UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade De Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Efeito da desnutrição proteica sobre aspectos da mobilização, migração e sinalização celular. Papel da glutamina na modulação desses processos

Andressa Cristina Antunes Santos

Dissertação para obtenção do Título de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade De Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Efeito da desnutrição proteica sobre aspectos da mobilização, migração e sinalização celular. Papel da glutamina na modulação desses processos

Andressa Cristina Antunes Santos

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo
2015

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

Santos, Andressa Cristina Antunes
S237e Efeito da desnutrição proteica sobre aspectos da mobilização, migração e sinalização celular. Papel da glutamina na modulação desses processos / Andressa Cristina Antunes Santos. -- São Paulo, 2015.
103p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Fock, Ricardo Ambrósio

1. Hematologia 2. Glutamina 3. Desnutrição I. T. II. Fock, Ricardo Ambrósio, orientador.

615.15 CDD

Andressa Cristina Antunes Santos

Efeito da desnutrição proteica sobre aspectos da mobilização, migração e sinalização celular. Papel da glutamina na modulação desses processos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

Orientador/presidente

_____

1°. Examinador

_____

2°. Examinador

São Paulo,_____de _____

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais

voltará ao seu tamanho original"

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

*À **Deus,** primeiramente,*
por estar sempre guiando os meus
caminhos e por ter tornado tudo possível.

*Ao meu marido **Lucas,***
companheiro de todas as horas, que sempre
me incentivou, compreendeu minhas ausências
e pelo apoio incondicional.

*Aos meus pais **Nelson e Sylvia,***
por sempre me incentivarem a encarar novos
desafios e acreditarem na minha capacidade.

*Ao **Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock**,*

orientador deste trabalho,
meu especial agradecimento pela confiança, pelo
profissionalismo , pelos ensinamentos e por
ter contribuído à minha formação.

AGRADECIMENTOS

À Diretoria da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

À Comissão de Pós-Graduação em Farmácia (CPG) da FCF-USP.

À Comissão Coordenadora do Programa (CCP) de Pós-Graduação em Análises Clínicas da FCF-USP.

À Secretaria do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP.

À Profa. Dra. Primavera Borelli, Departamento de Análises Clínicas FCF-USP, por seu exemplo de profissionalismo.

À Araceli Hastreiter, amiga e doutoranda do Laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP, pela ajuda e contribuição ao longo desse trabalho, além do companheirismo em todos os momentos.

À Talita Sartori, amiga e mestranda do laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP, pela inestimável ajuda, amizade e bom humor.

Ao Edson Makiyama, técnico do Laboratório de Hematologia Experimental da FCF- USP, pela amizade e suporte técnico fornecidos.

Aos companheiros de pós-graduação do Laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP, Amanda Nogueira, Dalila Oliveira, Carolina Dias, Ed Wilson Santos, Graziela Batista, Guilherme Galvão, Jackeline Beltran e Maristela Tsujita.

Aos estagiários e colegas de trabalho.

Ao Prof. Júlio Tirapegui e a técnica Ivanir Pires do Laboratório de Bioquímica da Nutrição pela colaboração.

À Renata Albuquerque pelo auxilio com a citometria de fluxo.

Ao apoio financeiro da FAPESP, CAPES e CNPq sem o qual este trabalho não poderia ter sido executado.

RESUMO

SANTOS, A.C.A. **Efeito da desnutrição proteica sobre aspectos da mobilização, migração e sinalização celular. Papel da glutamina na modulação desses processos.** 2015. 103f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A desnutrição é uma condição nutricional que pode afetar muitos aspectos da resposta imunológica, como alterações na migração celular, na fagocitose, na resposta bactericida, mudanças na produção de radicais livres e espécies de nitrogênio e na produção de citocinas pró-inflamatórias. Logo, indivíduos desnutridos apresentam maior susceptibilidade a infecções. Visto que a glutamina é um aminoácido de extrema importância para a funcionalidade de diversas células do sistema imune e que as mesmas apresentam aumento da utilização desse aminoácido durante processos infecciosos, investigou-se, neste trabalho, quais os efeitos da glutamina sobre alguns aspectos da mobilização, migração e sinalização celular em um modelo experimental de desnutrição proteica. Para tanto, utilizou-se camundongos da linhagem BALB/c machos, os quais foram divididos em dois grupos, Controle e Desnutrido, que passaram a receber dietas isocalóricas contendo 12% (normoproteica) e 2% de caseína (hipoproteica), respectivamente, durante 5 semanas. Para as avaliações *in vivo*, animais de ambos os grupos receberam por via endovenosa 100µL de solução contendo 1,25µg de LPS e após 1 hora 0,75mg/Kg de L-glutamina (GLUT). Após o período de desnutrição ou de indução ao processo inflamatório, os animais foram eutanasiados e as amostras biológicas coletas. Foram avaliados nos animais estimulados *in vivo* hemograma, mielograma, as citocinas IL-10 e TNF-α circulantes e a expressão de CD11b/CD18 nos granulócitos do sangue periférico. Foi avaliado, *in vitro*, a capacidade migratória, a expressão de CD11b/CD18 de polimorfonucleados da medula óssea e do sangue periférico, bem como a síntese de citocinas IL-1α, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF-α e a expressão de NF-κB e IκBα em células cultivadas em meio com 0; 0,6; 2 e 10 mM de GLUT. Os animais desnutridos apresentaram anemia, leucopenia, hipoplasia medular e diminuição na concentração sérica de proteínas, albumina e pré-albumina. A GLUT, *in vitro*, apresentou capacidade de reduzir a produção de IL-1α e IL-6, bem como a ativação da via do NF-κB. No modelo *in vivo* a GLUT, em animais estimulados com LPS, alterou a cinética de migração neutrofílica e reduziu a expressão de CD18, bem como diminuiu os níveis de TNFα circulantes.

Palavras-chave: Desnutrição proteica; L-Glutamina; Migração; NF-κB; CD11b/CD18.

ABSTRACT

SANTOS, A.C.A. **Effect of protein malnutrition on aspects of mobilization, migration and cell signaling. The role of glutamine in the modulation of these processes.** 2015. 103f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Malnutrition is a nutritional condition that can affect many aspects of immune responses, affecting cell migration, phagocytosis, bactericidal response and changing free radicals production as nitrogen species and production of proinflammatory cytokines. Therefore, malnourished individuals are more susceptible to infections. Once glutamine is an amino acid of extreme importance to the functionality of various immune cells and those cells exhibit increased use of this amino acid during infectious processes. In this work was investigated, the effects of glutamine in some aspects of mobilization, cell migration and signaling in an experimental model of protein malnutrition. For this purpose, we used BALB/c mice, which received isocaloric diets, normoproteic or hypoproteic, containing respectively, 12% (Control group) and 2% (Malnourished group) of protein for a period of 5 weeks. The animals in both groups, for in vivo evaluations, received intravenous 100 µl of a solution containing 1.25µg of LPS and after 1 hour 0.75mg/kg of L-glutamine (GLUT). After the malnutrition period or the inflammatory process induction, the animals were euthanized and biological samples were collected. Were evaluated blood count, bone marrow, the cytokines IL-10 and TNF-α circulating and expression of CD11b/CD18 in granulocytes from peripheral blood of animals stimulated in vivo. In vitro were evaluated the migratory capacity, the expression of CD11b/CD18 polymorphonuclear bone marrow and peripheral blood, as well as the cytokines synthesis IL-1α, IL-6, IL-10, IL-12 and TNF-α and the expression of NF-κB and IκBα in cultured cells in media with 0; 0.6; 2 and 10 mM GLUT. Malnourished animals presented anemia, leukopenia, marrow hypoplasia and lower serum proteins, albumin and prealbumin. The GLUT in vitro has the capacity to reduce IL-1α and IL-6 as well as the activation of the NF-κB. In in vivo model, the GLUT altered neutrophil migration kinetics and reduced the expression of CD18, as well as decreased levels of circulating TNF-α in animals stimulated with LPS.

Keywords: Protein Malnutrition; L-glutamine; Migration; NF-κB; CD11b / CD18.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Grupos experimentais *in vitro*..... **35**

Figura 2 Grupos experimentais *in vivo*..... **36**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição das rações produzidas *in house* (normoproteica e hipoproteica)..... **31**

Tabela 2 Composição da mistura salínica utilizada na produção das rações *in house* (normoproteica e hipoproteica)..... **32**

Tabela 3 Composição da mistura vitamínica utilizada na produção das rações *in house* (normoproteica e hipoproteica)..... **33**

Tabela 4 Resultados das concentrações séricas de proteínas totais, albumina, globulinas e pré-albumina, dos grupos controles e desnutridos..... **48**

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Consumo de ração e avaliação do peso corpóreo..... **47**

Gráfico 2 Hemograma..... **50**

Gráfico 3 Mielograma..... **53**

Gráfico 4 Produção de IL1-α, IL6 e TNF-α por células medulares em cultura com diferentes concentrações de GLUT..... **56**

Gráfico 5 Dosagem de TNF-α e IL-10 no plasma dos animais controle e desnutridos..... **58**

Gráfico 6 Expressão de p-NF-κB/ NF-κB em células medulares em cultura nas diferentes concentrações de GLUT..... **59**

Gráfico 7 Expressão de p-IκBα/IκBα em células medulares em cultura nas diferentes concentrações de GLUT..... **60**

Gráfico 8 Perfil das populações das células medulares em cultura adquiridas em Citômetro de Fluxo..... **61**

Gráfico 9 Viabilidade das células granulocíticas medulares em cultura... **62**

Gráfico 10 Ensaio de Quimiotaxia com polimorfonucleados do SP e MO.. **63**

Gráfico 11 Expressão de CD11b e CD18 em granulócitos medulares..... **65**

Gráfico 12 Expressão de CD11b e CD18 em granulócitos do Sangue Periférico..... **67**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIN Instituto Americano de Nutrição

AMPK Proteína quinase ativada por AMP

CR4 *Complement Receptor* 4; CD11c/CD18

CTH Célula tronco hematopoiética

DC Célula dendrítica

ELISA Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FAO *Food and Agriculture Organization*

GLUT Glutamina

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IKK Quinase IκB

IL Interleucina

IRAK Quinase associada ao receptor de IL-1

IκBα Inibidor κB α

LBP Proteína ligante do lipopolissacarídeo

LFA-1 *Leukocyte Function Associated Antigen* 1; CD11a/CD18

LPS Lipopolissacarídeo

Mac-1 CD11b/CD18

MEC Matriz extracelular

MO Medula óssea

MyD88 Myeloid differentiation primary response gene 88

NF-κB Fator de transcrição κB

NK *Natural killers*

PAMPs Pathogen-associated molecular patterns**;** padrões moleculares associados a patógenos

PCR Proteína C reativa

SP Sangue Periférico

TCR T cell receptor**;** receptores de célula T

TLR Receptores do tipo Toll

TNFα Fator de Necrose Tumoral Alfa

TRAF-6 Fator associado ao receptor de TNF

VLA-4 *Very Late Antigen*-4

VLA-5 *Very Late Antigen*-5

WHO World Health Organization

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....X
LISTA DE TABELAS.....X
LISTA DE GRÁFICOS XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS XII
SUMÁRIO.....XIV
1 INTRODUÇÃO.....16
1.1 DESNUTRIÇÃO 16
1.2 DESNUTRIÇÃO: HEMOPOESE E MIGRAÇÃO CELULAR 18
1.3 ATIVAÇÃO CELULAR MEDIADA POR LPS.....22
1.4 L- GLUTAMINA.....25
2 OBJETIVOS: 29
3 MATERIAl E MÉTODOS 30
3.1 MATERIAL.....30
3.1.1 Animais 30
3.1.2 Rações 30
3.2 MÉTODOS.....33
3.2.1 Indução à desnutrição 33
3.2.2 Avaliação da concentração proteica das rações 34
3.2.3 Grupos experimentais 34
3.2.4 Indução ao processo inflamatório 36
3.2.5 Obtenção de sangue total e soro 37
3.2.6 Determinação das concentrações séricas de proteínas totais, albumina e pré-albumina.....37
3.2.7 Obtenção de células medulares.....38
3.2.8 Mielograma 39
3.2.9 Cultura de células medulares com diferentes concentrações de L-glutamina 39
3.2.10 Dosagem de citocinas 39
3.2.11 Determinação da expressão das proteínas NF-κB e IκBα, ambos total e fosforilado 40
3.2.11.1 Preparo do gel de poliacrilamida e eletroforese.....41
3.2.11.2 Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose).....41
3.2.11.3 Sondagens das proteínas com anticorpos.....42

3.2.11.4 Revelação com sistema quimioluminescente.....42
3.2.12 Viabilidade celular 43
3.2.13 Ensaio de quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* 43
3.2.14 Avaliação da expressão de CD11b e CD18 em granulócitos da MO e SP.....44
3.2.15 Análise estatística.....45
4 RESULTADOS.....46
4.1 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO E PESO CORPÓREO 46
4.2 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS TOTAIS, ALBUMINA SÉRICA E PRÉ-ALBUMINA.....47
4.3 PERFIL HEMATOLÓGICO 48
4.3.1 Hemograma.....48
4.3.2 Mielograma.....52
4.4 DOSAGEM DE CITOCINAS 55
4.4.1 *In vitro*.....55
4.4.2 *In vivo* 57
4.5 EXPRESSÃO DE NF-κB e IκBα 59
4.6 VIABILIDADE CELULAR 60
4.7 ENSAIO DE QUIMIOTAXIA.....62
4.8 EXPRESSÃO DE CD11b/CD18.....64
4.8.1 Em granulócitos da MO 64
4.8.2 Em granulócitos do SP 66
5 DISCUSSÃO 68
6 CONCLUSÂO 76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....77
ANEXOS 92

1 INTRODUÇÃO

1.1 DESNUTRIÇÃO

O termo desnutrição refere-se, segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), a uma condição fisiológica anormal, causada pelo consumo inadequado, desbalanceado ou excessivo de macronutrientes (carboidratos, proteína e lipídeos) e/ou micronutrientes (vitaminas e minerais) necessários para o desenvolvimento do organismo (FAO, 2015).

