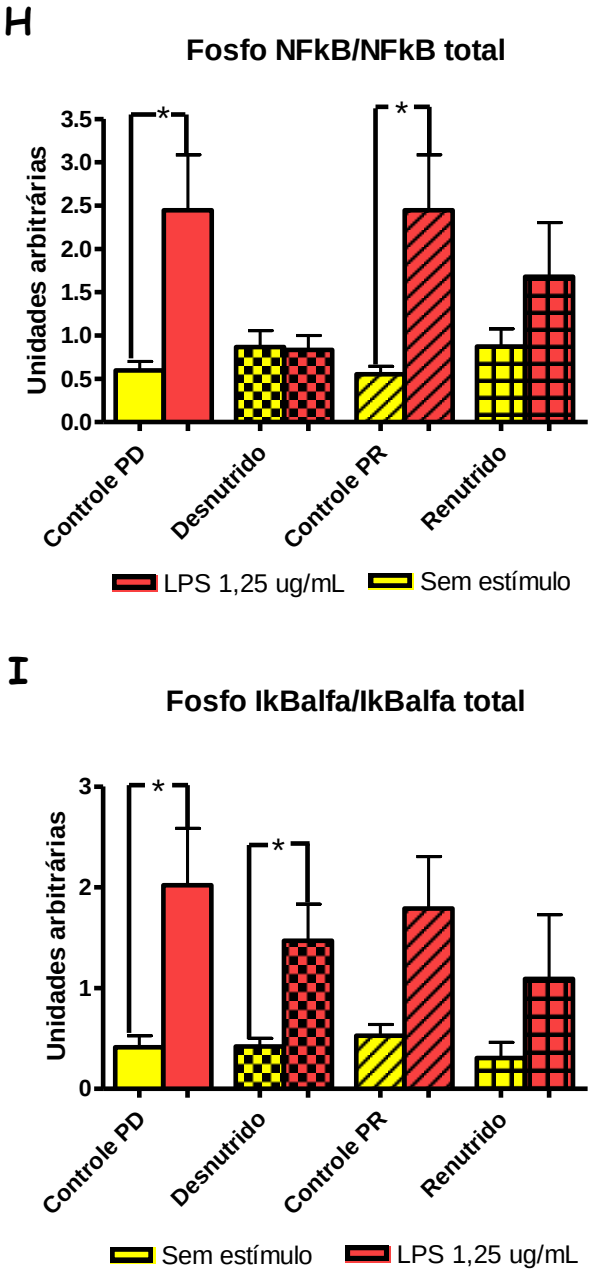


Figura 31. Expressão das proteínas MyD88 (A), TRAF-6 (B), IkKβ (C), IkBα (D), NFκB (E), pNFκB (F), pIkBα (G) e relação NFκB fosforilado/NFκB (H) e IκBα fosforilado/ IκBα total (I) de **camundongos C56BL/6J** dos grupos Controle PD (n=5), Desnutrido (n=5), Controle PR (n=5) e Renutrido (n=5). * Valores significativos para p<0,05. ** Valores significativos para p<0,01. *** Valores significativos para p<0,001. **n** representa número de animais utilizados no experimento. Controle PD = Controle do Período de Desnutrição. Controle PR = Controle do Período de Renutrição.

5. DISCUSSÃO

5.1 Linhagens utilizadas

No presente trabalho, utilizamos as linhagens de camundongos Swiss Webster (não isogênica) e C57BL/6J (isogênica). A proposta inicial do projeto era a avaliação, em camundongos Swiss Webster, de aspectos nutricionais, hematológicos e relativos à imunidade inata de animais desnutridos submetidos à recuperação nutricional. No entanto, os resultados obtidos em relação à função imune tornaram necessária a avaliação da via de sinalização ativada por LPS em macrófagos. Tendo em vista que diversos trabalhos avaliando a via estimulada por LPS foram realizados com linhagens isogênicas, e, em nosso laboratório, a avaliação de vias de sinalização importantes na hemopoese é realizada em camundongos C57BL/6J, a avaliação da sinalização que culmina com a ativação do fator de transcrição NFκB foi realizada com esta linhagem. Assim, a avaliação do peso corporal, do consumo de ração e da concentração sérica de proteínas totais e albumina foi realizada nesses animais somente para caracterizar o quadro de desnutrição. Sabendo-se que o perfil imunológico pode diferir entre as linhagens, foi realizada a avaliação hematológica, bem como da produção de óxido nítrico e de citocinas (visto que a produção dessas espécies está diretamente relacionada à ativação mediada por LPS) em camundongos C57BL/6J para caracterizar o impacto da desnutrição no sistema imune dessa linhagem.

5.2 Aspectos nutricionais

No modelo experimental utilizado em nosso laboratório, empregamos uma ração hipoprotéica (2% de proteína) (DU et al., 2000, LING et al., 2009). Estudos mostrando o efeito de rações hipoprotéicas sobre o peso e o consumo de ração dos animais evidenciaram resultados controversos. Alguns mostram que dietas com baixa concentração de proteínas levam ao aumento do consumo de ração (COLOMBO et al., 1992; WHITE et al., 1994, 1998, 2009); outros mostram que esse tipo de dieta induz diminuição da ingestão (LING et al.,

2009; MERCER et al., 1994). Em nosso modelo experimental, observamos aumento do consumo de ração dos animais desnutridos em relação aos animais controles em ambas as linhagens estudadas. De acordo com HUANG & FRAKER (2003), camundongos adultos jovens são capazes de se adaptar a desnutrição crônica causada por restrição protéica moderada. Isso aconteceria devido a um mecanismo no qual há aumento da absorção de aminoácidos provenientes da dieta e aumento da reabsorção de aminoácidos endógenos provenientes do maior catabolismo protéico em decorrência da diminuição de proteína na ração. Além disso, a adaptação dos animais também compreenderia aumento do consumo de ração para compensar a falta de proteína na dieta. A redução da ingestão de aminoácidos essenciais seria responsável por desencadear o sinal responsável pelo aumento da ingestão do alimento (WHITE et al., 2000). Dessa forma, os animais obteriam nutrientes e proteínas necessários à estabilização da massa corpórea (HUANG; FRAKER, 2003). Webster (1993) também relata aumento do consumo de ração na tentativa do animal de atingir seus requerimentos protéicos. Assim, em nosso estudo, os animais alimentados com ração hipoprotéica apresentaram consumo superior ao apresentado pelos animais controles a fim de aumentar a quantidade de proteína ingerida. O aumento do consumo de ração levaria ao aumento da energia ingerida em decorrência do aumento da ingestão de outros nutrientes. Esse aumento da ingestão, no entanto, não é ilimitado. Ele é restringido pelo excesso de energia ingerido (que acaba sendo armazenada na forma de tecido adiposo), sugerindo um possível mecanismo envolvendo a ingestão energética e a ingestão protéica na regulação do total de alimento consumido (MEYER, 1958). Além desse mecanismo, o aumento de consumo resultante da alimentação com uma dieta hipoprotéica poderia decorrer de uma diminuição da concentração de leptina (DU et al., 2000) ou da resistência a esse hormônio (WIDDOWSON et al., 1997). O aumento significativo do consumo de ração dos animais desnutridos tornou desnecessária a utilização de um grupo *pair-feed* para equiparar o consumo de nutrientes entre esse grupo e o grupo controle. Isso porque, ingerindo tanto ou mais ração do que os animais controles, o grupo desnutrido não apresentaria deficiência de nutrientes em relação aos primeiros. Assim, a proteína seria a única variável nutricional

responsável pelas alterações observadas. O protocolo de desnutrição utilizado em nosso trabalho teve duração de 5 semanas (35 dias). Traçando um paralelo com humanos, 35 dias da idade de um camundongo equivaleria, aproximadamente, a 2 anos da idade de um homem (QUINN, 2005). Dessa forma, o processo de desnutrição empregado em nosso modelo pode ser considerado crônico e grave. Em camundongos Swiss Webster, também foi observado aumento significativo do consumo de água dos animais desnutridos em relação aos animais controles. Esse comportamento está de acordo com dados obtidos na literatura e poderiam indicar possível desidratação dos animais desnutridos em decorrência da depleção das reservas de glicogênio, visto que cada molécula desse carboidrato é armazenada juntamente com 4 moléculas de água (ZIEGLER; FILER, 1996).

Perda de peso é frequentemente relatada em indivíduos que apresentam desnutrição protéico-energética (MEIJERS et al., 2010) e em modelos animais que empregam restrição alimentar ou dietas hipoprotéicas (LING et al., 2009). Corroborando os dados da literatura, em nosso modelo, animais desnutridos de ambas as linhagens apresentaram significativa perda de peso em relação aos animais controles em um período de 35 dias. Após o retorno à dieta normoprotéica, os animais apresentaram ganho de peso corporal de aproximadamente 54% em relação ao peso que possuíam no início do processo de renutrição, superando a perda que apresentaram durante o período de desnutrição. O aumento de peso corporal no período de recuperação nutricional tem sido relatado em diversos estudos (HOLTKAMP et al., 2008; ISANAKA et al., 2009), sendo descrito o aumento de proteína na dieta como o principal fator responsável pelo ganho de massa corpórea. O ganho de peso durante a rehabilitação nutricional pode estar relacionado ao aumento da massa magra, que ocorreria devido ao aumento da eficiência da conversão energética, permitindo que mais energia seja utilizada na síntese de proteínas, lipídios e glicogênio (ANDREOLI et al., 2007; BOZA et al., 1999; WALRAND et al., 2000). Além, disso, o grupo renutrido apresentou redução do consumo de ração em relação aos animais desnutridos, mostrando que o restabelecimento da quantidade normal de proteína na dieta aparentemente normalizou o controle da ingestão do alimento. Nesse caso, o aumento da taxa de conversão energética também explicaria por

que mesmo com uma ingestão menor de ração em relação ao grupo desnutrido o peso corporal dos animais renutridos aumentou.

Em experimento piloto feito anteriormente foi verificado que, durante o processo de desnutrição, os animais que receberam a ração hipoprotéica não apresentaram diminuição do consumo de ração em relação aos animais controles (ou seja, não apresentaram comportamento anorético). Ao contrário, apresentaram consumo significantemente superior, indicando que a desnutrição protéica não afetou a capacidade de se alimentarem sozinhos. Em vista dessa observação, verificou-se não ser necessário adotar um protocolo especial de renutrição, no qual tanto água quanto a ração seriam administradas oralmente (com o auxílio de uma seringa), em intervalos de tempo regulares (de 3 em 3 horas, durante um período de 12 horas). A observação desse fato foi importante visto que um possível comportamento anorético dos animais poderia comprometer a recuperação nutricional (esta poderia não ocorrer devido a uma falta de ingestão da ração pelos animais).

A DPE é considerada o principal fator desencadeante da hipoalbuminemia e hipoproteinemia (ANDREOLI et al., 2007; SAHOO et al., 2009; SWAILS, et al., 1996; VINCENT et al., 2003), embora a redução de proteínas séricas totais em decorrência da desnutrição não seja um consenso (KOJIMA et al., 2007; NOVA et al., 2004). De maneira geral, na DPE, há expansão do fluido extracelular, bem como aumento das proteínas de fase aguda (necessárias à resposta imune e reparo tecidual) e diminuição de albumina e proteínas do músculo esquelético (JENSEN et al., 2009). Em nosso modelo, observamos redução da concentração sérica, tanto de proteínas totais, quanto de albumina em animais desnutridos de ambas as linhagens. Tanto a hipoproteinemia quanto a hipoalbuminemia observadas decorrem da alimentação com uma dieta hipoprotéica, uma vez que, mesmo o consumo de ração dos animais do grupo desnutrido tendo aumentado, a quantidade total de proteína ingerida foi significantemente inferior àquela ingerida pelo grupo controle. Isso levaria ao comprometimento da síntese de proteínas hepáticas. Após a recuperação nutricional, o aumento da concentração sérica de proteínas totais e albumina decorrente do maior consumo de proteínas na dieta, é relatado como um dos primeiros sinais melhora do estado

nutricional (EL-SAYED et al., 2006; KABURAGI et al., 2007, NOVA et al., 2008). Em concordância com esses achados, os animais submetidos à renutrição apresentaram reversão completa do quadro de hipoproteinemia e hipoalbuminemia, sugerindo o restabelecimento da síntese de proteínas hepáticas.