A desnutrição pode ser proveniente de dietas baseadas em alimentos com combinações e/ou proporções inadequadas, bem como a deficiência de nutrientes específicos, tanto por perda ou utilização excessiva (SHETTY, 2003). Sendo classificada em três categorias: subnutrição, deficiência de micronutrientes e sobrepeso e obesidade (WHO, 2011; FAO 2015).

Apesar dos numerosos avanços na saúde, a desnutrição ainda é um dos principais problemas de saúde pública do século XXI. Cerca de 805 milhões de pessoas, ou seja, 11,3% da população mundial estão subnutridas. A grande maioria desse percentual encontra-se nos países em desenvolvimento, em 1990-92 a taxa de subnutrição era de 23,4% nestes países. A despeito do progresso feito na diminuição deste percentual, ele ainda corresponde a 13,5 % da população, ou seja, 1 em cada 8 pessoas se encontra subnutrida. Em regiões desenvolvidas, a desnutrição acomete cerca 14,6 milhões de pessoas (FAO, 2014).

Atualmente no Brasil a prevalência da desnutrição é menor que 5% da população do país, estes índices foram gradativamente diminuindo ao longo dos últimos anos. A implementação de programas sociais que garantem a segurança alimentar da população contribuíram de forma significativa para essa redução (FAO, 2014). A distribuição dos índices de desnutrição é desigual nas diferentes áreas do Brasil. As regiões Norte e Nordeste concentram um maior número de indivíduos desnutridos em comparação às regiões Sul e Sudeste (MONTEIRO, 2003; LIMA et al., 2010). Apesar de a desnutrição infantil estar em declínio no país, em 2010 havia mais de 1 milhão de crianças com algum grau de

comprometimento nutricional (IBGE, 2010).

Os grupos mais predispostos à desnutrição são recém-nascidos, crianças (SAWAYA, 2006), gestantes, lactantes (BHUTTA et al., 2013), idosos (SACKS et al., 2000), indivíduos com distúrbios alimentares e/ou sob dietas radicais (MARCOS, 2000; NOVA et al., 2002) ou ainda pacientes hospitalizados, portadores de neoplasias e/ou doenças crônicas (WAITZBERG et al., 1999; BRUNDTLAND, 2000; AKNER e CEDERHOLM, 2001).

Em países em desenvolvimento a desnutrição atinge com frequência lactentes e crianças (BAIN et al., 2013; BHUTTA et al., 2013) e é responsável por 45% das mortes infantis contabilizando 3,1 milhões de vítimas por ano (JONES et al., 2014). Nestes países a principal causa de desnutrição é primária, já nos países desenvolvidos a causa geralmente é secundária, estando associada a outras doenças, acometendo tanto crianças como adultos (BARON, 1997).

Na Europa e na América do Norte 40-50% dos pacientes hospitalizados estão em risco de desnutrição (DELGADO et al., 2008). A tendência é que ao longo da internação esta situação se agrave, cerca de 70% dos pacientes inicialmente desnutridos sofrem uma piora gradual em seu estado nutricional durante a hospitalização, afetando a sua condição geral e a resposta ao tratamento (WAITZBERG, 2006; CORREIA et al., 2014). Além disso, a nutrição inadequada no período pré-operatório pode prejudicar até mesmo pacientes nutridos (Zelić et al, 2014).

A maioria das doenças graves tem um grande impacto sobre o estado nutricional do paciente. A desnutrição é um importante fator de risco para o aumento da morbidade, mortalidade, do tempo de internação e do custo com medicações (DELGADO et al., 2008). Dessa forma, o monitoramento do estado nutricional do paciente é essencial para definir estratégias dietéticas que possam atuar de forma sinérgica ao tratamento da doença original, garantindo assim o aporte de nutrientes necessário para o restabelecimento da saúde do indivíduo (HAMILTON e BOYCE, 2013; MALONE e HAMILTON, 2013).

Entre as formas de manifestações clínicas mais graves encontram-se o *Marasmus* e *Kwashiorkor,* duas síndromes decorrentes da desnutrição acentuada, podendo ocorrer de forma isolada ou combinada (síndrome Kwashiorkor-

marasmática) (DE ANGELIS, 1986; WHO, 2011). A forma mais comum é o *Marasmus*, que compreende a perda de massa muscular, redução do tecido adiposo subcutâneo e ausência de edema, geralmente é decorrente de severa restrição de ingestão calórica (carboidratos e proteínas) (BHAN et al., 2003; GROVER e EE, 2009). O *Kwashiorkor* é resultante principalmente da ingestão de dietas com níveis inadequados de proteína, independentemente de apresentar níveis calóricos apropriados e frequentemente está associada à processos infecciosos. Os pacientes com esta síndrome podem apresentar perda de peso corpóreo, edema generalizado, abdômen distendido, dermatoses e hepatomegalia (KRAWINKEL, 2003; GROVER e EE, 2009).

1.2 DESNUTRIÇÃO: HEMOPOESE E MIGRAÇÃO CELULAR

A hematopoese é de um processo dinâmico e altamente controlado em que células tronco hematopoiéticas (CTH) pluripotentes proliferam e se diferenciam para as linhagens mieloide ou linfoide, originando os diferentes tipos celulares maduros que compõem o sistema sanguíneo (NAKAJIMA, 2010). Para a manutenção desta alta taxa de renovação e proliferação celular os tecidos hematopoiéticos necessitam de um elevado aporte de nutrientes para o seu funcionamento adequado (BORELLI et al., 2009).

Deste modo, a desnutrição pode comprometer órgãos linfo-hematopoiéticos, como medula óssea (MO), baço e timo, com consequente modificação da resposta imune. Pode gerar alterações histo-funcionais nesses tecidos e até mesmo levar esses órgãos à falência, comprometendo assim, a hematopoese, a resposta inflamatória e o sistema imune (XAVIER et al., 2007; FOCK, et al., 2010).

Dados do nosso laboratório e de outros autores evidenciam que a desnutrição provoca alterações hematológicas como a anemia não ferropriva com redução de reticulócitos (DE ANGELIS, 1986; ROBBINS et al., 2003; BORELLI et al., 2009), sendo que o quadro anêmico encontrado é decorrente da redução da

produção de células e precursores eritróides, com baixa resposta à eritropoietina (BORELLI et al., 2007); provoca mudanças no perfil proliferativo das CTHs (NAKAJIMA et al., 2014) e prejudica a produção de precursores mieloides e linfoides, afetando a granulopoiese (BORELLI et al., 2009), contribuindo para quadros de neutropenia (RUST et al., 2000), leucopenia e linfocitopenia (FOCK, et al., 2010); também provoca alterações histológicas na matriz extracelular (MEC), com atrofia dos compartimentos eritróide e grânulo-monocítico e degeneração medular (XAVIER et al., 2007). As alterações hematológicas quantitativas podem ser observadas clinicamente durante períodos de carência nutricional e sugerem um estado de falência dos órgãos linfo-hematopoiéticos (DE ANGELIS, 1986; ALVES, 1995; LEE e HERBERT, 1999).

O binômio desnutrição-infecção pode ser visto sob dois aspectos: a desnutrição alterando os mecanismos de defesa do indivíduo e a infecção agravando o estado carencial previamente instalado ou ainda, a doença desencadeando-o (BEISEL, 1984; KEUSCH, et al., 1986; POWANDA & BEISEL, 2003; SCRIMSHAW, 2003).

Tem-se estudado os mecanismos celulares e moleculares pelos quais a deficiência proteica pode prejudicar a função imune, uma vez que a mesma é capaz de modificar a resposta fisiológica do organismo podendo induzir lesões celulares, aumentando assim a suscetibilidade de animais e humanos a doenças infecciosas (LI et al., 2007). Existem diferenças na extensão e no tempo da lesão: tecidos que exibem elevado "*turnover*" de proteínas são primeiramente afetados em relação aos que apresentam baixo "*turnover*" proteico. Portanto, mecanismos envolvidos com proliferação, diferenciação e morte celular podem alterar-se na desnutrição, afetando diferentemente os distintos tecidos do organismo (DEO *et al.,* 1975; WATERLOW, 1996).

Leucopenia e leucocitose são situações descritas na literatura em processos de desnutrição, especialmente em seres humanos, e encontra-se, geralmente, acompanhada de processos infecciosos ou de doenças crônicas. (ROSEN et al., 1974; ASCHKENASY, 1975; CATCHATOURIAN et al., 1980; GROSS & NEWBERNE, 1980).

As células granulocíticas e monocíticas exercem suas funções, na maioria das vezes, em sítios extravasculares (FRUHMAN, 1964). A capacidade dessas células em aderir ao endotélio, migrar através dos vasos, ingerir e destruir elementos estranhos tem sido reconhecida desde METSCHNIKOFF (1887). Contudo, questões pertinentes aos mecanismos de como substâncias exógenas exercem ações específicas ou não sobre a mobilização celular ainda são objetos de estudo.

A mobilização entre os diversos compartimentos dos órgãos hematopoiéticos e entre sangue periférico (SP) e tecidos pode ser modificada em situações fisiológicas (ciclo circadiano, alimentação, situação hormonal) e patológicas (WILLIANS et al., 2001). Endotoxinas alteram a mobilização celular não só deslocando os granulócitos, mas também modificando o influxo no compartimento de maturação (ATHENS et al., 1961), havendo variações na resposta conforme o microrganismo. Muitas variáveis podem modificar a base desse processo inflamatório, particularmente a natureza e a intensidade da lesão, o local e o tecido afetado, a resposta do hospedeiro, existência de distúrbios predisponentes ou pré-existentes, a presença de imunidade adquirida contra o eventual agente agressor, a presença ou não de farmacoterapia, bem como o estado nutricional do indivíduo (De ANGELIS, 1986; CHANDRA, 1991; KEUSCH, 1994; CONTRAN et al., 2000; LI et al., 2007; FOCK, et al., 2007; BORELLI et al., 2009). Entretanto os mecanismos por de trás desses achados ainda não estão perfeitamente esclarecidos.

As moléculas de adesão desempenham um importante papel na mobilização e migração celular. Estas moléculas podem facilitar vários processos de adesão entre células, leucócitos, sítios de inflamação e funcionar como co-estimuladores da ativação celular (Imhof & Dunon D, 1995; Springer, 1990). A regulação de sua expressão e de sua capacidade de adesão é mediada por citocinas, fatores quimiotáticos e outros mediadores.

São três, os subgrupos de moléculas de adesão do sistema imune: as selectinas, integrinas e superfamília das imunoglobulinas. As selectinas são encontradas em leucócitos, plaquetas e células endoteliais. São selectinas a E-

selectina (*Endothelial cell adhesion molecule*-1 ou E.L.A.M.-1); P-selectina (*Granule Membrane Protein* - GMP-140 ou CD62) e a L-selectina (*Leucocyte-endothelial cell adhesion molecule* ou L.E.C.A.M.-1, *lymphocyte adhesion molecule* - L.A.M.-1). E-selectina é responsável pela adesão de neutrófilos, monócitos e células T à sítios inflamatórios. L-selectina está expressa em todos os leucócitos, exceto nos linfócitos de memória ativados, esta selectina contribui para a migração de linfócitos e neutrófilos até os sítios inflamatórios. P-selectina é expressa em células endoteliais e plaquetas, e é a selectina responsável, na célula endotelial, pela fase mais precoce do recrutamento celular no processo inflamatório (HEEMANN, 1993; COSIO, 1993).

As integrinas são compostas por duas cadeias polipeptídicas ligadas não-covalentemente, α e β. As duas cadeias consistem em segmentos extracelulares, transmembrana e citoplasmático. Os segmentos extracelulares possuem um papel importante na ligação com proteínas da MEC.

Na medula óssea, as células tronco/progenitoras estão em contato estrito com a fibronectina, sendo que integrinas expressas por essas células, VLA-4 (*Very Late Antigen*-4) ($\alpha_4\beta_1$ integrina) e VLA-5 (*Very Late Antigen*-5) ($\alpha_5\beta_1$ integrina), são reconhecidas como mediadoras da interação entre essa população celular e a fibronectina tanto em camundongos quanto em humanos (WILLIAMS, 2001; LOO, 1998). Alguns estudos demonstraram que a expressão dessas integrinas em células progenitoras hematopoiéticas é modulada após continua exposição à citocinas em culturas *ex vivo* (BECKER, 1999; PROSPER, 1998), sendo que se verifica uma relação importante entre o ciclo celular e a adesão dessas células, via VLA-4 e VLA-5.

Para uma resposta inflamatória adequada é necessário a interação complexa entre as células leucocitárias e o endotélio vascular. A migração dos neutrófilos aos sítios inflamatórios depende da interação destas moléculas de adesão, como as integrinas β1, VLA-4 e as integrinas β2 LFA-1 (*Leukocyte Function Associated Antigen* 1; CD11a/CD18); Mac-1 (CD11b/CD18) e CR4 (*Complement Receptor* 4; CD11c/CD18) com ligantes sobre o endotélio (HEEMANN, 1993; COSIO, 1993; FRANCISCHETTI et al., 2010).

A superfamília das imunoglobulinas compreende uma variedade de proteínas de cadeia única com múltiplos domínios de características semelhantes às das imunoglobulinas e atuam como ligantes de outras moléculas de adesão, sendo membro dessa classe os receptores de célula T (T cell receptor-TCR), CD3, CD4, CD8, antígenos MHC classe I e classe II, LFA-2 (CD2), LFA-3 (CD58), ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD56b), ICAM-3 (CD56c), VCAM-1 (CD108), PECAM-1 (CD31). Sendo que ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 e PECAM-1 funcionam como ligantes para leucócitos nas células endoteliais (HEEMANN, 1993; COSIO, 1993).

A literatura, em situações de desnutrição apresenta dados muitas vezes conflitantes em relação ao número de leucócitos presentes, o que pode ser devido ao fato do quadro multicarencial estar frequentemente associado a outros processos patológicos. (ASCHKENASY, 1957, 1966a, 1966b, 1975; WATERLOW, 1996). Embora a resposta leucocitária seja variável, evidências indicam que situações em que a desnutrição não esteja associada a outras doenças, a leucopenia é a regra (FRIED et al., 1978; CATCHATOURIAN et al., 1980).

A aparente dificuldade da resposta leucocitária às infecções bacterianas em desnutrição proteica seria, segundo SUDA et al., (1976), devido à redução de células maduras na medula óssea e não à dificuldade primária no processo de mobilização dos leucócitos do sangue para os tecidos. Entretanto, os dados sobre a mobilização celular também são divergentes (CHANDRA, 1975; GOYAL et al., 1981; De la FUENTE& MUNOZ, 1992). Estudos têm demonstrado que a desnutrição pode alterar aspectos funcionais dos leucócitos (CHANDRA, 1976; GROSS & NEWBERNE, 1980; REDMOND, et al., 1991), uma vez que, se constatou uma redução na fagocitose, atividade bactericida e fungicida e alteração na produção de espécies reativas de oxigênio (CHANDRA, 1991; KEUSCH, 1994; BORELLI et al., 1995; VITURI et al., 2000; NARDINELLI e BORELLI, 2001).

1.3 ATIVAÇÃO CELULAR MEDIADA POR LPS

A primeira linha de defesa do organismo contra elementos nocivos envolve a participação de fagócitos (macrófagos, monócitos e granulócitos

polimorfonucleares), células dendríticas (DC) e células *natural killers* (NK), bem como proteínas presentes no sangue, como as do sistema complemento, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e imunoglobulinas (ABBAS et al., 2013). Aminoácidos são requisitados para a síntese de várias proteínas, entre elas, citocinas e anticorpos, as quais regulam as vias metabólicas especificas para a resposta imune contra patógenos (LI et al., 2007).

Diversos tipos celulares sintetizam e secretam citocinas, as quais podem atuar de maneira autócrina (agem nas próprias células que as produzem), parácrina (agem nas células vizinhas) ou endócrina (agem nas células distantes) em células que apresentam receptores específicos na superfície de sua membrana (OPAL e ESMON, 2003). As citocinas exercem um papel muito importante na regulação da resposta inflamatória e imune, possuem ação pró e anti-inflamatória e podem atuar de forma sinérgica ou antagônica a outras citocinas (DELVES et al., 2011). A ação de diversas citocinas pode levar a ativação, proliferação, maturação, sobrevivência ou morte nas células-alvo (ABBAS et al., 2013). Em condições de desnutrição não há, na literatura, um consenso em relação à produção de citocinas. Fato este, que pode ser decorrente principalmente, ao período, causa e gravidade do quadro de carência nutricional, bem como associação com diferentes enfermidades e ainda a diversos modelos experimentais e tipos celulares utilizados para estudo.

Padrões moleculares associados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns - PAMPs) são estruturas produzidas por microrganismos e reconhecidas por receptores do tipo Toll (TLR) (VANDEWALLE, 2008). O lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina presente na membrana de bactérias Gram-negativas, é capaz de induzir o sistema imune inato a produzir respostas não-específicas através da ativação do TLR4 (LIU et al., 2004). O LPS desempenha importante função na viabilidade das bactérias (RIESTSCHEL et al., 1982), sendo reconhecido como uma potente toxina bacteriana e, para diferenciar das exotoxinas secretadas pelas bactérias, foi chamado de endotoxina. O LPS possui a capacidade de ativar leucócitos, induzindo a secreção de citocinas, espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, sendo esta ativação dependente de

vias de sinalização que culminam com a ativação do fator de transcrição κB (NF-κB) (RIESTSCHEl et al., 1994).

A proteína ligante do lipopolissacarídeo (LBP), que está presente na corrente sanguínea é produzida pelos hepatócitos e possui alta afinidade pelo LPS, a ligação entre este dois compostos forma o complexo LPS-LBP (SCHUMANN et al., 1990). Uma vez formado, o complexo LPS-LBP, liga-se à molécula co-estimulatória CD14, presente na superfície de células-alvo, e à molécula acessória MD-2 (antígeno linfocítico 96) (FOCK et al., 2007). Estas ligações estimulam o recrutamento de MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88), que se associa à IRAK (quinase associada ao receptor de IL-1) que, após sua fosforilação, liga-se à TRAF-6 (fator associado ao receptor de TNF), o que resulta na ativação de MAP quinases ativadoras de IKK (quinase IκB) 1 e IKK2 (PERKINS, 2007).

Enquanto inativo, o NF-κB encontra-se no citoplasma na forma de dímero ligado a uma proteína inibitória: o IκBα (inibidor κB α). Esse complexo impede a translocação do NF-κB para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do IκBα são necessárias para que ocorra a translocação nuclear, IKKs ativas fosforilam o IκBα, que posteriormente será degradado nos proteossomos. Consequentemente o NF-κB dissociado do seu inibidor torna-se ativo. Uma vez ativo o NF-κB é capaz de translocar-se para o núcleo, onde regula a expressão de genes essenciais para a regulação do ciclo celular e para o processo inflamatório, como a produção de citocinas (BAEUERLE & BALTIMORE, 1996; COURTOIS e GILMORE, 2006).

A ativação do NF-κB se dá por meio de duas vias: clássica (via canônica) e alternativa (via não-canônica). A via clássica é a mais bem conhecida e estudada, está relacionado com a resposta imunológica, na qual regula expressão de genes essenciais no processo inflamatório, bem como na sobrevivência, proliferação e apoptose (XIAO, 2004). A via alternativa, entretanto, está associada à expressão de genes que atuam no desenvolvimento e manutenção de órgãos linfoides secundários (linfonodos, baço, tonsilas e placas de Peyer) (ALCAMO et al., 2002).

O LPS possui capacidade de causar diversos efeitos fisiopatológicos, dentre eles a produção de citocinas. As principais células afetadas pelo LPS são os leucócitos que produzem citocinas pró-inflamatórias, que estimulam uma intensa resposta celular, com liberação de mediadores secundários, quimiotaxia e ativação de granulócitos (OPAL & ESMON, 2003; BEUTLER & RIETSCHEL, 2003), que são capazes de originar atividades resultantes da interação direta entre as citocinas e a resposta celular (KEUSCH, 1994; FUJIHARA, et al., 2003).

Ainda que seus mecanismos moleculares intracelulares sejam distintos, LPS e ligantes da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) e de IL-1 resultam na ativação da via do NF-κB (JOBIN et al., 1999). Assim, há indução da produção das citocinas IL-1α, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF-α, consideradas mediadores pró-inflamatórios celulares que controlam a infecção através da liberação de mediadores secundários, da indução da quimiotaxia e da ativação, sobrevivência, proliferação, maturação e/ou morte de células imunológicas (BEUTLER, 2003; GRIVENNIKOV et al., 2009; DA SILVA LIMA et al., 2013). A IL-6 atua como mediador primário da reação de fase aguda, estimulando a produção hepática de proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa (PCR) e inibidores de proteases (por exemplo, inibidor de protease a-1), sendo que em um segundo momento ocorre aumento de citocinas anti-inflamatórias, sendo a IL-10 a principal (PETERSEN &PEDERSEN, 2005). Assim, ocorre a inibição da produção de TNF-α, IL-1, IL-6 e IL-8 através da ação de IL-10 (FIORENTINO et al., 1991; BERKMAN et al., 1995, CASSATELLA et al., 1993).

1.4 L- GLUTAMINA

A desnutrição proteica reduz a concentração da maioria dos aminoácidos no plasma, os quais exercem um importante papel na regulação da resposta imune, ativando os linfócitos T, linfócitos B, células NK e macrófagos; atuam também na expressão de genes e proliferação de linfócitos; produção de anticorpos, citocinas e outras substâncias citotóxicas. Logo, o conhecimento do metabolismo dos

aminoácidos em leucócitos é fundamental para o desenvolvimento de meios eficazes em prevenir e tratar a imunodeficiência causada pela restrição proteica da dieta (LI et al., 2007).

Ehrensvard et al., 1949, descreveu pela primeira vez a importância da glutamina (GLUT) na sobrevivência e proliferação celular *in vitro*, entretanto somente com os trabalhos de Eagle foi possível detalhar melhor este processo (EAGLE et al., 1956). O metabolismo da GLUT possui duas enzimas principais, a glutaminase e glutamina sintetase. A partir da glutaminase, ocorre a catalisação da hidrólise da GLUT em glutamato e amônia, que é muito importante para diversas funções celulares. A glutamina sintetase catalisa a conversão de glutamato em GLUT, usando a amônia como fonte de nitrogênio (KOMATSU et al., 2007).

A GLUT é o aminoácido mais abundante nos músculos e plasma humano. O músculo esquelético possui um papel importante no metabolismo deste aminoácido, visto que apresenta elevados níveis de síntese e liberação do mesmo (NEWSHOLME et al., 2003). No plasma, representa cerca de 20% do total de aminoácidos livres. Normalmente, a GLUT é considerada um aminoácido não essencial, pois pode ser sintetizada pelo organismo de acordo com suas necessidades (NEWSHOLME, 2001).

Porém, durante situações de estresse como: trauma, septicemia, câncer e exercício físico extenuante, as concentrações de GLUT no plasma podem diminuir abaixo da concentração fisiológica, resultando numa situação de desequilíbrio, nessas condições um fornecimento extra de glutamina na dieta é requerido. Por essa razão, esse aminoácido pode ser considerado “condicionalmente essencial” (NEWSHOLME, 2001; SMITH & WILMORE, 1990). Em situações catabólicas, assim como na desnutrição, ocorre a proteólise muscular, consequentemente tem-se a liberação de aminoácidos que podem ser captados por outros tecidos. Os aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina, são usados diretamente como fonte alternativa de energia por diversos tipos celulares ou ainda na síntese de alanina e GLUT, que são utilizados posteriormente no processo de gliconeogênese (KRAFT et al.,

2005).