A DPE tem sido associada a diversas mudanças metabólicas, entre elas, efeitos adversos no metabolismo da insulina e tolerância à glicose, principalmente em crianças e adultos jovens (MARTINS et al., 2008). Estudos clássicos envolvendo crianças desnutridas mostram redução na concentração sérica de insulina, hipoglicemia e comprometimento da resposta de insulina à sobrecarga de glicose. A despeito da normalização dessas alterações após a recuperação nutricional, a dimuinuição da tolerância à glicose persiste ainda por vários meses (WATERLOW, 1996). Entretanto, a maioria dos estudos descreve o efeito da desnutrição intrauterina e pós-natal no metabolismo da insulina e, dependendo da população de estudo e do modelo adotado, resultados diversos acerca da glicemia e do comportamento da insulina em indivíduos desnutridos tem sido encontrados. Da mesma foram que estudos mostram aumento da concentração sérica de insulina e intolerância à glicose em decorrência de dietas hipoprotéicas (MIÑANA-SOLIS et al., 2008), com comprometimento da liberação de insulina em resposta à sobrecarga de glicose (CRACE et al., 1991; SOLIMAN et al., 1986; WEINKOVE et al., 1976), outros mostram redução da concentração desse hormônio (FERREIRA et al., 2004; FILIPUTTI et al., 2008; GRACE et al., 1990; MARTINS et al., 2006; MARTINS et al., 2008). Nesse último caso, a diminuição de insulina pode levar a uma série de alterações metabólicas como diabetes e doenças cardiovasculares (MARTINS et al., 2006; SILVA et al., 2010), sendo o principal fator que leva ao aumento da lipólise, diminuição da captação de glicose pelo músculo esquelético e aumento da captação de glicose hepática, que caracterizam o estado de desnutrição (SOLIMAN et al., 2000). Alterações na glicemia também não são um consenso na literatura, sendo que alguns estudos mostram normoglicemia em indivíduos desnutridos (CHAMSON-REIG et al., 2009; GONZÁLEZ-BARRANCO et al., 2003, MIÑANA-SOLIS et al., 2008). De modo geral, é relatada a redução da glicemia, sendo esse um dos fatores que contribuem para a redução

da concentração sérica de insulina (DAS et al., 1998a, MARTINS et al., 2006). Em nosso modelo, animais do grupo desnutrido apresentaram, tanto redução de glicemia, quanto redução da concentração sérica de insulina, com aumento da sensibilidade a esse hormônio e da tolerância à glicose, evidenciadas pelos resultados obtidos através dos testes de OGTT e ITT. Entre os mecanismos sugeridos para esse aumento da sensibilidade à insulina, estaria o aumento do número de receptores periféricos no tecido adiposo e no músculo. Esse aumento da sensibilidade poderia estabelecer um mecanismo contra-regulatório para compensar a baixa concentração de insulina (MARTINS et al., 2006). Estudos em animais mostram redução da concentração de insulina e aumento da captação de glicose mediada por insulina em ratos submetidos à desnutrição pós-natal (MOURA et al., 1997). No entanto, a sensibilidade à insulina em decorrência à desnutrição seria dependente da idade, sendo que estudos com desnutrição intrauterina mostram que o aumento da tolerância à glicose observado em indivíduos jovens vai diminuindo com o tempo, podendo levar a um quadro de resistência à insulina (CHAMSOM-REIG et al., 2009; HALES et al., 1996; PETRY et al., 2001) Neste trabalho, os animais avaliados apresentavam entre 3 e 5 meses, e em nossas condições experimentais, observamos aumento da sensibilidade à insulina. Após a renutrição, os animais apresentaram aumento da glicemia e da concentração sérica de insulina. No entanto, esses resultados continuaram abaixo dos apresentados pelos animais controles. A tolerância à glicose apresentada pelos animais renutridos também continuou semelhante à apresentada pelos animais desnutridos, indicando a persistência da sensibilidade aumentada à insulina. De modo geral é relatada normalização da glicemia e da concentração sérica de insulina, indicando a normalização do metabolismo (MARTINS et al., 2008). No entanto, embora alguns estudos mostrem o restabelecimento da concentração normal de insulina após a recuperação nutricional (MARTINS et al., 2008), outros evidenciam que o retorno à normalidade só ocorre um longo período (2 a 10 meses) após a recuperação nutricional (BECKER et al., 1971). Da mesma forma, alguns estudos relatam normalização da tolerância à glicose (BIESWAL et al., 2006; MARTINS et al., 2008; MIÑANA-SOLIS et al., 2008), enquanto outros mostram persistência da alteração na

sensibilidade à insulina (HALES et al., 1996). Em nosso modelo, os resultados obtidos indicam que a redução da concentração sérica de insulina poderia ser responsável pelo aumento da sensibilidade a esse hormônio no animais desnutridos, ocasionando a hipoglicemia observada. A persistência desse quadro nos animais renutridos indica a não normalização das alterações após o período de recuperação nutricional.

A concentração de IGF-I pode ser correlacionada com a quantidade de aminoácidos ingeridos na dieta (DINLEYICI et al., 2007; GIANOTTI et al., 2002). Dessa forma, dietas hipoprotéicas e hipocalóricas promovem diminuição da concentração desse hormônio. A redução na secreção de IGF-I pode representar uma resposta adaptativa à desnutrição protéico-energética, na qual a utilização prioritária dos nutrientes seria para atender às necessidades metabólicas agudas (CHAN; MANTZOROS, 2005). Isso ocorreria porque concentraçoes reduzidas de IGF-I levam à diminuição da utilização de energia e oxigênio, reduzindo o catabolismo (PALACIO et al., 2002a). Uma vez que a redução do consumo de proteínas compromete a secreção desse hormônio, indivíduos desnutridos apresentam baixa concentração de IGF-1 (KILIC et al., 2004). Assim como na literatura, verificou-se redução significativa da concentração de IGF-1 dos animais desnutridos em relação aos animais controles, indicando que a alimentação com uma dieta hipoprotéica promoveu a diminuição da concentração desse hormônio. Após o período de renutrição, a concentração sérica de IGF-1 aumentou de forma significante em relação aos animais desnutridos, porém continuou inferior àquela encontrada nos animais controles. De modo geral, o retorno a uma dieta normoprotéica promove o restabelecimento da concentração normal de IGF-I (PALACIO et al., 2002b; STEIN et al., 2006). Além disso, relata-se que a recuperação nutricional utilizando somente uma dieta normocalórica, sem a quantidade adequada de proteínas, não é suficiente para restabelecer a concentração normal de IGF-I, mostrando que não apenas energia, mas principalmente proteína, é necessária para elevar a concentração desse hormônio (VÁSQUEZ-GARIBAY et al., 2006). Os resultados obtidos para o grupo renutrido mostram que somente a dieta normoprotéica não foi suficiente para restabelecer os níveis séricos de IGF-1. Nesse caso, a diminuição de insulina encontrada no grupo renutrido seria

responsável pela concentração reduzida de IGF-1. Isso porque esse hormônio é responsável por mediar os efeitos anabólicos da insulina, tendo sua secreção estimulada por ela (DE GROOT, 2005).

Sabe-se que o tipo de dieta influencia na concentração de alguns hormônios e na resposta fisiológica ao estresse nutricional, porém a relação entre eles ainda não é bem compreendida (DU DOT et al., 2009). De maneira geral, a resposta fisiológica à deficiência aguda de proteínas e energia é conduzida por hormônios no sentido de conservar substratos e energia, enquanto promove e homeostase de glicose e uma preferência metabólica pela utilização de gordura (WOODWARD et al., 2004). Embora esses hormônios, principalmente cortisol em humanos e corticosterona em roedores, desempenhem um papel central na tentativa de adaptação à perda de peso (WOODWARD et al., 2004), o aumento de glicocorticóides no sangue em decorrência do estado de inanição promove alterações metabólicas deletérias (MONK et al., 2006), contribuindo para aumentar o estado catabólico do indivíduo. Diversos estudos relatam aumento de glicocorticóides em resposta à redução da quantidade de proteína e energia da dieta (BANDYOPADHYAY; PODDAR, 1998, HAMMARQVIST et al., 2005; LING et al., 2009). Esse aumento seria uma resposta do organismo a uma situação de estresse fisiológico e estaria relacionado ao aumento do hormônio do crescimento (GH) e à redução de insulina e leptina no sangue, compondo o quadro hormonal característico da desnutrição (MONK et al., 2006). Em nossos experimentos, observamos aumento significativo da concentração sérica de corticosterona nos animais do grupo desnutrido em relação aos animais do grupo controle. O quadro observado indica a presença de estresse metabólico nos animais que receberam a ração hipoprotéica. Após o retorno à dieta normoprotéica, a concentração sérica de corticosterona diminuiu de forma significante, mostrando que os animais do grupo renutrido estão se recuperando do estresse metabólico que leva o organismo a um estado catabólico, indicando que o aporte adequado de proteínas foi capaz de reduzir o catabolismo, diminuindo o estresse nutricional do organismo (HAMMARQVIST et al., 2005; HORNICK et al., 2000).

Após o período de desnutrição, houve aumento da concentração de glutamina plasmática dos animais do grupo desnutrido em relação aos animais dos grupos controle e renutrido. Em geral, em casos de restrição protéica, observa-se estresse fisiológico no qual é relatado, entre outras alterações, aumento da concentração sérica de corticosterona. Uma das conseqüências do aumento desse hormônio é a diminuição da massa magra. Sendo os músculos esqueléticos a principal fonte de glutamina para o organismo (ROGERO et al., 2004), a redução da massa magra levaria à redução da capacidade de manutenção da glutaminemia. Em contrapartida, o aumento de corticosterona também promove aumento da atividade da enzima glutamina sintetase muscular, aumento do efluxo de glutamina do músculo esquelético (pelo aumento da atividade da enzima aminotransferase de cadeia ramificada) e aumento da captação deste aminoácido pelo fígado e pelos rins (WALSH et al., 1998). Dessa forma, seria esperada diminuição na concentração plasmática de glutamina do grupo desnutrido, tanto pela redução da massa magra, como pelo aumento da captação hepática (CUNHA et al., 2003; KONG et al., 2000). Porém, a redução da massa magra também levaria à diminuição da glutamina muscular, o que também contribuiria para aumentar a atividade da enzima glutamina sintetase (que é sensível à concentração muscular desse aminoácido). Esse foi o quadro encontrado nos animais após o período de desnutrição: redução da glutamina muscular e aumento da atividade da enzima glutamina sintetase. Assim, nessa situação, haveria aumento da síntese de glutamina muscular e do seu efluxo para o sangue, sendo esses os mecanismos responsáveis pelo aumento da concentração plasmática desse aminoácido nos animais desnutridos.