Além de fornecer nitrogênio para a síntese de proteínas, a glutamina é precursora de ácidos nucléicos, nucleotídeos, hexosaminases e do principal antioxidante, glutationa. Este aminoácido também é um importante combustível oxidante para a rápida proliferação de células, como as células do trato gastrointestinal e sistema imune. Dentre as funções da glutamina ainda pode-se ressaltar o papel na indução de proteínas do tipo *heat shock*, na detoxificação e captação de amônia da corrente sanguínea, na participação metabolismo energético celular juntamente com a glicose, atuação na gliconeogênese, regulação do equilíbrio ácido-base renal, diminuição da resistência à insulina, modulação do sistema imune, na regulação da expressão de genes relacionados ao metabolismo e da resposta inflamatória, na transdução de sinal e na ativação de vias de sinalização intracelular (BROSNAN, 2003; ALEDO, 2004; CURI et al., 2005; ZIEGLER et al., 2005; YUNEVA et al., 2007; MOK; HANKARD, 2011).

A GLUT é classificada por alguns autores como um imunonutriente, dado a sua capacidade de modulação do sistema imune (KIM, 2011). Sabe-se, que a privação deste aminoácido é prejudicial para a funcionalidade dos macrófagos, visto que a GLUT é essencial para o metabolismo adequado destas células (ROGERO, et al., 2008b). A taxa de utilização de glutamina por macrófagos é similar ou superior à de glicose (FRISINA *et al.,* 1994; ROWBOTTOM *et al.,* 1995). Contudo, apenas pequena parte dos carbonos da molécula de glicose (<10%) e do aminoácido glutamina (5-25%) são completamente oxidados por macrófagos em meio de cultura. Sendo assim, a maioria das moléculas de glicose é convertida em lactato (glicólise), enquanto grande parte da glutamina é convertida em glutamato, aspartato e lactato (glutaminólise) (NEWSHOLME *et al.,* 1999).

Estudos têm demonstrado efeitos da GLUT diretamente na modulação do sistema imune. A carência de GLUT, pode levar à redução na capacidade proliferativa de linfócitos, alteração na atividade de monócitos e macrófagos, indução da apoptose celular, alteração do potencial redox celular pela modulação da síntese de glutationa e aumento da atividade do sistema AMPK

(proteína quinase ativada por AMP) (ROTH, 2007; HARDIE, 2008).

Dados constataram que concentrações extracelulares de glutamina regulam a proliferação de linfócitos-T, produção de IL-2, a diferenciação de linfócitos-B e também modulam a fagocitose e produção de citocinas em neutrófilos e macrófagos (JAYARAJAN; DALY, 2011). A GLUT pode aumentar a capacidade de resposta de células do sistema imune (CASTELL e NEWSHOLME, 2001; NEWSHOLME, 2001), estimulando a proliferação de linfócitos e a capacidade fagocítica de macrófagos, bem como atua na produção de citocinas por esses dois tipos celulares (CALDER e YAQOOB, 1999; ROGERO, et al., 2008b).

Todavia, outros grupos demonstraram que a GLUT possui a capacidade de atuar negativamente na via de sinalização dependente de NF-κB e, consequentemente, inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-8 (WISCHMEYER et al., 2003; HUBERT-BURON et al., 2006; DA SILVA LIMA et al., 2013).

Resultados do nosso grupo demonstrou que a suplementação de GLUT na dieta de camundongos recém-desmamados modula a capacidade de síntese de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio, TNF-α, IL-1α e IL-6 por macrófagos obtidos desses animais (ROGERO, 2008a).

Há divergências na literatura quanto ao benefício da GLUT na modulação do sistema imune. Fato que pode ser o explicado pelas variações nas metodologias utilizadas (*in vitro* / *in vivo*), no tipo de modelo experimental (murino / humano), nos tipos celulares avaliados, nas concentrações de GLUT testadas e no período de exposição a esse aminoácido.

2 OBJETIVOS:

Sabendo-se que a desnutrição compromete diversos aspectos da hematopoese e da resposta inflamatória e que a glutamina é um aminoácido condicionalmente essencial com ação sobre vários mecanismos da resposta inflamatória. Avaliamos, nesse trabalho, os efeitos da L-glutamina, *in vitro* e *in vivo* sobre alguns parâmetros da hematopoese, mobilização e migração celular, bem como aspectos da modulação de vias de sinalização em um modelo de desnutrição proteica.

Para tanto, foram avaliados:

- O perfil nutricional (através do consumo da ração, da ingestão de proteína e perda de peso, proteína total, albumina e pré-albumina sérica);
- O perfil hematológico (hemograma e mielograma);
- Capacidade das células medulares em cultura em sintetizar as citocinas: TNF-α, IL-1 α, IL-6, IL-8, IL10 e IL-12 quando estimulados com LPS;
- Dosagem de TNF-α e IL-10 circulante nos grupos estimulados *in vivo*;
- A expressão das proteínas NF-κB total e fosforilado e IκBα total e fosforilado nas células medulares em cultura;
- A viabilidade dos granulócitos na cultura celular provenientes da medula óssea;
- A capacidade migratória dos polimorfonucleados isolados do lavado medular e do sangue periférico;
- A expressão de CD11b/CD18 nas células medulares em cultura e na sangue periférico dos animais estimulados *in vivo*;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/C, de dois a três meses de idade, isogênicos, machos, provenientes do Biotério Central do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram submetidos, desde o nascimento, às mesmas condições ambientais (ciclo de luz de 12 horas, temperatura ambiente entre 22-25ºC e umidade relativa do ar a 55 ± 10%). Logo após o desmame, os animais passaram a ser alimentados com ração Nuviab® e água *ad libitum* até o início do experimento. Os animais foram pesados e distribuídos em gaiolas metabólicas, pesados a cada 48 horas durante o período de adaptação (FOCK, et al, 2010), que foi definido pelo ganho e estabilidade do peso corpóreo.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Protocolo CEUA/FCF/394, anexos).

3.1.2 Rações

Foram utilizados dois tipos de ração - normoproteica e hipoproteica - para os animais utilizados no modelo experimental, as quais foram preparadas contendo, respectivamente, 12% e 2% de proteína, sendo esta destinada aos animais desnutridos e aquela aos animais do grupo controle. Ambas as rações foram produzidas em nosso laboratório (*in house*) na forma de granulado e armazenadas a -4°C até a sua utilização.

A formulação das rações, discriminadas na **Tabela 1**, foi realizada de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN) para

camundongos adultos – AIN-93M (REEVES et al., 1993). Como fonte de proteína foi utilizada caseína comercial (LABSYNTH®, Diadema, Brasil).

As rações utilizadas são isocalóricas (3601,0 kcal/kg), diferindo apenas na concentração proteica que é definida pela quantidade de caseína adicionada. Como a caseína fornece em torno de 80% de fosfato, na ração hipoproteica, a composição da mistura salínica foi corrigida de acordo com a concentração proteica, para que a deficiência de fosfato fosse suprida (REEVES et al., 1993). As misturas salínica (**Tabela 2**) e vitamínica (**Tabela 3**) foram preparadas sob encomenda pela Rhoster® (Rhoster®, Araçoiaba da Serra, Brasil).

Tabela 1: Composição das rações produzidas *in house* (normoproteica e hipoproteica)

Constituintes	**Ração Normoproteica** (g/kg de ração)	**Ração Hipoproteica** (g/kg de ração)
Caseína (85% pureza)	120	20
Sacarose	100	100
Óleo de milho	80	80
Mistura salínica	35	35
Mistura vitamínica	10	10
Fibra alimentar (celulose)	10	10
Bitartarato de colina	2,5	2,5
Metionina	1,5	1,5
Tert-butilhidroquinona	0,008	0,008
Amido de milho	1000	1000

Tabela 2: Composição da mistura salínica utilizada na produção das rações *in house* (normoproteica e hipoproteica)

Constituintes	**Ração Normoproteica** (g/kg de mistura salínica)	**Ração Hipoproteica** (g/kg de mistura salínica)
Carbonato de cálcio	357,00	357,00
Fosfato de potássio	236,16	353,21
Cloreto de sódio	74,00	74,00
Sulfato de potássio	46,60	46,60
Citrato de potássio	39,00	0,00
Óxido de magnésio	24,00	24,00
Citrato férrico	6,06	6,06
Carbonato de zinco	1,65	1,65
Meta-silicato de sódio	1,45	1,45
Carbonato de Manganês	0,63	0,63
Carbonato cúprico	0,30	0,30
Sulfato de potássio e crômio	0,275	0,275
Cloreto de lítio	0,0174	0,0174
Selenato de sódio	0,01025	0,01025
Iodeto de potássio	0,01	0,01
Ácido bórico	0,0815	0,0815
Paramobilidato de amônio	0,00795	0,00795
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

Tabela 3: Composição da mistura vitamínica utilizada na produção das rações *in house* (normoproteica e hipoproteica)

Constituintes	**Ração Normoproteica e Hipoproteica** (g/kg de mistura vitamínica)
Ácido nicotínico	3,00
Panteonato de cálcio	1,60
Ácido fólico	0,20
Piridoxina-HCl	0,70
Riboflavina	0,60
Tiamina-HCl	0,60
D-biotina	0,02
Vitamina A	0,80
Vitamina B12	2,50
Vitamina E	15,00
Vitamina D3	0,25
Vitamina K	0,075
Sacarose	974,655

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Indução à desnutrição

Animais da linhagem isogênica BALB/c foram pesados e separados em gaioleiros metabólicos individuais onde permaneceram durante todo período experimental, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais descritas no item 3.1.1. Estes animais passaram inicialmente por um período de adaptação de 1 semana, no qual todos os animais receberam ração normoproteica e água *ad libitum,* sendo avaliado a cada 48 horas o seu peso e o consumo de ração dos animais.

Após o período de adaptação os animais foram separados em dois grupos: controle (nutrido) e desnutrido (experimental), os quais receberam rações

isocalóricas, entretanto com diferentes concentrações de proteína, sendo administradas as rações normoproteica e hipoproteica, respectivamente. O período utilizado para a indução à desnutrição proteica (DP) foi 35 a 40 dias, sendo que o peso e o consumo de ração de cada animal foram avaliados a cada 3 dias (FOCK, et al., 2010).

3.2.2 Avaliação da concentração proteica das rações

A determinação da concentração de proteína das rações e a pureza da caseína utilizadas foram determinadas pelo método micro-Kjeldahl (Instituto Adolfo Lutz, 1985) no Laboratório de Bioquímica da Nutrição (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo), pela Sra. Ivanir Pires e sob-responsabilidade do Prof. Dr. Júlio Tirapegui.

3.2.3 Grupos experimentais

Numa primeira etapa pretendíamos avaliar os efeitos da suplementação com L-glutamina, *in vitro*, diferentes concentrações, sobre a capacidade de células medulares quando estimulados com LPS em sintetizar TNF-α, IL-1α, IL-6, IL10 e IL-12, a expressão de proteínas, como NF-kB e IκBα, ambas tanto total quanto fosforiladas, bem como a capacidade migratória dessas células e a expressão de CD11b/CD18.

Para tanto cada grupo foi subdividido em 4 grupos, diferindo de acordo com a suplementação de L-glutamina na cultura celular, 0; 0,6; 2 e 10 mmol/L, representados esquematicamente na **Figura 1**.

Figura 1 – Grupos experimentais *in vitro.*

Controle

- **C0/LPS** – as células foram cultivadas na ausência de glutamina e estimuladas com LPS
- **C0,6/LPS** – as células foram cultivadas na presença de 0,6mmol/L de glutamina e estimuladas com LPS
- **C2/LPS** – as células foram cultivadas na presença de 2mmol/L de glutamina e estimuladas com LPS
- **C10/LPS** – as células foram cultivadas na presença de 10mmol/L de glutamina e estimuladas com LPS

Desnutrido

- **D0/LPS** – as células foram cultivadas na ausência de glutamina e estimuladas com LPS
- **D0,6/LPS** – as células foram cultivadas na presença de 0,6mmol/L de glutamina e estimuladas com LPS
- **D2/LPS** – as células foram cultivadas na presença de 2mmol/L de glutamina e estimuladas com LPS
- **D10/LPS** – as células foram cultivadas na presença de 10mmol/L de glutamina e estimuladas com LPS

O meio sem adição de glutamina foi o controle negativo. A escolha pela concentração de glutamina de 0,6 mmol/L durante o período de cultura celular deve-se ao fato dessa concentração corresponder àquela observada no plasma de animais adultos saudáveis. A concentração 2 mmol/L é uma concentração padrão em cultura de células e apesar desse valor estar acima das concentrações de glutamina *in vivo* (0,6 mmol/L), experimentalmente 2 mmol/L propiciaram melhores resultados em condições de incubação de células por períodos prolongados (24–72 horas) (EAGLE et al., 1956). A escolha da concentração de 10 mmol/L — apesar de significantemente superior àquela utilizada em ensaios *in vitro* — é devido ao fato de estudos, que utilizaram outros tipos celulares, como enterócitos e células mononucleares do sangue periférico, terem verificado efeitos opostos da glutamina sobre a expressão de genes que codificam para citocinas quando a concentração desse aminoácido foi igual ou superior a 2 mmol/L (WISCHMEYER *et al.,* 2003; HUBERT-BURON *et al.,* 2006).

Em outra etapa, quando se pretendia avaliar o efeito da L-glutamina *in vivo* sobre a mobilização de células da medula óssea para o sangue periférico, bem como, a expressão de CD11b/CD18 e capacidade migratória nos granulócitos e os níveis de TNF-α e IL 10 circulante, os animais foram subdivididos em quatro grupos, representados esquematicamente na **Figura 2**.

Figura 2 – Grupos experimentais *in vivo.*

Controle
- **C+LPS/-GLN:** Grupo Controle estimulado *in vivo* com LPS sem estímulo de glutamina
- **C+LPS/+GLN:** Grupo Controle estimulado *in vivo* com LPS e estimulado *in vivo* com glutamina
- **C-LPS/+GLN:** Grupo Controle sem estimulo com LPS e estimulado *in vivo* com glutamina
- **CSham:** Grupo Controle que receberá o veículo

Desnutrido
- **D+LPS/-GLN:** Grupo Desnutrido estimulado *in vivo* com LPS sem estímulo de glutamina
- **D+LPS/+GLN:** Grupo Desnutrido estimulado *in vivo* com LPS e estimulado *in vivo* com glutamina
- **D-LPS/+GLN:** Grupo Desnutrido sem estimulo com LPS e estimulado *in vivo* com glutamina
- **DSham:** Grupo Desnutrido que receberá o veículo

3.2.4 Indução ao processo inflamatório

Como descrito no item anterior, os animais dos grupos controle e desnutridos foram subdivididos em 4 grupos para as avaliações do efeito da GLUT *in vivo.* Para tanto, os animais dos grupos **C+LPS/-GLN, C+LPS/+GLN, D+LPS/-GLN** e **D+LPS/+GLN**, receberam endovenosamente, 100µL de solução contendo 1,25µg de LPS de *Escherichia coli,* sorotipo 026: B6 (Sigma® Chemical Company, USA) diluídos em solução fisiológica. Os animais dos grupos **C+LPS/+GLN** e **D+LPS/+GLN** foram inoculados com 0,75mg/Kg de L-glutamina 1h após a injeção de LPS. Animais dos grupos **C-LPS/+GLN e D-LPS/+GLN** não receberam estímulo de LPS sendo administrado somente 0,75mg/Kg de L-glutamina e os animais dos grupos **CSham** e **DSham** foram inoculados somente com o veículo das soluções. Após o período de três horas, calculado após a primeira intervenção, os animais foram eutanasiados e as amostras biológicas coletadas.

3.2.5 Obtenção de sangue total e soro

Os camundongos foram previamente anestesiados com cloridrato de quetamina (100 mg/Kg de peso, Ketamina®, Cristália, São Paulo, Brasil) associado ao cloridrato de xilazina (10 mg/Kg de peso, Rompun®, Bayer HealthCare Animal Health, Leverkusen, Alemanha), por via intramuscular. As amostras sanguíneas foram obtidas a partir do plexo axilar, com o auxílio de uma pipeta de transferência. Amostras sem anticoagulante foram utilizadas para obtenção de soro que foi separado através da centrifugação da amostra a 2000 g por 10 minutos a 4°C, para a dosagem das proteínas totais, albumina e pré-albumina. O soro foi dividido em alíquotas e congelado a -40°C até o momento de sua análise. Para obtenção de plasma, as amostras foram colhidas com EDTA (sal potássico do ácido etileno diaminotetracético) 10% na proporção de 50µL para cada 1,0 mL de sangue total para a realização do hemograma para obtenção do sangue total, o qual foi utilizado para a realização do hemograma. Após a coleta das amostras sanguíneas, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

O hemograma foi realizado a partir do sangue total. A análise do volume de hematócrito, a dosagem de hemoglobina e as contagens globais de hemácias, leucócitos e plaquetas foram determinadas pelo analisador automático de células sanguíneas ABC Vet (ABX Diagnostics®, Horiba, Kyoto, Japão). A contagem diferencial de leucócitos foi determinada a partir da preparação de extensões sanguíneas, realizadas após coleta do sangue e coradas pela coloração de May-Grünwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947). As extensões coradas foram analisadas por microscopia óptica e foram contados, no mínimo, 100 leucócitos.

3.2.6 Determinação das concentrações séricas de proteínas totais, albumina e pré-albumina

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método do Biureto (GORNALL, 1949) e a determinação de albumina realizada pelo método do Verde de Bromo Cresol (RODKEY, 1965; DOUMAS et al., 1971), para tanto foram

utilizado “kits" comerciais da Labtest® (Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, Brasil). As amostras foram processadas em triplicata e as leituras realizadas em espectrofotômetro (EL800 Universal Microplate Reader – Bio-Tek® Instrumentals, Winooski, EUA). A pré-albumina foi quantificada por nefelometria automatizada, utilizando-se reagentes comerciais N-ANTISORO pré-albumina (Dade Behring®, Marburg, USA), seguindo-se a metodologia indicada pelo fabricante.

3.2.7 Obtenção de células medulares

Os animais dos dois grupos, controle e experimental, foram anestesiados, exsanguínados e por último, sacrificados por deslocamento cervical, conforme descrito no item 3.2.5. A seguir os fêmures foram seccionados entre a articulação fêmur-ilíaca e fêmur-tibial. Com o auxílio de uma agulha e seringa, foi realizada a lavagem da cavidade femoral e das tíbias. A lavagem se deu com 2 ml de meio RPMI 1640 (Cultilab® Campinas, Brasil), pH 7,4, estéril, contendo 10% de soro bovino fetal.

Posteriormente, as suspensões celulares foram centrifugadas (1500 rpm por 10 minutos), os sobrenadantes foram desprezados e as células foram cuidadosamente ressuspensas em 1,0 mL de meio de cultura. Foi separada uma alíquota da suspensão celular para realização do mielograma e outra para a contagem de células nucleadas na câmara de Neubauer. O material foi mantido imerso em gelo, por um breve período de tempo, até a sua utilização.

Todos os procedimentos de coleta e cultivo celular foram realizados em fluxo laminar bidirecional, específico para este fim, para manutenção da esterilidade dos materiais, bem como para evitar contaminação das culturas celulares.

3.2.8 Mielograma

A partir das amostras da suspensão de células totais da MO reservadas para o mielograma, conforme descrito no item 3.2.7, foram preparadas lâminas por citocentrifugação (Incibrás®, São Paulo, Brasil). As lâminas foram coradas pelo método May-Grünwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947) para a análise diferencial com contagem mínima de 300 células. A contagem total de células foi realizada em hemocitômetro de Neubauer após diluição das amostras em líquido de Turk na proporção 1:50.

3.2.9 Cultura de células medulares com diferentes concentrações de L-glutamina

As células foram coletadas como descrito no item 3.2.7 e cultivadas na concentração de $1x10^6$/mL por 24 horas, em placas de 24 poços, em 1mL de meio RPMI 1640 (Cultilab® Campinas, Brasil), pH 7,4, estéril, contendo 10% de soro bovino fetal, suplementado com quatro diferentes concentrações de glutamina (0; 0,6; 2 e 10 mmol/L) durante o período de incubação celular.

Posteriormente, as células foram incubadas com 1,25 µg/mL de LPS de *Eschericia coli*, sorotipo 026:B6 (Sigma Chemical Company, USA®), durante 30 minutos. Após esse período, o sobrenadante da cultura celular foi removido e congelado (-40 °C) para posterior dosagem de citocinas TNF-α, IL-1α, IL-6, IL10 e IL-12 e as células foram lisadas para posterior análise da expressão de NF-κB e IκB-α (total e fosforilado).

3.2.10 Dosagem de citocinas

A quantificação de citocinas foi realizada no sobrenadante das células medulares cultivadas na diferentes concentrações de glutamina. Como descrito no item 3.2.9, as células ficaram 24 horas em cultura a 37 °C, 5% de CO^2, em

placas de cultura com 24 poços na concentração de 1 x 10^6 células por poço, e um volume total de 1 mL e após este período foram estimuladas com LPS durante 30 minutos.

A determinação da concentração de IL-1α (Catálogo DY400, R&D Systems), IL-6 (Catálogo DY406, R&D Systems), TNF-α (Catálogo MTA00, R&D Systems), IL-10 (Catálogo DY417, R&D Systems) e IL-12 (Catálogo DY419, R&D Systems), foram dosadas por ELISA, (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (Quantikine® ELISA, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido), seguindo as orientações do fabricante.

3.2.11 Determinação da expressão das proteínas NF-κB e IκBα, ambos total e fosforilado

Para análise da expressão de proteínas foram utilizadas culturas de células na concentração de 1x10^6 células/mL/poço em placas de 24 wells. Essas células foram mantidas em cultura e receberam suplementação de glutamina nas concentrações descritas no item 3.2.9.

Decorrido o tempo de cultura, retirou-se o sobrenadante e as células foram ressuspendidas em 150 µL de tampão RIPA® gelado (25mM TrisHCl pH7,6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sódio, 0,1% sódio dodecil sulfato, Pierce) (Pierce, Rockford, EUA), contendo inibidores de fosfatase e proteases (1mM PMSF, 50 mM NaF, 10 µg/mL leupeptina e 10 µg/mL aprotinina). As amostras foram sonicadas por 1 minuto e centrifugadas por 15 minutos a 14000 rpm e a 4°C. Separou-se uma alíquota de 20 µL para a quantificação de proteínas e os 130 µL restantes foram misturados ao tampão Laemmli 5x concentrado (Tris HCl 1M pH 6,8, 0,01% azul de bromofenol, 10% SDS, 50% glicerol, 10% mercaptoetanol) ao sobrenadante na proporção de 4 partes de amostra para 1 parte de tampão. Essa solução foi aquecida a 95°C por 5 minutos para desnaturar as proteínas, e armazenada a -40°C até o seu uso.

Para a quantificação de proteínas, foi utilizado um kit comercial (BCATM protein assay kit®, Pierce, Rockford, EUA) que se baseia no método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.2.11.1 Preparo do gel de poliacrilamida e eletroforese

Procedeu-se conforme protocolo de Sambrook et al. (1989) e Harlow & Lane (1988), descrito sucintamente a seguir. Os géis foram preparados em bicamada, sendo a camada superior (gel de empacotamento) constituída de acrilamida a 5%, 125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,1 % TEMED. O gel inferior (resolutivo) foi preparado com 10 % de poliacrilamida, 380 mM Tris.HCl, pH 8,8, 0,1 % persulfato de amônio e 0,077 % TEMED. Um padrão de baixo peso molecular (BioRad®, Philadelphia, EUA) foi usado para a comparação dos pesos das frações separadas.

A eletroforese foi executada a 120 V em tampão de corrida (25 mM Trizma base, 192 mM glicina, 0,1% SDS e pH 8,3) até que as amostras percorressem todo o gel.

3.2.11.2 Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose)

Após a separação, a etapa de transferência das proteínas para uma membrana de fluoreto polivinidileno (PVDF) foi realizada em uma cuba de eletroforese contendo tampão de transferência (25 mM Trizma base, 192 mM glicina, 20% de metanol e pH 8,3). Um "sanduíche" foi então montado na seguinte ordem: esponja, 2 folhas de papel 3MM, membrana, gel, 2 folhas de 3 MM (Whatman), esponja. Procedeu-se com a transferência em cuba de eletroforese, sob corrente de 30V por 2 horas.

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

3.2.11.3 Sondagens das proteínas com anticorpos

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com proteínas de leite desnatado Molico, a 3 %, em tampão TBST, por 0,5-2 h, à temperatura ambiente e sob agitação. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST.

Para a sondagem das proteínas (imunoblot), a membrana foi incubada overnight a 4°C e sob agitação constante, com os seguintes anticorpos primários: anti-NFκB [total (Catálogo SC-33039, Sant Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) e fosforilado (Catálogo SC-372, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA)] nas seguintes concentrações: 1:1.000 (anti-NFκB total), 10:1.000 (anti-NFκB fosforilado) em TBST; anti-IκBα [total (Catálogo SC-371, Sant Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) e fosforilado (Catálogo SC-101713, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA)] nas seguintes concentrações: 1:1.000 (anti-NFκB total), 2:1.000 (anti-NFκB fosforilado) em TBST.