Em animais desnutridos, a análise do músculo gastrocnêmio revelou redução da concentração total de proteína, DNA e RNA. Em condições de desnutrição ou privação alimentar, mudanças no metabolismo muscular levam à perda de nitrogênio e massa protéica, contribuindo para aumentar o grau de catabolismo (HAMMARQVIST et al., 2005). Esse comportamento é descrito na literatura, visto que diversos trabalhos relatam redução da quantidade total de proteína muscular em decorrência da deficiência de nutrientes (DU DOT et al., 2009). Os resultados obtidos resultados evidenciam comprometimento da

síntese protéica nesse local (visto que a quantidade total de RNA encontra-se diminuída). Isso porque a síntese protéica no músculo esquelético recebe influência da disponibilidade de nutrientes, principalmente de aminoácidos (ROGERO et al., 2006). No entanto, o retorno à dieta normoprotéica não só foi capaz de reverter esse quadro, como promoveu aumento significativo da concentração total de proteína, DNA e RNA em relação ao grupo controle. Esse comportamento estaria relacionado ao aumento síntese protéica decorrente do maior aporte de proteínas. A redução da concentração total de proteína, DNA e RNA hepáticos observada nos animais desnutridos também evidencia o comprometimento da síntese hepática em decorrência da dieta hipoprotéica. No entanto, após a renutrição, houve somente aumento da concentração de proteínas e RNA, indicando restabelecimento da síntese protéica. A concentração de DNA permaneceu reduzida, indicando que o comprometimento de sua produção não foi restabelecido.

5.2 Aspectos hematológicos

Uma vez que a desnutrição afeta preferencialmente tecidos com alta taxa de proliferação, o comprometimento da hemopoese nessas condições tem sido descrito por diversos estudos (BARON, 1997; BORELLI et al., 1995, 2007). Como conseqüência, indivíduos desnutridos apresentam tanto anemia (redução do número de hemácias, volume hematócrito e concentração de hemoglobina), como leucopenia (BACHOU et al., 2006; IDOHOU-DOSSOU et al., 2003), sendo o quadro hematológico um importante fator indicativo de desnutrição (BACHOU et al., 2006). A presença de anemia e leucopenia nos animais desnutridos de ambas as linhagens reflete o comprometimento do tecido hemopoético frente à desnutrição. Uma análise maior dos leucócitos presentes no sangue desses animais mostra que a leucopenia encontrada é, principalmente, às custas de neutropenia e linfocitopenia. De modo geral, os resultados deste trabalho indicam comprometimento dos setores granulocítico, linfóide e eritróide, que pode decorrer não só da ausência de proteínas, como também de alterações nos fatores que controlam a

proliferação, a diferenciação e a liberação das células do compartimento central para o compartimento periférico, bem como dos fatores que regulam a saída destas células do compartimento periférico para o compartimento extravascular (no caso dos leucócitos) (BORELLI et al., 1995; VITURI et al., 2000). Com relação ao comportamento hematológico dos animais renutridos de ambas as linhagens, observou-se aumento significante do número de hemácias, da concentração de hemoglobina e do volume hematócrito, bem como do número de leucócitos, linfócitos e neutrófilos segmentados em relação aos animais desnutridos. Esses resultados indicam reversão das alterações hematológicas encontradas na desnutrição após retorno à ração normoprotéica. Os resultados obtidos para os animais do grupo renutrido estão de acordo com achados na literatura e indicam que o retorno à alimentação adequada tende a normalizar os parâmetros hematológicos (DEWAN et al., 2007; VÁSQUEZ-GARIBAY et al., 2002; WALRAND et al., 2000), sendo novamente o hemograma usado como indicativo do estado nutricional. Em relação ao número de reticulócitos não houve variação significativa entre os três grupos na linhagem Swiss Webster. Geralmente, aumento significativo do número de reticulócitos é visto somente em anemias hemolíticas ou por perdas agudas de sangue. No caso de anemias ferroprivas ou por deficiências nutricionais, o aumento do número de reticulócitos é discreto (LICHTMAN, 2010). Em relação aos índices hematimétricos, não foram observadas variações entre os três grupos, destacando-se ainda que a ausência de alterações nos valores de VCM e CHCM dos animais desnutridos indica a existência de uma anemia normocítica e normocrômica em decorrência da redução da quantidade de proteína na dieta (confirmada pela análise da série eritrocitária nas extensões sanguíneas).

Hipocelularidade da medula óssea, com evidências histológicas de alteração da matriz extracelular, tem sido observada em desnutrição protéica experimental. Quanto ao estroma medular, já se observou dilatação sinusoidal progressiva, ocupando grande parte do território medular. FAVERO (2003) e BORELLI et al. (2007) relataram modificações na matriz extracelular da medula óssea, especialmente na região subendosteal, que é o local de fixação das células tronco e por isso considerado como microambiente indutor da

hemopoese. Dessa forma, verificou-se redução significativa da celularidade da medula óssea dos animais desnutridos, sendo essa hipocelularidade revertida nos animais renutridos de ambas as linhagens. Contudo, esta restituição ocorreu de maneira anômala, perdendo-se a relação topográfica entre as diferentes linhagens. Adicionalmente, as células hemopoéticas apresentaram características morfológicas aberrantes, caracterizando um quadro histopatológico de displasia (XAVIER, 1999). No entanto, a proporção relativa de cada tipo celular foi mantida mesmo após o período de desnutrição, havendo apenas redução do seu número absoluto. Após o retorno à dieta normoprotéica, houve aumento do número absoluto e relativo de formas em anel, mesmo em relação aos animais controle, e normalização dos valores absolutos das demais linhagens, indicando que o restabelecimento da celularidade ocorreu de forma igual entre as linhagens, com o predomínio do setor granulocítico. Não foi observada alteração na relação grânulo/eritróide dos grupos experimentais. Com relação à celularidade do baço, houve redução significativa do número de células nos animais desnutridos na linhagem Swiss Webster, sendo que o retorno a uma dieta normoprotéica reverteu a hipocelularidade. Assim como na medula óssea, não houve variação entre a porcentagem das populações nos grupos experimentais, somente no seu número absoluto, sendo essa alteração revertida nos animais renutridos. As relações grânulo/eritróide e linfo/eritróide também não sofreram variação entre os grupos estudados. Por outro lado, em camundongos C57BL/6J, não foi observada alteração na celularidade do baço, indicando que o comprometimento desse órgão é dependente da linhagem. Os resultados obtidos mostram que a reversão da hipocelularidade encontrada na medula óssea e no baço após o período de renutrição, indica o restabelecimento da integridade do microambiente desses órgãos.

5.3 Aspectos imunológicos

A DPE é a principal causa de imunodeficiência no mundo (CHANDRA, 1991) e ambas formam um ciclo vicioso onde a presença de um facilmente favorece o desenvolvimento da outra (SCRIMSHAW, 2003). Essa associação leva ao comprometimento da imunidade celular e de processos como fagocitose e produção de citocinas (BISTRIAN, 2007). Entretanto, as bases celulares da imunossupressão em decorrência da desnutrição ainda não estão bem compreendidas (ANSTEAD et al., 2003). Um dos mecanismos pelos quais a DPE altera a resposta imune inata e adquirida é pelo comprometimento da hemopoese, alterando a produção de células do sistema imune. Assim, encontramos redução da celularidade do lavado peritonial de camundongos desnutridos de ambas as linhagens, com redução percentual e absoluta de mastócitos e redução absoluta de macrófagos e linfócitos, mostrando que um possível comprometimento da resposta imune poderia decorrer dessa hipocelularidade peritonial. No entanto, após o período de renutrição, houve normalização do número de células encontradas na cavidade peritonial, indicando que a persistência ou não de comprometimento da resposta imune em animais renutridos decorreria somente de alterações da funcionalidade destas células.

A imunidade inata se refere à defesa do indivíduo mediada por macrófagos, monócitos, neutrófilos e linfócitos NK, que reconhecem patógenos via receptores que se ligam a diversas porções microbianas, como LPS. Estudos descrevem alterações da resposta imune inata em decorrência da desnutrição, sendo relatadas a redução da capacidade de adesão e espraiamento, da produção de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio, e também da produção de citocinas por macrófagos (FOCK et al., 2007). No entanto, o impacto da desnutrição sobre essa parcela da resposta imune carece de estudos mais precisos (ANSTEAD et al., 2003).

Poucos estudos têm avaliado a capacidade de adesão e espraiamento de macrófagos frente a um estímulo antigênico em quadros de desnutrição. Em camundongos precocemente desmamados, há redução da capacidade de aderir e espraiar de macrófagos peritoniais,

sendo esse comprometimento revertido após suplementação com glutamina (ROGERO et al., 2008a). FOCK et al. (2007) descreve redução da capacidade de espraiamento de macrófagos estimulados com LPS, obtidos de camundongos submetidos à desnutrição protéica. No presente trabalho, a avaliação da capacidade de adesão e espraiamento de macrófagos de animais desnutridos frente ao estímulo com LPS mostrou comprometimento nos tempos avaliados (2 e 24 horas). Essas duas funções são importantes para que ocorra o reconhecimento e aderência ao patógeno, possibilitando a fagocitose (BORELLI et al, 1998; PRESTES-CARNEIRO et al., 2006). Assim, as alterações observadas acabam por comprometer as fases subseqüentes da resposta do macrófago frente a um estímulo antigênico. Após o período de renutrição, esses parâmetros permaneceram reduzidos no tempo de 2 horas, normalizando no tempo de 24 horas. Esse comportamento mostra recuperação tardia da capacidade de aderir e espraiar e, embora a recuperação total seja atingida, a demora nessa recuperação pode indicar uma resposta inadequada e comprometer processos de defesa contra patógenos.

Fagocitose é o processo pelo qual leucócitos e outras células englobam ligantes particulados cujo tamanho excede 1 µm (GREENBERG; GRINSTEIN, 2002). A fagocitose de patógenos está relacionada a duas funções imunes essenciais. Primeiro, ela desencadeia uma via de sinalização que visa à morte do patógeno, em parte por direcionar o microorganismo ingerido para os lisossomos (que são ricos em enzimas hidrolíticas), em parte por direcionar o complexo fagócito - oxidase para o fagolisossomo. Segundo, fagócitos denominados células apresentadoras de antígeno (como por exemplo, macrófagos e células dendríticas) utilizam a fagocitose para direcionar antígenos para os complexos MHC I e MHC II. Muitos receptores são responsáveis por desencadear os processos fagocíticos de leucócitos. Os principais envolvidos no reconhecimento e fagocitose de fungos por macrófagos são os receptores da porção Fc de anticorpos, receptores de complemento (CR1 e CR3) e receptor de manose (GREENBERG; GRINSTEIN, 2002). Opsonização de patógenos é um importante mecanismo usado pelo hospedeiro para aumentar a eficiência da fagocitose e pode ser conseguida pela fixação do complemento ou de anticorpos (GREENBERG; GRINSTEIN,

2002). Nesse caso, o reconhecimento do fungo se daria pelos receptores Fc ou de complemento. Uma vez que verificou-se alteração da capacidade de adesão e espraiamento de animais do grupo desnutrido, observou-se também comprometimento da capacidade de fagocitose de *Candida albicans* opsonizadas por macrófagos peritoniais do grupo desnutrido nos tempos de 30, 60 e 90 minutos. No tempo de 120 minutos, não houve diferença entre a porcentagem de fagocitose observada nos grupos experimentais. Uma vez que a fagocitose de *Candida albicans* não opsonizadas não diferiu entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados, sugere-se que a desnutrição não tenha comprometido o receptor de manose, que é o responsável pelo reconhecimento de fungos por macrófagos (PRESTES-CARNEIRO et al., 2006). No entanto, a DPE induz alterações na composição e na fluidez da membrana celular, com implicações na transdução de sinal e na função celular, incluindo permeabilidade e expressão de receptores de superfície (PRESTES-CARNEIRO et al., 2006). Uma vez que a interação entre macrófagos e partículas opsonizadas depende da expressão de receptores de complemento e da porção Fc de anticorpos na superfície celular, a desnutrição causaria a diminuição da expressão desses receptores em macrófagos, comprometendo a fagocitose de patógenos (CHANG et al., 1995). Após a recuperação nutricional, a normalização da fagocitose de *Candida albicans* opsonizadas nos tempos avaliados indica normalização do reconhecimento desse fungo pelo receptor de complemento. Os resultados obtidos neste estudo também mostram comprometimento da atividade fungicida em todos os tempos avaliados em animais do grupo desnutrido. A diminuição da capacidade fungicida em decorrência da desnutrição é relatada por diversos estudos (FOCK et al., 2007; PRESTES-CARNEIRO et al., 2006). Os mecanismos envolvidos nesse quadro não estão bem compreendidos, mas alguns estudos relatam alterações no sistema enzimático responsável pelo *burst* oxidativo, na enzima NADPH oxidase e na síntese de óxido nítrico, envolvidos na atividade fungicida de macrófagos (PRESTES-CARNEIRO et al., 2006). Também são relatadas alterações na síntese e secreção de proteases e hidrolases ácidas no vacúolo fagocítico (SILVA, 2000).