Posteriormente, a membrana foi novamente lavada 3 vezes, por 10 min e incubada por 2 horas com o anticorpo secundário (anti IgG de coelho conjugado com biotina, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) numa diluição de 1:10.000 em TBST. Após a incubação, a membrana foi lavada novamente.

3.2.11.4 Revelação com sistema quimioluminescente

A revelação foi feita por quimioluminescência, utilizando o kit de revelação ECL (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents®, Amersham Biosciences, Pittsburgh, EUA). As aquisições e análise das imagens foram feitas no equipamento ImagiQuanti 400® (GE Healthcare, Pittsburgh, EUA). A β-actina foi utilizada como padrão para a quantificação das bandas formadas (3:1. 000.000).

3.2.12 Viabilidade celular

As células da medula foram cultivadas como descrito no item 3.2.9 para a avaliação da viabilidade. Após o período de cultura as células foram retiradas com o auxílio do scraper e centrifugadas 1200rpm por 10min. Ao pellet foi adicionado 50µl de tampão anexina, 2,5µl de anexina V (Catálogo 556419, BD Pharmingen™) e 8µl de iodeto de propídio (Catálogo 51-66211E, BD Pharmingen™), nos tubos controles foi adicionado apenas o anticorpo correspondente. Na sequência as amostras foram incubadas por 20 min no escuro em temperatura ambiente. Ao final foram acrescentados mais 200µl de tampão anexina e então realizada a análise no citômetro de fluxo FACS Canto (Becton and Dickinson, San Jose, CA, USA). Um total de 50.000 eventos foi adquirido e as análises posteriores à aquisição utilizou-se do programa CELLQuest Pro®. As células foram marcadas pelo iodeto de propídio e anexina V.

3.2.13 Ensaio de quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*

As amostras de sangue total e da medula óssea foram obtidas como descrito no item 3.2.5 e 3.2.7 respectivamente, os neutrófilos foram separados pelo método de Percoll modificado (Eggleton, 1998). O gradiente de Percoll para isolar as células do SP foi feito através da lenta adição de 2 ml de solução de Percoll a 70% em cima de 2 ml de solução de Percoll a 60%, ambas diluídas em PBS 0,1% BSA. Já para as células da MO foram usados 4ml nas diluições de 81% e 62%. Em seguida 2 ml de sangue total ou 4 ml do lavado da medula foram adicionados lentamente acima do gradiente de Percoll e centrifugados a 1600xg por 35 min, em temperatura ambiente. Depois da centrifugação um halo se formou entre as soluções de Percoll contendo os polimorfonucleados que foram coletados. Os polimorfonucleados foram lavados com PBS 0,1% BSA através de centrifugação a 1200rpm por 10min a 22ºC por duas vezes. Após a lavagem os polimorfonucleados foram ressuspendidos a $2x10^5$ células/ml em meio RPMI 1640.

Na sequência, foram preparadas placas de 24 wells com meio RPMI 1640 com as diferentes concentrações de GLUT e com a adição de LPS a 1,25 µg/mL. Em cada poço foi colocado um *insert* equipado com filtro de poros de 8 µm, dentro dos quais foram plaqueadas as células na concentração de $2x10^5$ células/mL nas respectivas concentrações de GLUT. A placa então foi mantida em incubadora em uma atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO_2 á 37°C por 24 horas. Após este período, o *insert* foi retirado e as células que migraram foram contadas em câmara de neubauer.

3.2.14 Avaliação da expressão de CD11b e CD18 em granulócitos da MO e SP

As células da medula foram cultivadas como descrito no item 3.2.9 para a avaliação da expressão de CD11b e CD18. Após o período de cultura as células foram retiradas com o auxílio do scraper e centrifugadas 1200rpm por 10min. Formando o pellet da amostra.

As células do sangue periférico foram coletadas como descrito no item 3.2.5 e então se prosseguiu com a separação dos polimorfonucleados, através do gradiente de Percoll como descrito no item 3.2.13. Então foi realizado 2 vezes o processo de lise dos eritrócitos, o qual consiste em adicionar 3mL de solução hipotônica, por 1 min, em seguida foi colocado 3ml de solução hipertônica, por 1 min. Na sequência adicionou-se 5mL de PBS 1% e procedeu-se então com centrifugação a 1500rpm por 7min. Formando o pellet da amostra.

Em ambos os casos após a preparação das amostras, foi adicionado ao pellet 20µL da solução contendo os anticorpos anti-CD11b (FITC) (Catálogo 553310, BD Pharmingen™) e anti-CD18 (APC) (Catálogo 562828, BD Pharmingen™) na concentração de 1/200 µL. As amostras foram incubadas durante 20 minutos no escuro e a temperatura ambiente. Ao final foram acrescentados mais 200µl de PBS e então realizada a análise no citômetro de fluxo FACS Canto (Becton and Dickinson, San Jose, CA, USA). Um total de

100.000 eventos foi adquirido e as análises posteriores a aquisição utilizou-se do programa CELLQuest Pro®.

3.2.15 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism for Windows versão 2.01. Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de homocedasticidade da amostra e classificados em paramétricos ou não paramétricos pela aderência à curva Normal (curva Gaussiana).

Dados considerados paramétricos foram submetidos à análise estatística Teste T de Student, enquanto que os considerados não paramétricos foram submetidos à análise estatística Mann- Whitney. Para avaliar o efeito do modelo foram feitas análises entre os grupos Controle e Desnutrido. Para a avaliação da ação da GLUT, foram realizadas comparações da diferentes concentrações dentro de cada grupo (controle e experimental). O nível de significância adotado foi de 95% ($p<0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO E PESO CORPÓREO

Após o período de adaptação os animais foram divididos em dois grupos, controle e desnutridos, que passaram a receber dietas isocalóricas contendo, respectivamente 12% (normoproteica) e 2 % (hipoproteica) de proteína (**Tabela 1**) durante o período de indução a desnutrição.

Foi avaliado o consumo de ração, a ingestão diária de proteína de cada animal, o peso ao final do período experimental e a variação do peso corporal. Calculou-se a ingestão diária de proteínas pelos animais a partir do consumo diário de ração e do conteúdo proteico presente nas rações utilizadas, que como descrito no item 3.2.2, realizou-se a dosagem da porcentagem de proteína em cada lote de ração produzida e fornecida aos animais.

O consumo de ração foi semelhante entre os grupos **(Gráfico1-A**), no entanto, devido as diferentes dietas, a ingestão de proteína entre os grupos foi significativamente menor **(Gráfico1-B)** o que resultou em um menor de peso nos animais desnutridos **(Gráfico1-C)**, sendo que os animais controle ganharam cerca de 12% enquanto os animais desnutridos perderam cerca de 18% em relação ao peso inicial **(Gráfico1-D).** Dessa forma, o tipo de desnutrição induzido pode ser classificado como desnutrição proteica (DP).

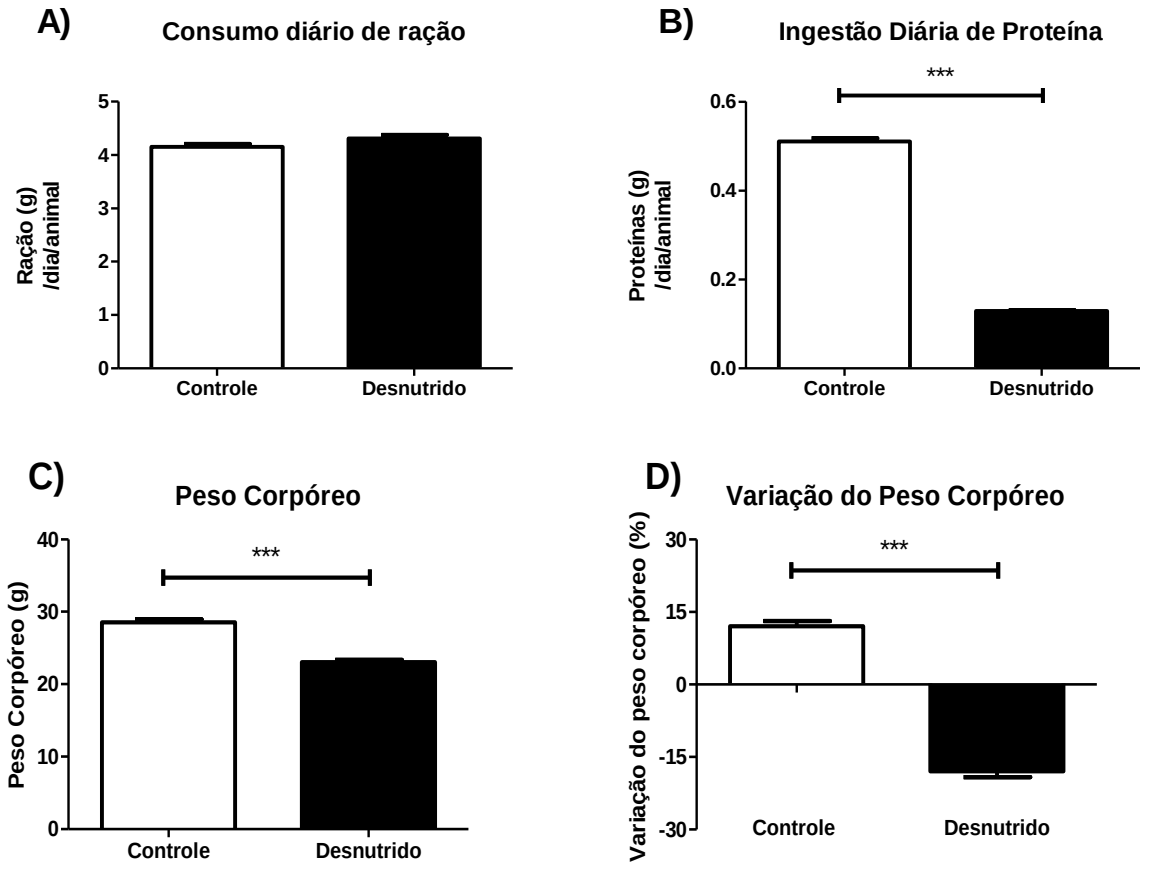


Gráfico 1. Consumo de ração e avaliação do peso corpóreo. (A) Consumo diário em gramas de ração por animal dos grupos Controle e Desnutrido. (B) Ingestão diária em gramas de proteína por animal dos grupo Controle e Desnutrido. (C) Peso corpóreo dos grupos Controle e Desnutrido ao final do experimento. (D) Variação final do peso corpóreo dos grupos Controle e Desnutrido. Resultados expressos em média e erro padrão. Teste T de Student. ***p<0,001 (n=45). n representa o número de animais avaliados.

4.2 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS TOTAIS, ALBUMINA SÉRICA E PRÉ-ALBUMINA

Após o período de indução à DP, os animais foram eutanasiados como descrito no item 3.2.5 e no soro obtido através da centrifugação do sangue periférico sem anticoagulante foram dosadas as concentrações séricas de proteínas totais, albumina e pré-albumina. Camundongos submetidos à ração

hipoproteica apresentaram valores séricos de proteínas totais, albumina, pré-albumina significativamente menores que os animais do grupo controle **(Tabela 4)**, caracterizando o quadro de DP.

Tabela 4. Resultados das concentrações séricas de proteínas totais, albumina, globulinas e pré-albumina, dos grupos controles e desnutridos.

Parâmetros	Controle (n=12)	Desnutrido (n=12)
Proteínas totais (g/dL)	6,09 ± 0,13	4,02 ± 0,11**
Albumina (g/dL)	2,72 ± 0,07	1,97 ± 0,08*
Pré-albumina (mg/dL)	12,01 ± 0,12	5,81± 0,20**

Tabela 4. Concentrações séricas de proteínas totais, albumina, globulinas e pré-albumina, dos grupos controles e desnutridos. Resultados expressos em valores médios ± o desvio padrão de proteínas totais, albumina e pré-albumina dos animais do grupo controle e desnutrido. Os animais do grupo controle (n=12 animais) e desnutrido (n=12 animais) receberam, respectivamente, a ração normoproteica e a ração hipoproteica. Valores significativos para *$p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$. n representa o número de animais avaliados.

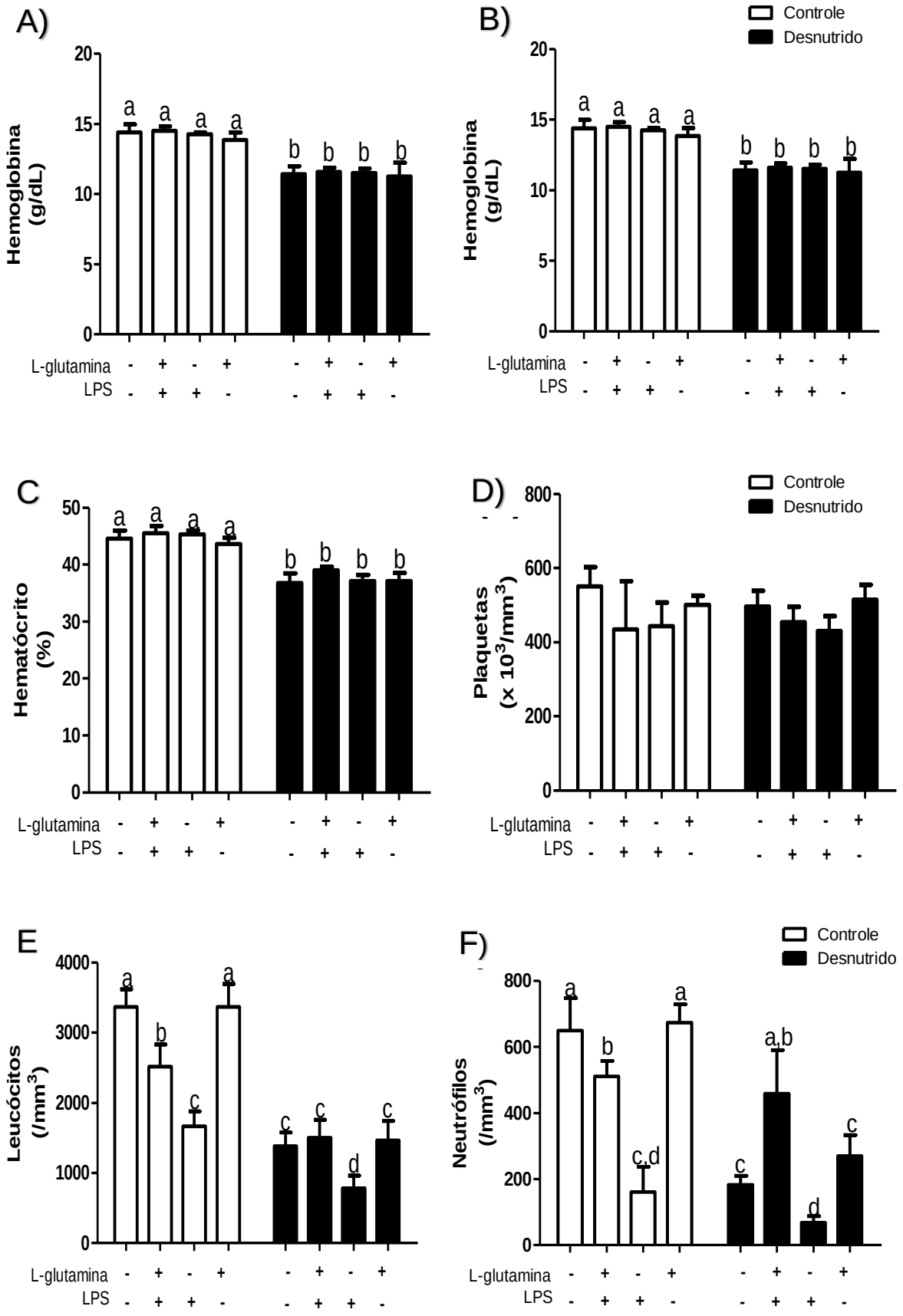
4.3 PERFIL HEMATOLÓGICO

4.3.1 Hemograma

A DP induzida nestes animais provocou alterações significativas no eritrograma e leucograma dos animais. O grupo desnutrido apresentou diminuição significativa na celularidade de praticamente todas as séries analisadas quando comparados ao grupo controle.

Os animais do grupo controle e desnutrido não apresentaram alterações no eritrograma quando estimulados *in vivo* com LPS e/ou glutamina e comparado com os respectivos grupos Sham. Entretanto, observamos alterações na série

leucocitária. Animais estimulados com LPS, tanto do grupo controle quanto do grupo desnutrido, quando comparados com os respectivos animais do grupo Sham apresentaram redução do número de leucócitos circulantes, que apesar de ser observado em todas as séries é ocasionado principalmente pela redução da série neutrofílica. Animais dos grupos controle e desnutrido quando estimulados com LPS e administrado posteriormente a GLUT apresentaram parcial reversão da leucopenia e neutropenia que fora inicialmente constatada nos grupos estimulados apenas com LPS.


A)
B)
Controle
Desnutrido
Hemoglobina (g/dL)
C
Hematócrito (%)
D)
Plaquetas (x 10³/mm³)
E
Leucócitos (/mm³)
F)
Neutrófilos (/mm³)
L-glutamina
LPS

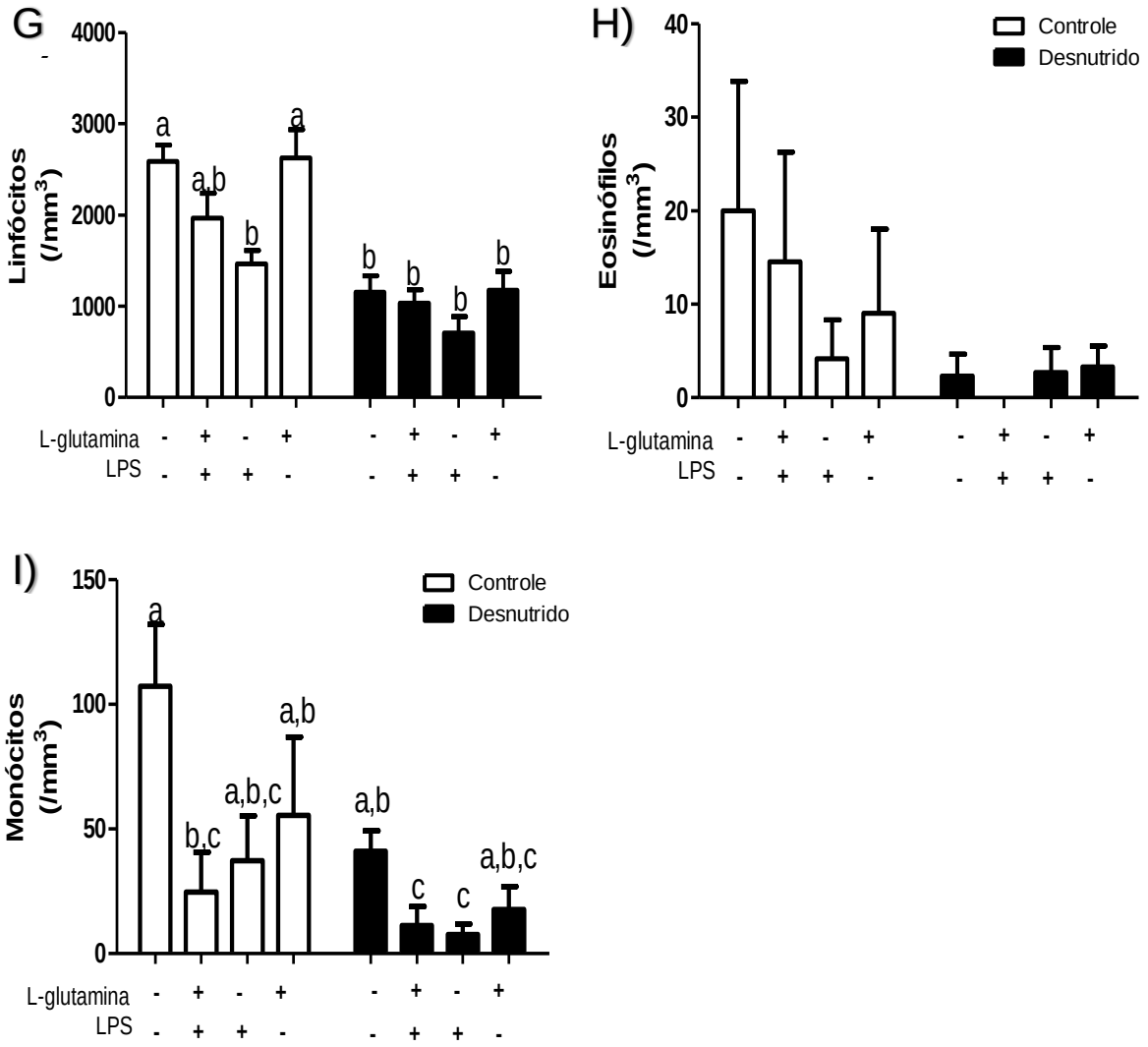


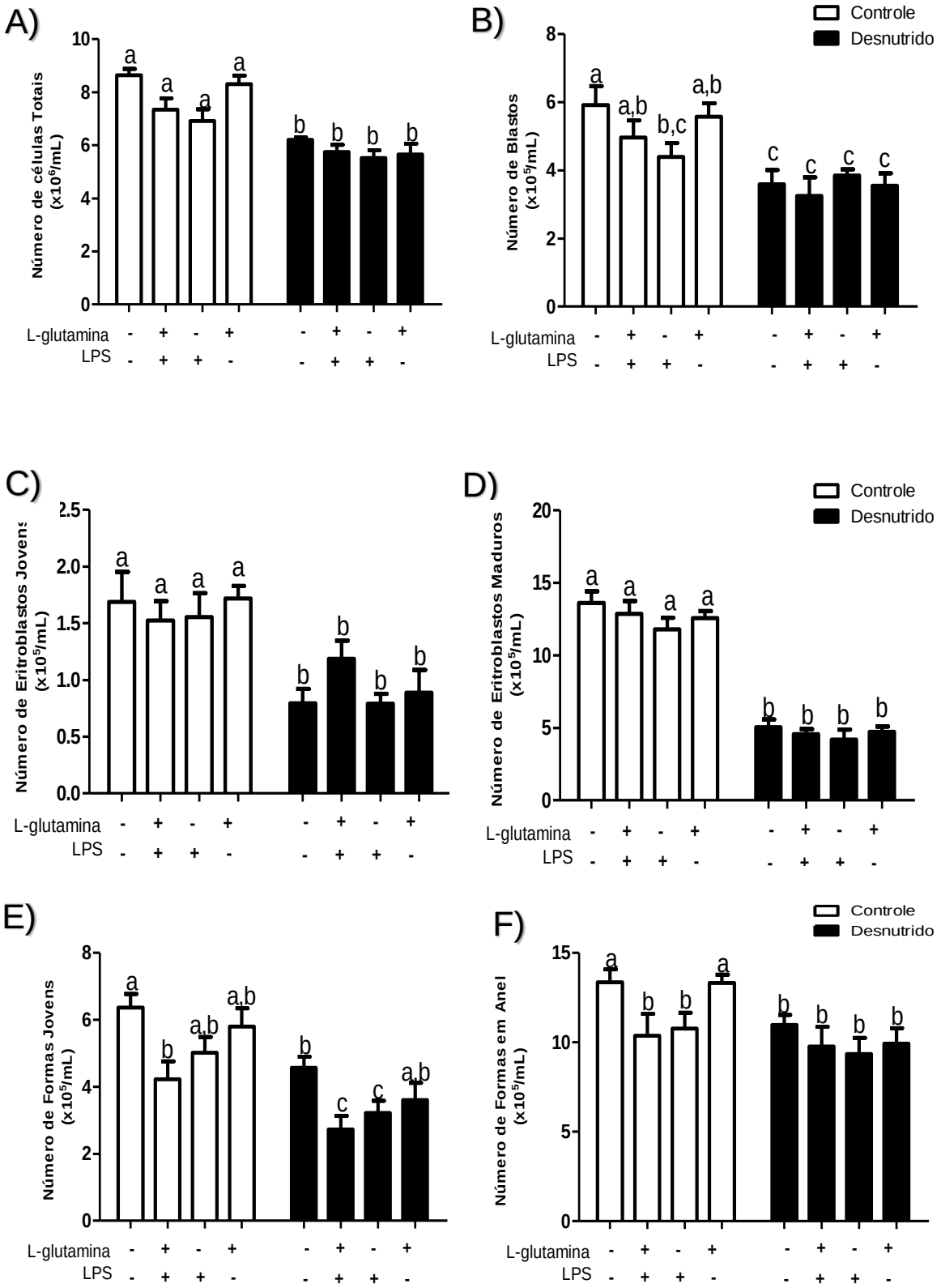
Gráfico 2. Hemograma. (A) Resultados representam a média e erro padrão da quantidade de hemácias do sangue periférico dos grupos Controle (C) e Desnutrido (D) com os diferentes estímulos. (B) Resultados representam a média da quantidade de hemoglobina do sangue periférico dos grupos C e D com os diferentes estímulos. (C) Resultados representam a média da quantidade de hematócrito do sangue periférico dos grupos C e D com os diferentes estímulos. (D) Resultados representam a média da quantidade de plaquetas do sangue periférico dos grupos C e D com os diferentes estímulos. (E) Resultados representam a média da quantidade de leucócitos do sangue periférico dos grupos C e D com os diferentes estímulos. (F) Resultados representam a média da quantidade dos valores absolutos do diferencial leucocitário para neutrófilos do sangue periférico dos grupos C e D com os diferentes estímulos. (G) Resultados representam a média da quantidade dos valores absolutos do diferencial leucocitário para eosinófilos do sangue periférico dos grupos C e D com os diferentes estímulos. (H) Resultados representam a média da quantidade dos valores absolutos do diferencial leucocitário para linfócitos do sangue periférico dos grupos C e D com os diferentes estímulos. (I) Resultados representam a média da quantidade dos valores absolutos do diferencial leucocitário para monócitos do sangue periférico dos grupos C e D com os diferentes estímulos. Resultados expressos em média ± desvio padrão da média (DPM). Letras diferentes sobrescritas significam diferenças significativas entre os grupos ($p \leq 0,05$; ANOVA) (n=6).