Estudos mostram que a deficiência de proteínas ou de nutrientes específicos como ácido ascórbico e glutamina levam à redução da produção de óxido nítrico (ANSTEAD et al, 2003) e de peróxido de hidrogênio (CHATTERJEE et al., 2008; ROGERO et al., 2008) Em nosso modelo, observou-se a redução da produção de óxido nítrico nos tempos de 24 (camundongos C57BL/6J) e 48 horas (camundongos Swiss Webster e C57BL/6J) e peróxido de hidrogênio por macrófagos de animais desnutridos após estímulo com LPS, sendo que após o período de renutrição, os animais do grupo renutrido apresentaram normalização da produção de óxido nítrico somente em 48 horas. Embora a recuperação tenha existido, o fato de ela ser tardia pode indicar resposta inadequada. Em relação à produção de peróxido de hidrogênio, os animais do grupo renutrido continuaram apresentando valores reduzidos, semelhantes aos apresentados pelos animais do grupo desnutrido. A persistência dessa alteração sugere um comprometimento permanente na via de produção de peróxido de hidrogênio, sendo que estudos anteriores mostram que mesmo após o retorno a uma dieta normoprotéica, o comprometimento da produção dessa espécie reativa de oxigênio permanece (CHAMBON et al., 2001).

Estudos sobre a produção de citocinas na DPE são limitados e apresentam resultados controversos (CORCOS et al, 2001), sendo relatada tanto a diminuição (ANSTEAD et al., 2003; NOVA et al., 2002; VAISMAN et al., 2004; WALRAND et al., 2000) quanto o aumento (AZEVEDO et al., 2005; DEWAN et al., 2009) da produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como redução da produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio. Neste trabalho, observamos um comportamento semelhante em ambas as linhagens. Tanto em camundongos Swiss Webster quanto em C57BL/6J, com exceção de IL-10, o grupo desnutrido apresentou produção reduzida das citocinas avaliadas (IL-1, IL-6 e TNF-α) após estímulo com LPS quando comparado com o grupo controle, mostrando que em nosso modelo de desnutrição, ocorre comprometimento da produção de citocinas pró-inflamatórias frente a um estímulo por animais que receberam ração hipoprotéica (FOCK et al., 2007). A redução do número de células no lavado peritonial após o período de desnutrição mostra que o comprometimento da resposta imune desses

animais decorre tanto da diminuição do número de células de defesa, como do comprometimento da funcionalidade dos macrófagos. Em relação a IL-10, o grupo desnutrido apresentou, já no estado basal, aumento significante da produção dessa citocina em relação ao grupo controle (como relatado anteriormente por FOCK et al., 2008), sendo que o estímulo com LPS não alterou de forma significante a produção de IL-10. Assim, é possível pensar que a produção basal de IL-10 pelos animais desnutridos atingiu seu máximo, sendo que o estímulo com LPS não possibilitou aumento além daquele já existente. Uma vez que IL-10 é considerada uma citocina regulatória por inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (BERLATO et al., 2002; THOMPSON-SNIPER et al., 1991), o aumento dessa citocina nos animais desnutridos pode ter sido o responsável pela diminuição da produção de IL-1, IL-6 e TNF-α observada nesses mesmos animais. Embora a literatura seja controversa, estudos mostram aumento da produção de IL-10 em decorrência da DPE (HILLYER et al, 2006; RODRÍGUEZ et al, 2005, 2007), o que seria responsável, pelo menos em parte, pela imunossupressão observada em indivíduos desnutridos. IL-10 é um potente inibidor da produção de citocinas pró-inflamatórias decorrente de estímulo com LPS *in vitro* através do bloqueio do fator de transcrição NFκB, que está envolvido na transcrição de genes que codificam para IL-1, IL-6 e TNF-α. No entanto, após a recuperação nutricional, observou-se um comportamento distinto de cada linhagem. Camundongos Swiss Webster do grupo renutrido mostraram normalização da produção de TNF-α a despeito da persistência do comprometimento da produção das demais citocinas pró-inflamatórias. Nesses camundongos, a produção de IL-10 permaneceu aumentada, podendo sugerir este como um fator responsável pela persistência no comprometimento da produção de IL-1 e IL-6. Por outro lado, em camundongos da linhagem C57BL/6J, o comprometimento da produção de TNF-α, IL-1 e IL-6 persistiu após o período de desnutrição, sendo observada normalização da produção de IL-10. Em ambas as linhagens houve persistência do comprometimento da produção de citocinas, indicando alteração nos mecanismos indutores de síntese. Porém, o comportamento distinto entre as linhagens indica a existência de perfis imunológicos diferentes, responsáveis por respostas distintas frente à recuperação nutricional.

Macrófagos desempenham papel central na resposta imune inata e adquirida, podendo ser ativados por uma série de estímulos, fazendo parte da resposta inicial do organismo e da apresentação de antígenos responsável pela ativação da resposta imune adquirida. O principal estímulo microbiano estudado é o LPS. O reconhecimento dessa molécula é feito pelo complexo presente na membrana de macrófagos formado por CD14, TLR4 e MD2 (MIYAKE, 2003). A ativação deste complexo desencadeia uma casca de sinalização que pode seguir dois caminhos: MyD88 dependente ou MyD88 independente (PALSSON-MCDERMOTT et al., 2004). A via MyD88 dependente é composta por proteínas como MyD88, TRAF-6 e IKKβ, e culmina com a fosforilação da proteína inibitória IκBα, resultando na sua ubiquitinação e degradação, com posterior liberação do fator de transcrição NFκB (PALSSON-MCDERMOTT et al., 2004). Uma vez livre no citoplasma, ocorre a translocação deste fator para o núcleo, onde se liga ao seu elemento responsivo no DNA, promovendo a expressão de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e óxido nítrico sintase indutível (CHAN et al., 1995).

As alterações na produção de citocinas observadas no grupo desnutrido e no grupo renutrido de camundongos C57BL/6J sugeriram comprometimento da via de sinalização ativada por LPS. Dessa forma, a avaliação inicial da expressão de CD14 e TLR4 por citometria de fluxo mostrou redução da população de macrófagos expressando ambos os receptores após estímulo com LPS em decorrência do consumo de uma dieta hipoprotéica, sendo que no caso de CD14, essa redução pode ser observada mesmo em macrófagos não estimulados. Uma vez que a indução à produção de citocinas ocorre após a interação do LPS com o complexo CD14 e TLR4/MD2, a redução da população expressando esses receptores poderia ser um dos fatores responsáveis pelo comprometimento da síntese de citocinas (FOCK, et al., 2007). O retorno à dieta normoprotéica reverteu essas alterações, visto que o grupo renutrido voltou a apresentar aumento significante da população de macrófagos expressando CD14 e TLR4. Esses resultados indicam que a persistência do comprometimento da produção de citocinas após o período de renutrição não seria

decorrente de uma menor porcentagem de população de macrófagos expressando CD14 e TLR4.

A investigação da ativação do fator de transcrição NFκB evidenciou comprometimento desta no grupo desnutrido após estímulo com LPS. Essa alteração persistiu no grupo renutrido a despeito do consumo de uma dieta normoprotéica. A avaliação da fosforilação de NFκB mostrou redução deste parâmetro no grupo desnutrido. Esse resultado está em concordância com as observações do ensaio de ativação com NFκB, demostrando que o consumo de uma dieta hipoprotéica compromete a ativação adequada deste fator (FOCK et al., 2010). No entanto, após a renutrição, os animais voltaram a apresentar aumento da fosforilação de NFκB após estímulo com LPS. Embora a translocação de NFκB para o núcleo seja fundamental para sua ação, sozinha ela não é suficiente para ativar a transcrição de genes. Algumas proteínas da família do NFκB, particularmente a subunidade p65, sofrem fosforilação pós-translocacional, participando desse processo várias quinases como PKA, PKC e IKK (AKIRA et al., 2004). Dessa forma, o aumento da fosforilação de NFκB, associado à reduzida capacidade de ligação deste fator aos seus elementos responsivos no DNA de animais renutridos sugerem que, embora esteja havendo a translocação de NFκB para o núcleo, sua ligação ao DNA está comprometida. Os achados relativos ao fator NFκB tornaram necessária a investigação da via de sinalização ativada por LPS. Como resultado, observou-se diminuição das proteínas MyD88, TRAF-6 e IKKβ e conseqüente aumento de IκBα em macrófagos estimulados por LPS em animais desnutridos. A redução das três primeiras proteínas indica comprometimento da ativação da cascata de sinalização, sendo que a redução de TRAF-6 nessas condições já foi relatada por FOCK et al. (2010). Esse comprometimento foi confirmado pelo aumento de IκBα e redução de sua fosforilação, indicando que esta proteína não está sendo ubiquitinada nem degradada, impedindo a translocação de NFκB para o núcleo. Os animais do grupo renutrido apresentaram aumento de MyD88 e IKKβ, e redução de IκBα com aumento de sua forma fosforilada, normalizando a expressão destas proteínas. No entanto, a proteína TRAF-6 permaneceu reduzida, tornando-se o fator limitante para a progressão adequada da cascata

de sinalização e sendo um dos fatores responsáveis pelo comprometimento na ativação do NFκB. A expressão de NFκB total não diferiu entre os grupos experimentais, assim como a relação IκBa fosforilado/ IκBa total. No entanto, houve redução da relação NFκB fosforilado/NFκB totalno grupo desnutrido, comprovando a redução da taxa de fosforilação observada anteriormente. Esse quadro foi revertido no grupo renutrido mostrando que, embora a fosforilação deste fator tenha normalizado, não foi suficiente para garantir a normalização de sua capacidade de ativação. Esses resultados mostram comprometimento na via de sinalização ativada por LPS mesmo após a recuperação nutricional, sendo esse um dos mecanismos responsáveis pela persistência no comprometimento da produção de citocinas.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho, animais alimentados com ração hipoprotéica apresentaram quadro de desnutrição decorrente da redução de proteínas ingeridas. A redução de hormônios como insulina e IGF-1 e o aumento de corticosterona levou a um estado de estresse fisiológico e aumento do catabolismo que culminou com a redução da síntese protéica hepática e muscular, acarretando na perda de peso observada. As alterações no metabolismo da glicose e da insulina levaram ao aumento da sensibilidade a esse hormônio com aumento da tolerância à glicose. Embora o retorno ao metabolismo normal seja relatado após a terapia nutricional de indivíduos desnutridos, neste modelo observou-se persistência da sensibilidade aumentada à insulina a despeito da normalização das demais alterações.

Uma vez instalado o quadro de desnutrição, observou-se comprometimento da hemopoese nos animais do grupo desnutrido de ambas as linhagens de camundongos, evidenciada pela hipocelularidade medular e esplênica acarretando em pancitopenia periférica. O processo de recuperação nutricional reverteu o comprometimento da hemopoese, normalizando os parâmetros hematológicos, tanto centrais como periféricos, nos animais renutridos.

O quadro de desnutrição levou ao comprometimento da imunidade inata dos animais desnutridos. A redução de células de defesa foi evidenciada pela hipocelularidade do lavado peritonial de animais desnutridos de ambas as linhagens, principalmente às custas da diminuição do número de macrófagos. Aliado à redução de células imunocompetentes, verificou-se comprometimento na produção de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, e aumento da produção de IL-10 em decorrência da desnutrição. A persistência de alterações na produção de óxido nítrico e de algumas citocinas a despeito da normalização da celularidade do lavado peritonial em animais renutridos, decorreu de alterações na proteína TRAF-6 e consequente comprometimento da ativação do fator de transcrição NFκB nesses animais. O comprometimento da capacidade de adesão e espraiamento em decorrência do consumo de uma dieta hipoprotéica refletiu em menor fagocitose e atividade fungicida em

animais desnutridos, sendo que a recuperação nutricional normalizou totalmente somente a capacidade de fagocitose. Da mesma forma, a produção de peróxido de hidrogênio manteve-se alterada em animais renutridos. Assim, no modelo estudado, a melhora do estado nutricional decorrente do retorno à dieta normoprotéica foi suficiente para normalizar a hemopoese, mas não para reverter as alterações na imunidade inata decorrentes da desnutrição.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, AK; LICHTMAN, AH; POBER, JS. Cellular and molecular immunology. 2ed, Saunders, 239-60, 2000.

ABBOUD SL; BETHEL, CR; ARON, DC. Secretion of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding proteins by murine bone marrow stromal cells. J Clin Invest 1991; 88(2): 470-5.

AKIRA, S; TAKEDA, K. Toll-like receptor signaling. Nat Rev Immunol 2004; 499-511.

AKMAN, M; CEBECI, D; OKUR, V; ANGIN, H; ABALI, O; AKMAN, AC. The effects of iron deficiency on infant´s developmental test performance. Acta Paediatr 2004; 93: 1391-6.

AMMANN, P; BOURRIN, S; BONJOUR, JP; MEYER, JM; RIZZOLI, R. Protein undernutrition-induced bone loss is associated with decreased IGF-I levels and estrogen deficiency. J Bone Miner Res 2000; 15(4): 683-90.

ANDREOLI, MF; SCALERANDI, MV; BOREL, IM; BERNAL, CA. Effects of CLA at different dietary fat levels on the nutritional status of rats during protein repletion. Nutrition 2007; 23: 827-35.

ANSTEAD, GM; CHANDRASEKAR, B; ZHANG, Q; MELBY, PC. Multinutrient undernutrition dysregulates the resident macrophage proinflammatory cytokine network, nuclear factor-kB activation, and nitric oxide production. J Leukoc Biol 2003; 74: 982-91.

ASCHKENASY, A. Effect of a protein-free diet on lymph node and spleen cell response in vivo to blastogenic stimulantes. Nature 1975; 254: 63-5.

ATHENS, JW; RAAB, SO; HAAB, OP; MAUER, AM; ASHENBRUCKER, H; CARTWRIGHT, GE; WINTROBE, MM. Leukokinetic studies III. The distribution of granulocytes in the blood of normal subjects. J Clin Invest 1961; 40: 159-64.

AZEVEDO, ZMA; LUZ, RA; VICTAL, SH; KURDIAN, B. Increased production of tumor necrosis factor – α in whole blood cultures from children with primary malnutrition. Braz J Med Biol Res 2005; 38:171-83.

BACHOU, H; TUMWINE, JK; MWADIME, RKN; TYLLESKÄR, T. Risk factors in hospital deaths in severely malnourished children in Kampala, Uganda. BMC Pediatics 2006; 6(7): 1-9.

BANDYOPADHYAY, BC; PODDAR, MK. Dietary protein-induced change in mammalian corticosterone status (index of immune response) during aging. Mech Aging Develop 1998; 103: 57-68.

BARBER, AE; JONES, WG; MINEI, JP; FAHEY, TJ; MOLDAWER, LL; RAYBURN, JL; FISHER, E; KEOGH, CV, SHIRES, GT; LOWRY, SF. Glutamine on fibre supplement of a defined formula diet: impact on bacterial translocation, tissue composition and immune response to endotoxin a. J. Parenter. Enteral Nutr 1990; 14: 335-43.

BARON, RB, Desnutrição protéico-calórica. In: Bennet, JC & Plum, F, Cecil. Tratado de medicina interna. 20ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan; 1997 p.1273-77.

BECKER, DJ; PIMSTONE, BL; HANSEN, JDL; HENDRICKS, S. Insulin secretion in protein-calorie malnutrition. Diabetes 1971; 20: 542-51.

BEISEL, WR. Impact of infection on nutritional status: definition of the problem and objectives of workshop. Am J Clin Nutr 1977; 20: 1206-10.

BELL, RG; HAZELL, LA; SHERIDAN, JW. The influence of dietary protein deficiency on hemopoietic cells in the mouse. Cell Tissue Kinet 1976; 9: 305-12.

BERGMEYER, HU. Methoden der Enzymatischen Analysen, Verlag Chemie, Weinheim, 1974.

BERLATO, C; CASSATELLA, MA; KINJYO, I; GATTO, L; YOSHIMURA, A; BAZZONI, F. Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolyssacharide-induced macrophage activation. J Immunol 2002; 168: 6404-11.

BIESWAL, F; AHN, MT; REUSENS, B; HOLVOET, P; RAES, M; REES, WD; REMACLE, C. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. Obesity 2006; 14(8): 1330-43.

BISTRIAN, BR; BLACKBURN, GL; HALLOWELL, E; HEDLLE, R. Protein status of general surgical patients. JAMA 1974; 230: 858-60.

BISTRIAN, B. Systemic response to inflammation. Nutr Rev 2007; 65(12) p.2: S170-2.

BOELENS, PG; NIJVELDT, RJ; HOUDJIK, APJ; MEIJER, S; LEEUWEN, PAM. Glutamine alimentation in catabolic state. J Nutr 2001; 131: 2569S-77S.

BONORA, E; MOGHETTI, P; ZANCANARO, C; CIGOLINI, M; QUERENA, M; CACCIATONI, V; CORGNATI, A; MUGGEO, M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparision of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. J Clin Endocrinol Metab 1989; 68: 374-8.

BORELLI, P; MARIANO, M; BOROJEVIC, R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and cell mobilization into inflammatory reactions in mice. Nutr Res 1995; 15(10): 1477-85.

BORELLI, P; SOUZA, IP; BOROJEVIC, R; DAGLI, ML; KANG, HC. Protein malnutrition: some aspects of the in vitro adhesion of peritoneal mouse macrophages. Ann Nutr Metab 1998; 42 (6): 367-73.

BORELLI, P; FOCK, RA; BLATT, S; PEREIRA, J; BEUTLER, B; TSUJITA, M; SOUZA, AC; XAVIER, JG. Effect of protein deprivation on erytropoiesis. Br J Nutr 2007; 97(2): 307-14.

BORELLI, P; NARDINELLI, L. Protein-calorie malnutrition: a decreased in the macrophage`s respiratory burst capacity. Rev Br Cien Farm, 2001.

BORSATTO, E; BORELLI, P. Effects of protein deficiency on proliferation and maturation of granulocyte-macrophage precursor cells. Nutr Res (New York), 1999.

BOURRIN, S; AMMANN, P; BONJOUR, JP; RIZZOLI, R. Dietary protein restriction lowers plasma insulin-like growth factor 1 (IGF-1), impairs cortical bone formation, and induces osteoblastic resistance to IGF-1 in adult female rats. Endocrinol 2000; 141(9): 3149-55.

BOZA, JJ; MOËNNOZ, D; VUICHOUD, J; JARRET, AR; GAUDARD-DE-WECK, D; FRITSCHÉ, R; DONNET, A; SCHIFFRIN, EJ; PERRUISSEAU, G; BALLÈVRE, O. Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. J Nutr 1999; 129: 1340-6.

BRECHER, G. New methylene blue as a reticulocyte stain. Am J Patol 1949; 19.

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

BRIET, F; JEEJEEBHOY, KN. Effect of hypoenergetic feeding and refeeding on muscle and mononuclear cell activities mitochondrial complexes I-IV in enterally fed rats. Am J Clin Nutr 2001; 73(5): 975-83.

BRIET, F; TWOMEY, C; JEEJEEBHOY, KN. Effect of malnutrition and short-term refeeding on peripheral blood mononuclear cell mitochondrial complex I activity in humans. Am J Clin Nutr 2003; 77(5): 1304-11.

BROSTOFF, J; SCADDING, GK; MALE, D; ROITT, IM. Clinical immunology: nutrition and immunity. London; 1991: Gower Medical Publishing.

CANO, PG; AGUERO, G; PERDIGON, G. Adjuvants effects of *Lactobacillus casei* added to a renutrition diet in a malnourished mouse model. Biocell 2002; 26(1): 35-48.

CAREGARO, L; FAVARO, A; SANTONASTASO, P; ALBERINO, F; DI PASCOLI, L; NARDI, M; FAVARO, S; GATTA, A. Insulin-like growth factor I (IGF-I), a nutritional marker in patients with eating disorders. Clin Nutr 2001; 20(3): 251-57.

CHAMBON-SAVANOVITCH, C; FELGINES, C; WALRAND, S; RAUL, F. A pancreatic extract-enriched diet improves the nutritional status of aged rats. Nutr Aging 2001; 131:813-9.

CHAMSON-REIG, A; THYSSEN, SM; HILL, DJ; ARANY, E. Exposure of the pregnant rat to low protein diet causes impaired glucose homeostasis in the young adult offspring by different mechanisms in males and females. Exp Biol Med 2009; 234: 1425-36.

CHAN, JL; MANTZOROS, CS. Role of leptin in energy-deprivation states: normal human physiology and clinical implications for hypothalamic amenorrhea and anorexia nervosa. Lancet 2005; 366: 74-87.

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

CHANG, FY; SHAIO, MF. Decreased cell-mediated immunity in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract 1995; 28: 137-46.

CHATTERJEE, M; SALUJA, R; KUMAR, V; JYOTI, A; JAIN, GK; BARTHWAL, MK; DIKSHIT, M. Ascorbate sustains neutrophil NOS expression, catalyses and oxidative burst. Free Rad Biol Med 2008; 1084-93.

CHEVALIER, P; SEVILLA, R; ZALLES, L; SEJAS, E; BELMONTE, G; PARENT, G; JAMBON, B. Immuno-nutritional recovery of children with severe malnutrition. Sante 1996; 6(4): 201-8.

CHEVALIER, P; SEVILLA, R; SEJAS, E; ZALLES, S; BELMONTE, G; PARENT, G. Immune recovery of malnourished children takes longer than nutritional recovery: implications for treatment and discharge. J Trop Pediatr 1998; 44: 304-8.

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

CORCOS, M; GUILBAUD, O; CHAOUAT, G; CAYOL, V; SPERANZA, M; CHAMBRY, J. Cytokines and anorexia nervosa. Psychosom Med 2001; 63: 502-4.

COTRAN, RS; KUMAR, V; ROBBINS, SL. Environmental and nutrition disease. In: Pathologic basis of the disease. 5ed. WB Saunders; 2000. p.403-57.

COWLING, GJ; DEXTER, TM. Apoptosis in the haemopoietic system. In: Dexter, TM; Raff, MC; Wyllie, AH. The role of apoptosis in development, tissue homeostasis and malignancy. London: Chapman & hall; 1995. p.21-7.

CRACE, CJ; SWEENE, I; MILNER, RD. Long-term effects on glucose tolerance and insulin secretory response to glucose following a limited period of severe protein or energy malnutrition in young rats. Ups J Med Sci 1991; 96(3): 177-83.

CUNHA, WDS; FRIEDLER, G; VAISBERG, M; EGAMI, ML; COSTA ROSA, LFBP. Immunossupression in undernourished rats: the effect of glutamine supplementation. Clin Nutr 2003; 22(5): 453-7.

DAS, BK; RAMESH, J; AGARWAL, JK; MISHRA, OP; BHATT, RP. Blood sugar and serum insulin response in protein-energy malnutrition. J Trop Pediatr 1998; 44: 139-41. (a)

DAS, BK; RAMESH, J; AGARWAL, JK; MISHRA, OP; BHATT, RP. Blood glucose and serum insulin response in protein-energy malnutrition following nutritional rehabilitation. J Trop Pediatr 1998; 44: 230-1. (b)

DE ANGELIS, RC. Desnutrição calórico-protéica (Má nutrição calórico-protéica). In: Fisiologia da nutrição. 3ed. São Paulo: Nobel; 1986; p.38-56.

DE GROOT, LJ. Endocrine responses to starvation, malnutrition and illness. In: Endocrinology. 3ed. 1995.

DEO, MG; BIJLANI, V; RAMALINGASWAMI, V. Nutrition and cellular growth and differentiation. In: Growth and development of the brain. Raven Press, Hewlett; 1975. p.1-16.

DEWAN, P; KAUR, I; CHATTOPADHYA, D; FARIDI, MMA; AGARWAL, KN. A pilot study on the effects of curd (dahi) & leaf protein concentrate in children with protein energy malnutrition (PEM). Indian J Med Res 2007; 126: 199-203.

DEWAN, P; FARIDI, MMA; AGARWAL, KN. Cytokine response to dietary rehabilitation with curd (Indian dahi) & leaf protein concentrate in malnourished children. Ind J Med Res 2009; 130: 31-6.

DINLEYICE, EC; KILIC, Z; BUYUKKARAGOZ, B; UCAR, B; ALATAS, O; AYDOGDU, SD; DOGRUEL, N. Serum IGF-1, IGFBP-3 and growth hormone levels in children with congenital heart disease: relationship with nutritional status, cyanosis and left ventricular functions. Neuro Endocrinol Lett 2007; 28(3): 279-83.

DOUMAS, BT; WATSON, WA; BIGGS, HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green. Clin Chim Acta 1971; 31(1): 87-96.

DU, F; HIGGINBOTHAN, A; WHITE, BD. Food intake, energy balanceand serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. J Nutr 2000; 130: 514-521.

DU DOT, TJ; ROSEN, DAS; RICHMOND, JP; KITAYSKY, AS; ZINN, AS; TRITES, AW. Changes in glucocorticoids, IGF-I and thyroid hormones as indicators of nutritional stress and subsequent refeeding in Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). Comp Biochem Phys 2009; 152:524-34.

EAVES, CJ; CASHMAN, JD; EAVES, AC. Methodology of long-term culture of human hematopoietic cells. J Tissue Culture Methods 1991; 13: 56-62.

ELIZABETH, KE. Cytokine response in malnutrition. Indian J Med Res 2009; 130:12-3.

EL-SAYED, HL; NASSAR, NF; HABIB, NM; ELMASRY, AO; GOMAA, SM. Structural and functional affection of the heart in protein energy malnutrition patients on admission and after nutritional recovery. Eur J Clin Nutr 2006; 60: 502-10.

FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2001. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/foodsecurity/files/prevalenceundernourishement_en.xls

FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009. More people than ever are victims of hunger. Disponível em http://www.fao.org/news/story/en/item/20568/icode.

FAVERO, M.E. Avaliação imuno-histoquímica e ultra-estrutural da matriz extracelular da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2003.

FERREIRA, F; BARBOSA, HC; STOPPIGLIA, LF; DELGHINGARO-AUGUSTO, V; PEREIRA, EA; BOSCHERO, AC; CARNEIRO, EM. Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low protein diet is associated with a reduced PKAalpha expression. J Nutr 2004; 134(1): 63-7.

FILIPUTTI, E; FERREIRA, F; SOUZA, KL; STOPPIGLIA, LF; ARANTES, VC; BOSCHERO, AC; CARNEIRO, EM. Impaired insulin secretion and decreased expression of the nutritionally responsive ribossomal kinase protein S6K-1 in pancreatic islets from malnourished rats. Life Sci 2008; 82(9-10): 542-8.

FOCK, RA; VINOLO, MAR; ROCHA, VMS; ROCHA, LCS; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition decreases 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 2007; 40: 105-14.

FOCK, RA; VINOLO, MAR; CRISMA, AR; NAKAJIMA, K; ROGERO, MM; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition modifies the production of Interleukin-10 in response to lipopolyssacharide (LPS) in a murine model. J Nutr Sci Vitaminol 2008; 54; 371-77.

FOCK, RA; ROGERO, MM; VINOLO, MAR; CURI, R; BORGES, MA; BORELLI, P. Effects of protein-energy malnutrition on NF-kappaB signaling in murine peritoneal macrophages. Inflammation 2010; 33(2): 101-9.

FRAULOB, JC; OGG-DIAMANTINO, R; FERNANDES-SANTOS, C; AGUILA, MB; MANDARINDE-LACERDA, CA. A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in C57BL/6J mice fed a high fat diet. J Clin Biiochem Nutr 2010; 46: 212-23.

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

FUJIHARA, M; MUROI, M; TANAMOTO, KI; SUZUKI, T; AZUMA, H; IKEDA, H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolyssacharide: roles of the receptor complex. Pharmacol Therap 2003; 100: 171-94.

FUNK, PE; KINCADE, PW; WITTE, PL. Native associations of early hematopoietic stem cell and stromal cells isolated in bone marrow cell aggregates. Blood 1994; 83(2): 361-9.

GARCIA, PB. Inflamação em camundongos submetidos à desnutrição protéica: análise da mobilização celular e da hematopoese [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 1992.

GEFFNER, M. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1 on T- and B-lymphocytes and immune function. Acta Paediatr Suppl 1997; 423: 76-9.

GEHRING, N; IMOBERDORF, R; WEGMANN, M; RUHLIN, M; BALLMER, PE. Serumalbumin – a qualified parameter to determine the nutritional status? Swiss Med Wkly 2006; 136: 664-9.

GIANOTTI, L; LANFRANCO, F; RAMUNNI, J; DESTEFANIS, S; GHIGO, E; ARVAT, E. GH/IGF-1 axis in anorexia nervosa. Eat Weight Disord 2002; 7(2): 94-105.

GONZÁLEZ-BARRANCO, J; RÍOS-TORRES, JM; CASTILLO-MARTÍNEZ, L; LÓPEZ-ALVARENGA, JC; AGUILAR-SALINAS, CA; BOUCHARD, C; DEPRÈS, JP; TREMBLAY, A. Effect of malnutrition during the first year of life on adult plasma insulin and glucose tolerance. Metabolism 2003; 52(8): 1005-11.

GORNAL, AG; BARDAWILL, CJ; DAVID, MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reactions. J Biol Chem 1949; 177: 751-66.

GRACE, CJ; SWENNE, I; KOHN, PG; STRAIN, AJ; MILNER, RD. Protein-energy malnutrition induces changes in insulin sensitivity. Diabete Metab 1990; 16(6): 484-91.

GREENBERG, S; GRINSTEIN, S. Phagocytosis and innate immunity. Curr Op Immunol 2002; 14; 136-45.

GRIESS, P Ber Deutsch Chem Ges 1879; 12: 426–8.

GRIMBLE, KF. Cytokines: their relevance to nutrition. Eur J Clin Nutr 1989; 43: 14564-8.

GROSS, RL; NEWBERNE, MP. Role of nutrition in immunologic function. Physiol Rev 1980; 60: 188-202.

HALES, CN; OZANNE, SE; CROWTHER, NJ. Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenese. Biochem Soc Trans 1996; 24: 341-50.

HAMMARQVIST, F; ANDERSSON, K; LUO, JL; WERNERMAN, J. Free amino acid and glutathione concentrations in muscle during short-term starvation and refeeding. Clin Nutr 2005; 24: 236-43.

HEEMSKERK, VH; DAEMEN, MA; BUURMAN, WA. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and growth hormone (GH) in immunity and inflammation. Cytokine Growth Factor Ver 1999; 10(1): 5-14.

HERSCOWITZ, HB; HOLDEN, HT; BELANTL, JA; GHAFFAR, A. Manual of macrophage methodology. M. Dekker, 1981, p.531.

HILLYER, L; DAO, B; NIEMIEC, P; LEE, S; DOIDGE, M; BEMBEN, I; NEYESTANI, T; WOODWARD, B. Elevated bioactivity of the tolerogenic cytokines, interleukin-10 and transforming growth factor – β, in the blood of acutely malnourished weanling mice. Exp Biol Med 2006; 231: 1439-47.

HOLTKAMP, K; BÜREN, K; PONATH, G; EIFF, C. Serum levels of S100B are decreased in cronic starvation and normalize with weight gain. J Neur Transm 2008; 115: 937-40.

HORNICK, JJ; VAN ENAEEME, C; GERARD, O; DUFRASNE, I; ISTASSE, L. Mechanisms of reduced and compensatory growth. Domest Anim Endocrinol 2000; 19: 121-32.

HUANG, LZ; FRAKER, PJ. Chronical consumption of a moderately low protein diet does not alter hematopoietic processes in young adult mices. J Nutr 2003; 133: 1403-8.

IDOHOU-DOSSOU, N; WADE, S; GUIRO, AT; SARR, CS; DIAHAM, B; CISSÉ, D. Nutritional status of preschool Senegalese children: long-term effects of early severe malnutrition. Br J Nutr 2003; 90: 1123-32.

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

ISANAKA, S; VILLAMOR, E; SHEPHERD, S; GRAIS, RS. Assessing the impact of the introduction of the World Health Organization Growth Standards and weight-for-height z-score criterion on the response to treatment of severe acute malnutrition in children: secondary data analysis. Pediatrics 2009; 123: 54-9.

ISUFI, I; SEETHARAM, M; OPALINSKA, J; PAHANISH, P; VERMA, A. Transforming growth factor-β signaling in normal and malignant hematopoiesis. J Interf. Cytok. Res. 2007; 27: 543-52.

JAHOOR, F; BADALOO, A; REID, M; FORRESTER, T. Protein metabolism in severe childhood malnutrition. Ann Trop Pediatr 2008; 28:87-101.

JENSEN, GL; BISTRIAN, B; ROUBENOFF, R; HEIMBURGER, DC. Malnutrition syndromes: a conundrum vs continuum. JPEN 2009; 33: 710-6.

KABURAGI, T; YAMANO, T; FUKUSHIMA, Y; YOSHINO, H; MITO, N; SATO, K. Effect of *Lactobacillus johnsonii* La1 on immune function and serum albumin in aged and malnourished aged mice. Nutrition 2007; 23: 342-50.

KEUSCH, GT; FARTHLING, MJG. Nutrition and infection. Ann Rev Nutr 1986; 6: 131-54.

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

KILIC, M; TASKIN, E; USTUNDAG, B; AYGUN, AD. The evaluation of serum leptin level and other hormonal parameters in children with severe malnutrition. Clin Biochem 2004; 37: 382-7.

KLASING, GG. Nutritional aspects of leukocytic cytokines. J Nutrition 1988; 118: 1436-45.

KOJIMA, K; OGAWA, A; NAKAMURA, R; KASAI, M. Effect of dietary medium-chain triacylglycerol on serum albumin and nitrogen balance in malnourished rats. J Clin Biochem Nutr 2008; 42: 45-9.

KONG, S; HALL, JC; COOPER, D; McCAULEY, RD. Starvation alters the activity and mRNA level of glutamine and glutamine synthetase in the rat intestine. J Nutr Biochem 2000; 11: 393-400.

KOPPLE, JD. Effect of nutrition of morbidity and mortality in maintenance dialysis patients. Am J Kidney Dis 1994; 24: 1002-9.

LAMBERT, M; HUBERT, C; DEPRESSEUX, G; VANDE-BERG, B; THISSEN, JP; NAGANT-DE-DEUXCHAISNES, C. Hematological changes in anorexia nervosa are correlated with total body fat mass depletion. Int J Eat Disord 1997; 21: 329-34.

LARON, Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. Mol Pathol 2001; 54(5): 311-6.

LEMISCHKA, IR; MOORE, KA. Interactive niches. Nature 2003; 425: 778-9.

LEE, MT; WARREN, MK. CSF-1 induced resistance to viral infection in murine macrophages. J Immunol 1987; 138(9): 3019-22.

LICHTMAN, MA; KIPPS, TJ; SELIGSOHN, U; KAUSHANSKY, K; PRCHAL, JT. Williams Hematology 8ed. McGraw-Hill Company, 2010.

LING, PR; BISTRIAN, BR. Comparision of the effects of food versus protein restriction on selected nutritional and inflammatory markers in rats. Metab Clin Experim 2009; 58: 835-42.

LOWRY, OH; ROSBROUGHT, NJ; FARR, AL; RANDALL, RJ. Protein measurementwith the folin-phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193 (1): 265-75.

LUND, P. L-glutamine and L-glutamate: UV-method with glutaminase and glutamate dehydrogenase. Methods of Enzymatic Analysis, Weinheim, 1986.

MAITER, D; FLIESEN, T; UNDERWOOD, LE; MAES, M; GERARD, G; DAVENPORT, ML; KETELSLEGERS, JM. Dietary protein restriction decreases insulin-like growth factor I independent of insulin and liver growth hormone binding. Endocrinol 1989; 124(5): 2604-11.

MALEFYT, RW; ABRAMS, J; BENNET, B; FIGDOR, CG; VRIES, GE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med 1991; 174: 1209-20.

MANARY, MJ; BROADHEAD, RL; YARASHESKI, KE. Whole-body protein kinetics in marasmus and kwashiorkor during acute infection. Am J Clin Nutr 1998; 67:1205-9.

MARGETTS, BM; THOMPSON, RL; ELIA, M; JACKSON, AA. Prevalence of risk of undernutrition is associated with poor health status in older people in the UK. Eur J Clin Nutr 2003; 57: 69-74.

MARTINS, PA; SAWAYA, AL. Evidence for impaired insulin production and higher sensitivity in stunted children living in slums. Br J Nutr 2006; 95: 996-1001.

MARTINS, VJB; MARTINS, PA; NEVES, J; SAWAYA, AL. Children recovery from malnutrition exhibit normal insulin production and sensitivity. Br J Nutr 2008; 1-6.

MAYANI, H; GUILBERT, LJ; JANOWSKA-WIECZOREK, A. Biology of the hematopoietic microenvironment. European J haematol 1984; 49: 310-6.

McKENNA, SL; COTTER, TG. Functional aspects of apoptosis in hematopoiesis and consequences of failure. Adv Cancer Res 1997; 71: 121-64.

MEHTA, BC. Approach to a patient with anemia. Indian J Med Sci 2004; 58(1):26-9.

MEIJERS, JMM; VAN BOKHORST-VAN DER SCHUEREN; SCHOLS, JMGA; SOETERS, PB; HALFENS, RJG. Defining malnutrition: mission or mission impossible? Nutrition 2010; 26: 432-40.

MERCER, LP; KELLEY, DS; HUMPHRIEE, LL; DUNN, JD. Manipulation of central nervoussystem histamineor histaminergic receptore (H1) affecte food intake in rats. J Nutr 1994; 124: 1029-36.

MEYER, JH. Interaction of dietary fiber and protein on food intake and body composition of growing rats. Am J Physiol 1958; 193: 488-94.

MIÑANA-SOLIS, ESCOBAR, C. Post-weaning protein malnutrition in the rat produces short and long term metabolic impairment, in contrast to earlier and later periods. Int J Biol. Sci 2008; 4: 422-32.

MINET, R; VILLIE, F; MARCOLLET, M; MEYNIAL-DENIS, D; CYNOBER, L. Measurement of glutamine synthetase activity in rat muscle by a colorimetric assay. Clin Chim Acta 1997; 268(1-2): 121-32.

MIYAKE, K. Innate recognition of lipopolyssacharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD2. Intern Immunopharmacol 2003;3:119-28

MIYAKE, K. Endotoxin recognition molecules, Toll like receptor 4 – MD – 2. Seminars immunol 2004; 16: 12-6.

MONK, JM; MAKINEN, K; SHRUM, B; WOODWARD, B. Blood corticosterone concentration reaches critical illness levels early during acute malnutrition in the weanling mouse. Exp Biol Med 2006; 231: 264-8.

MOUKADDEM, M; APFELBAUM, M; RIGAUD, D. Increase in diet-induced thermogenesis at the start of refeeding in severely malnourished anorexia nervosa patients. Am J Clin Nutr 1997; 66: 133-40.

MOURA, AS; CALDEIRA FILHO, JS; DE FREITAS MATHIAS, PC; DE SÁ, CC. Insulin secretion impairment and insulin sensitivity improvement in adult rats undernourished during early lactation. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 1997; 96(2): 179-92.

MUNRO, HN; FLECK, A. The determination of nucleic acids. Meth Biochem Anal 1966; 14: 113-76.

NAGATA, T; TOBITANI, W; KIRIIKE, N; IKETANI, T; YAMAGAMI, S. Capacity to produce cytokines during weight restoration in patients with anorexia nervosa. Psychosom Med 1999; 61: 371-7.

NIEMAN, DC; PEDERSEN, BK. Exercise and immune function. Sports Med 1999; 27: 73-80.

NOGUCHI, T. Protein nutrition and insulin-like growth factor system. Br J Nutr 2000; 84 (Suppl 2): S241-44.

NOVA, E; SAMARTÍN, S; GÓMEZ, S; MORANDÉ, G; MARCOS, A. The adaptative response of the immune system to the particular malnutrition of eating disorders. Eur J Clin Nutr 2002; 56: S34-7.

NOVA, E; LOPEZ-VIDRIERO, I; VARELA, P; TORO, O; CASAS, J; MARCOS, A. Indicators of nutritional status in restricting-type anorexia nervosa patients: a 1-year follow up study. Clin Nutr 2004; 23: 1353-9.

NOVA, E; LOPEZ-VIDRIERO, I; VARELA, P; CASAS, J; MARCOS, A. Evolution of serum biochemical indicators in anorexia nervosa patients: a 1-year-follow up study. J Hum Nutr Diet 2008; 21: 23-30.

OLIVEIRA, JED; MARCHINI, JS. Ciências Nutricionais. 1ed. Sarvier; 1998. p.41-70.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Tratamiento inicial. In: Tratamiento de la malnutrición grave: manual para médicos y otros profesionales sanitarios superiores. Ginebra; 1999.

ORTIZ, R; BETANCOURT, M. Cell proliferation in bone marrow cells of of severily malnourished animals. J Nutr Philadelphia 1984; 114: 472-6.

PACY, PJ; NAIR, KS. Failure of insulin infusion to stimulate fractional muscle protein synthesis in type I diabetic patients: anabolic effect of insulin and decreased proteolysis. Diabetes 1989; 38: 618-24.

PALACIO, A; LOPEZ, M; PEREZ-BRAVO, F; MONKEBERG, F; SCHLESINGER, L. Leptin levels are associated with immune response in malnourished infants. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87(7): 3040-6. (a)

PALACIO, AC; PÉREZ-BRAVO, F; SANTOS, JL; SCHLESINGER, L; MONCKEBERG, F. Leptin levels and IGF-Binding Proteins in malnourished children: effect of weight gain. Nutrition 2002; 18: 17-9. (b)

PALSSON-MCDERMOTT, EM; O'NEILL, LAJ. Signal transduction by lipopolyssacharide receptor Toll-like recptor-4. Immunol 2004; 113: 153-62.

PAPADIMITRIOU, JM; van BRUGGEN, I. The effects of malnutrition on peritoneal macrophages, Exp Mol Pathol 1988; 49(2): 161-70.

PETRY, CJ; DORLING, MW; PAWLAK, DB; OZANNE, SE; HALES, CN. Diabetes in old male offspring of rat's dams fed a reduced protein diet. Int J Exp Diabetes Res 2001; 2: 139-43.

PITHON-CURI, TC; DE MELO, MP; CURI, R. Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: a comparative study. Cell Biochem Funct 2004; 22(5): 321-6.

POWANDA, MC; BEISEL, WR. Metabolic effects of infection on protein and energy status. J Nutr 2003; 133: 322S-7S.

PRESTES-CARNEIRO, LE; LARAYA, RD; SILVA, PRC; MOLITERNO, RA; FELIPE, I; MATHIAS, PC. Long-term effect of early protein malnutrition on growth curve, hematological parameters and macrophage function in rats. J Nutr Sci Vitaminol 2006; 52: 414-20.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? Nutrition 2005; 21: 775-7.

RABINOVITCH, M; DESTEFANO, MJ. Macrophage spreading in vitro. Magnese and other metals as inducers or as co-factors for induced spreading. Exper cell Res 1973; 79: 423-30.

RAYMOND, NC; DYSKEN, M; BETTIN, K; ECKERT, ED; CROW, SJ; MARKUS, K. Cytokine production in patients with anorexia nervosa, bulimia nervosa and obesity. Int J Eat Disord 2000; 28: 293-302.

REEVES, PG; NIELSEN, FH; FAHEY, GC. 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-76A rodent diet. American Institute of Nutrition 1993: 1939-51.

REYNOLDS, JV; REDMOND, HP; UENO, N; STEIGMAN, C; ZIEGLER, MM; DALY, JM; JOHNSTON, RB JR. Impairment of macrophage activation and granuloma formation by protein deprivation in mice. Cell Immunol 1992; 139(2): 493-504.

ROBINSON, HMP; SEAKINS, A. Fasting pancreatic glucagon in Jamaican children during malnutrition and subsequent recovery. Pediatr Res 1982; 16: 1011-5.

RODRÍGUEZ, L; GONZÁLEZ, C; FLORES, L; JIMÉNEZ-ZAMUDIO, L; GRANEL, J; ORTIZ, R. Assessment by flow citometry of cytokine production in malnourished children. Clin Diag Lab Immunol 2005; 12: 502-7.

RODRÍGUEZ, L; GRANIEL, J; ORTIZ, R. Effect of leptin on activation and cytokine synthesis in peripheral blood lymphocytes of malnourished infected children. Clin Exp Immunol 2007; 148: 478-85.

ROGERO, MM; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre glutamina, atividade física e sistema imune. Rev Bras Ciên Farm 2000; 36(2): 201-12.

ROGERO, MM; TIRAPEGUI, J; PEDROSA, RG; CASTRO, IA; PIRES, ISSO; OLIVEIRA, AAM; SALGADO, MM; PINTO, AR; UEDA, M. Efeito da suplementação com L-alanil-L-glutamina sobre a resposta de hipersensibilidade do tipo tardio em ratos submetidos ao treinamento intenso. Rev Bras Ciên Farm 2002; 38(4): 487-97.

ROGERO, MM; TIRAPEGUI, J. Aspectos nutricionais sobre glutamina e exercício físico. Nutrire 2003; 25: 87-112.

ROGERO, MM; TIRAPEGUI, J; PEDROSA, RG; CASTRO, IA; PIRES, ISO. Plasma and tissue glutamine response to acute and chronic supplementation with L-glutamine and L-alanyl-L-glutamine in rats. Nutr Res 2004; 24: 261-70.

ROGERO, MM; TIRAPEGUI, J; PEDROSA, RG; DE CASTRO, IA; DE OLIVEIRA PIRES, IS. Effect of alanyl-glutamine supplementation on plasma and tissue glutamine concentrations in rats submitted to exhaustive exercise. Nutrition 2006; 22(5): 564-71.

ROGERO, MM; BORELLI, P; FOCK, RA; PIRES, ISSO; TIRAPEGUI, J. Glutamine in vitro supplementation partly reverses impaired macrophage function resulting from early weaning in mice. Nutr 2008; 24:589-98.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. Mem Inst Butantan 1947; 20: 315-328.

SAHOO, A; PATTANAIK, AK; GOSWAMI, TK. Immunobiochemical status of sheep exposed to periods of experimental protein deficit and realimentation. J Anim Sci 2009; 87(8): 2664-73.

SCHAIBLE, UE; KAUFMANN, SHE. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impact. 2007; 4(5): 806-10.

SCRIMSHAW, NS. Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection. J Nutr 2003; 133: 316S-21S.

SEGURA, A; PARDO, J; JARA, C; ZUGAZABEITIA, L; CARULLA, J; DE LÃS PENAS, R; GARCIA-CABRERA, E; LUZ AZUARA, M; CASADO, J; GÓMEZ-CANDELA, C. An epidemiological evaluation of the prevalence of malnutrition in Spanish patients with locally advanced or metastatic cancer. Clin Nutr 2005; 24(5): 801-14.
SILVA, OPP. Influência de carência protéica na resposta hematológica, na produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico e no sistema antioxidante enzimático de camundongos inoculados com BCG (Bacilo e Calmette-Guérin) São Paulo. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 126p, 2000.

SILVA, PMR; ZOPPI, CS; FILIPUTTI, E; SILVEIRA, LR; QUESADA, I; BOSCHERO, AC; CARNEIRO, EM. Preliminary report: leucine supplementation enhances glutamate dehydrogenase expression and restores glucose-induced insulin secretion in protein-malnourished rats. Metab Clin Experimental 2010; 59: 911-3.

SIMMEN, FA; BADINGA, L; GREEN, ML; KWAK, I; SONG, S; SIMMEN, RC. The porcine insulin-like growth factor system: at the interface of nutrition, growth and reproduction. J Nutr 1998; 128(2 Suppl): 315S-20S.

SMITH, WJ; UNDERWOOD, LE; CLEMMONS, DR. Effects of caloric or protein restriction on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in children and adults. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80(2): 443-9.

SOLIMAN, AT; HASSAN, AEH; ARED, KM. Serum insulin-like growth factor I and II concentrations and growth hormone and insulin responses to arginine infusion in children with protein-energy malnutrition before and after nutritional rehabilitation. Pediatr Res 1986; 20: 1122-9.

SOLIMAN, AT; ELZALABANY, MM; SALAMA, M; ANSARIm BM. Serum leptin concentrations during severe protein-energy malnutrition: correlation with growth parameters and endocrine function. Metab. 2000; 49(7): 819-25.

SOUZA, IP; KANG, HC; NARDINELLI, L; BORELLI, P. Desnutrição protéica: efeitos sobre a fagocitose e a atividade fungicida de macrófagos peritoniais. Rev Bras Ciên Farm, 2001.

SOUZA, CT; FREDERICO, MJS; LUZ, G; CINTRA, DE; ROPELLE, ER; PAULI, JR; VELLOSO, LA. Acute exercise reduces hepatic glucose production throught inhibition of the Foxo1/HNF4a pathway in insulin resistant mouse. J Physiol 2010; 588 (12): 2239-53.

STEIN, K; VAZQUEZ-GARIBAY, E; KRATSCH, J; ROMERO-VELARDE, E; JAHREIS, G. Influence of nutritional recovery on the leptin axis in severely malnourished children. Endocrinol Metab 2006; 91: 1021-6.

STINNET, JD. Nutrition and the immune response. CRC Press; 1983. p.150.

SWAILS, WS; SAMOUR, PQ; BABINEAUS TJ ; BISTRIAN, BR. A proposed revision of current ICD-9-CM malnutrition code definitions. J Am Diet Assoc 1996; 96: 370-3.

THISSEN, JP; KETELSLEGERS, JM; UNDERWOOD, LE. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. Endocr Rev 1994; 15(1): 80-101.

THOMPSON-SNIPER, LA; DHAR, V; BOND, M. Interleukin-10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitor. J Exp Med 1991; 173: 507.

TIJONG, HL; RIETVELD, T; WATTIMENA, JL; VAN DEN BERG, JW; KAHRIMAN, D; VAN DER STEEN, J; HOP, WC; SWART, R; FIEREN, MW. Peritoneal dialysis with solutions containing amino acids plus glucose promotes protein synthesis during oral feeding. Clin J Am Soc Nephrol 2007; 2: 74-80.

TIRAPEGUI, J. Effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on muscle and bone growth in experimental models. Int J Food Sci Nutr 1999; 50(4): 231-6.

TOVAR, AR; HALHALI, A; TORRES, N. Effect of nutritional rehabilitation of undernourished rats on serum insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding proteins. Rev Invest Clin 1999 51(2): 99-106.

VAISMAN, N; SCHATTNER, A; HAHN, T. Tumor necrosis factor production during starvation. Am J Med 1989; 87: 115.

VAISMAN, N; HAHN, T; KAROV, Y; SIGLER, E; BARAK, Y; BARAK, V. Changes in cytokine production and impaired hematopoiesis in patients with anorexia nervosa: the effect of refeeding. Cytokine 2004; 26: 255-61.

VAN BOKHORST-DE VAN DER SCHUEREN, MA. Nutritional support strategies for malnourished cancer patients. Eur J Onc Nurs 2005; 9(Suppl 2): S74-83.

VÁZQUEZ-GARIBAY, E; CAMPOLLO-RIVAS, O; ROMERO-VELARDE, E; MÉNDEZ-ESTRADA, C; GARCIA-IGLESIAS, T; ALVIZO-MORA, JG; VIZMANOS-LAMOTTE, B. Effect of renutrition on natural and cell-mediated immune response in infants with severe malnutrition. JPGN 2002; 34(3): 296-301.

VÁSQUEZ-GARIBAY, E; STEIN, K; KRATZSCH, J; ROMERO-VELARDE, E; JAHREIS, G. Effect of nucleotide intake and nutritional recovery on insulin-like growth factor I and other hormonal biomarkers in severely malnourished children. Br J Nutr 2006; 96: 683-90.

VINCENT, JL; DUBOIS, MJ; NAVICKIS, RJ; WILKES, MM. Hypoalbuminemia in acute illness: is there rationale for intervention? A meta-analysis of cohort studies and controlled trials. Ann Surg 2003; 237: 319-34.

VISVANATHAN, R. Under-nutrition in older people: a serious and growing global problem! J Postgrad Med 2003; 49: 352-60.

VICTORIA, JW; HERNANDEZ, VQ. Efecto del estado nutricional de los pacientes sometidos a cirurgia electiva. Rev Gastroenterol Mex 1990; 55: 207- 10.

VITURI, CL; BORELLI, P; ALVAREZ-SILVA, M; TRENTIN, AZ. Alterations of the bone marrow in extracelular matrix in undernourished mice. Braz J Med Biol Res 2000; 33: 889-95.

WAITZBERG, DL; PLOPPER, C; TERRA, RM. Postoperative total parenteral nutrition. World J Surg 1999; 23: 560-4.

WALRAND, S; MOREAU, K; CALDEFIE, F; TRIDON, A; CHASSAGNE, J; PORTEFAIX, G; CYNOBER, L; BEAUFRÈRE, B; VASSON, MP; BOIRIE, Y. Specific and nonspecific

immune responses to fasting and refeeding differ in healthy young adult and eldery persons. Am J Clin Nutr 2000; 74: 670-8.

WALSH, NP; BLANNIN, AK; ROBSON, PJ; GLEESON, M. Glutamine, exercise and immune fuction: links and possible mechanisms. Sports Med 1998; 26: 177-91.

WANG, C; AMATO, D; FERNANDES, B. Gelatinous transformation of bone marrow from a starch-free diet. Am J Hematol 2001; 68: 58-9.

WATERLOW, JC; ALLEYNE, GAO. Protein malnutrition in children: advances in knowledge in the last ten years. Adv Protein Chem 1971; 25: 117.

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

WEBSTER, AJF. Energy partitioning, tissue growth and appetite control. Proc Nutr Soc 1993; 52: 69-76.

WEINKOVE, D; WEINKOVE, EA; PIMSTONE, BL. Glucose tolerance and insulin release in malnourished rats. Clin Sci Mol Med 1976; 50: 153-63.

WEISSTAUB, SG; ARAYA, M. Nutritional recovery. An unresolved challenge. Rev Med Chil 2003; 131(2): 213-9.

WELLS, SM; KEW, S; YAQOOB, P; WALLACE, FA; CALDER, PC. Dietary glutamine enhances cytokine production by murine macrophages. Nutrition 1999; 15: 881-4.

WHITE, BD; DEAN, RG; MARTIN, RJ. Low protein diets increase neuropeptide Y expression in the basomedial hypothalamus of rats. J Nutr 1994; 124: 1152-60.

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

WHITE, BD; PORTER, MH; MARTIN, RJ. Protein selection, food intake, and body composition in response to the amount of dietary protein. Physiol Behav 2000; 69: 383-9.

WIDDOWSON, PS; UPTON, R; BUCKINGHAM, R; ARCHA, J, WILLIAMS, G. Inhibition of food response to intracerebroventricular injection of leptin is attenuated in rats with diet-induced obesity. Diabetes 1997; 46: 1782-5.

WILSON, A; TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. Nature Rev 2006; 6: 93-106.

WOODS, JL; WALKER, KZ; IULIANO, BS; STRAUSS, BJ. Malnutrition on the menu: nutritional status of institutionalized eldery Australians in low level care. J Nutr Health Aging 2009; 13 (8): 693-8.

WOODWARD, LJ; MOGRIDGE, N; WELLS, SW; INDER, TE. Can neurobehavioral examination predict the presence of cerebral injury in the very low birth weight infant? J Dev Behav Pediatr 2004; 25(5): 326-34.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food and Nutrition Terminology, in Terminology circular nº 27, World Health Organization, Geneva, 1973.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Nutrition for health and development: a global agenda for combating malnutrition. In: Geneva World Health Organization, Department of Nutrition for Health and Development; 2000.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010. Disponível em http://apps.who.int/whosis/database/core/core_select_process.cfm?countries=bra&indicators=StuntedChild&indicators=UnderweightChild&indicators=OverweightChild

WYKES, LJ; FIOROTTO, M; BURRIN, DG; ROSARIO, MD; FRAZER, ME; POND, WG; JAHOOR, F. Chronic low protein intake reduces tissue protein synthesis in a pig model of protein malnutrition. J Nutr 1996; 126: 1481-8.

WYMELBEKE, VV; BRONDEL, L; BRUN, JM, RIGAUD, D. Factors associated with the increase in resting energy expenditure during refeeding in malnourished anorexia nervosa patients. Am J Clin Nutr 2004; 80: 1469-77.

XAVIER, J.G. Repercussões estruturais da desnutrição protéica e renutrição em tecidos linfo-hematopoéticos de camundongos [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 1999.

XAVIER, JG; FAVERO, MA; VINOLO, MA; ROGERO, MM; DAGLI, ML; ARANA-CHAVEZ, VE; BOROJEVIC, R; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. Histol Histopathol 2007; 22(6): 651-60.

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