4.3.2 Mielograma

No grupo desnutrido observou-se hipoplasia com significativa redução no número de células totais, bem como diminuição no número de blastos, do número de células da série granulocítica e da série eritrocitária quando comparados ao grupo controle.

Os animais do grupo controle e desnutrido não apresentaram alterações na série eritróide quando estimulados *in vivo* com LPS e/ou glutamina e comparado com os respectivos animais do grupo Sham.

Em relação à linhagem granulocítica constatou-se diferenças entre animais estimulados *in vivo* com LPS e/ou glutamina ao se comparar com os respectivos animais do grupo Sham. Entretanto a comparação entre animais estimulados *in vivo* com LPS e animais estimulados *in vivo* com LPS e suplementados com glutamina não apresentou diferenças.


A)
Número de células Totais (x10⁶/mL)
L-glutamina
LPS
B)
Controle
Desnutrido
Número de Blastos (x10⁵/mL)
C)
Número de Eritroblastos Jovens (x10⁵/mL)
D)
Controle
Desnutrido
Número de Eritroblastos Maduros (x10⁵/mL)
E)
Número de Formas Jovens (x10⁵/mL)
F)
Controle
Desnutrido
Número de Formas em Anel (x10⁵/mL)

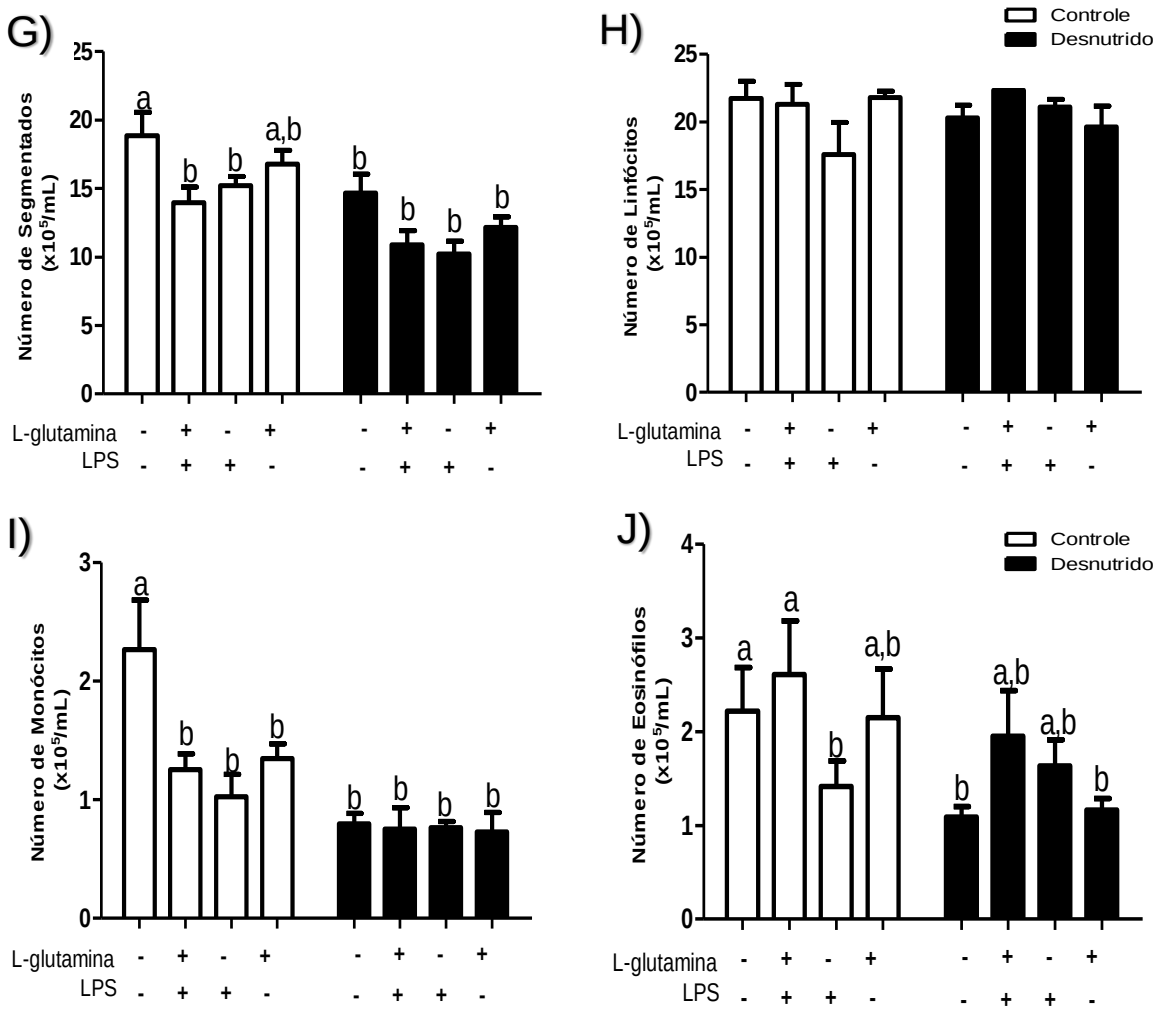


Gráfico 3. Mielograma (A) Resultados representam a média da quantidade de células totais do mielograma dos grupos Controle (C) e Desnutrido (D) com os diferentes estímulos. (B) Resultados representam a média da quantidade de blastos presentes no mielograma dos grupos C e D com os diferentes estímulos. (C) Resultados representam a média da quantidade de eritroblastos jovens presentes no mielograma dos grupos C e D com os diferentes estímulos. (D) Resultados representam a média da quantidade de eritroblastos maduros presentes no mielograma dos grupos C e D com os diferentes estímulos. (E) Resultados representam a média da quantidade de formas jovens presentes no mielograma dos grupos C e D com os diferentes estímulos. (F) Resultados representam a média da quantidade de formas em anel presentes no mielograma dos grupos C e D com os diferentes estímulos. (G) Resultados representam a média da quantidade de segmentados presentes no mielograma dos grupos C e D com os diferentes estímulos. (H) Resultados representam a média da quantidade de linfócitos presentes no mielograma dos grupos C e D com os diferentes estímulos. (I) Resultados representam a média da quantidade de monócitos presentes no mielograma dos grupos C e D com os diferentes estímulos. (J) Resultados representam a média da quantidade de eosinófilos presentes no mielograma dos grupos C e D com os diferentes estímulos. Resultados expressos em média ± desvio padrão da média (DPM). Letras diferentes sobrescritas significam diferenças significativas entre os grupos ($p \leq 0,05$; Teste T de Student) (n=6).

4.4 DOSAGEM DE CITOCINAS

4.4.1 *In vitro*

Com o objetivo de investigar a participação do aminoácido glutamina em um modelo de desnutrição na produção de citocinas *in vitro*, foram plaqueadas $1x10^6$ células da cultura, em placas de 24 wells e em seguida tratadas como descrito no item 3.2.9, depois de 24 horas, foi feito estímulo com LPS por 30 minutos, após esse período o sobrenadante foi coletado e acondicionado a -40°C para dosagem das citocinas IL1-α, IL6, IL-10, IL-12 e TNF-α por ELISA.

As células medulares em cultura não produziram IL-10 e IL-12 em níveis detectáveis pela técnica utilizada, não sendo possível a sua quantificação. Os níveis de IL-1α **(Gráfico-4A)** e IL-6 **(Gráfico-4B)** se apresentam mais elevados nos meios de culturas em que não houve suplementação de GLUT. Tanto nos grupos controles quanto nos desnutridos há diferença estatística entre os grupos 0mM para os com as diferentes concentrações de GLUT, para os níveis de IL-1α, enquanto que nos níveis de IL-6 esta diferença só é observada nos grupos controles. A dosagem de TNF-α **(Gráfico-4C)** não mostrou diferença significativa entre os grupos.

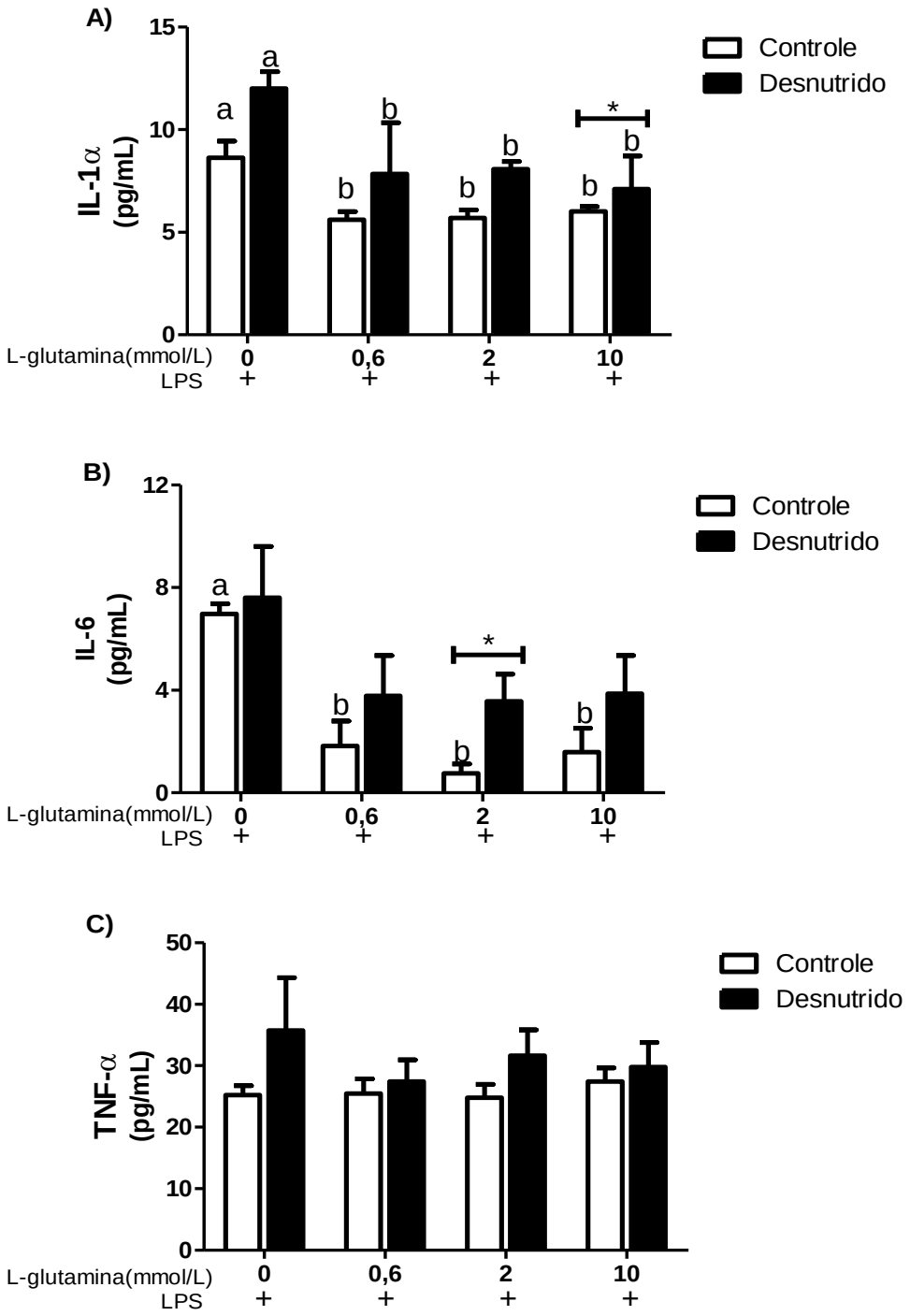


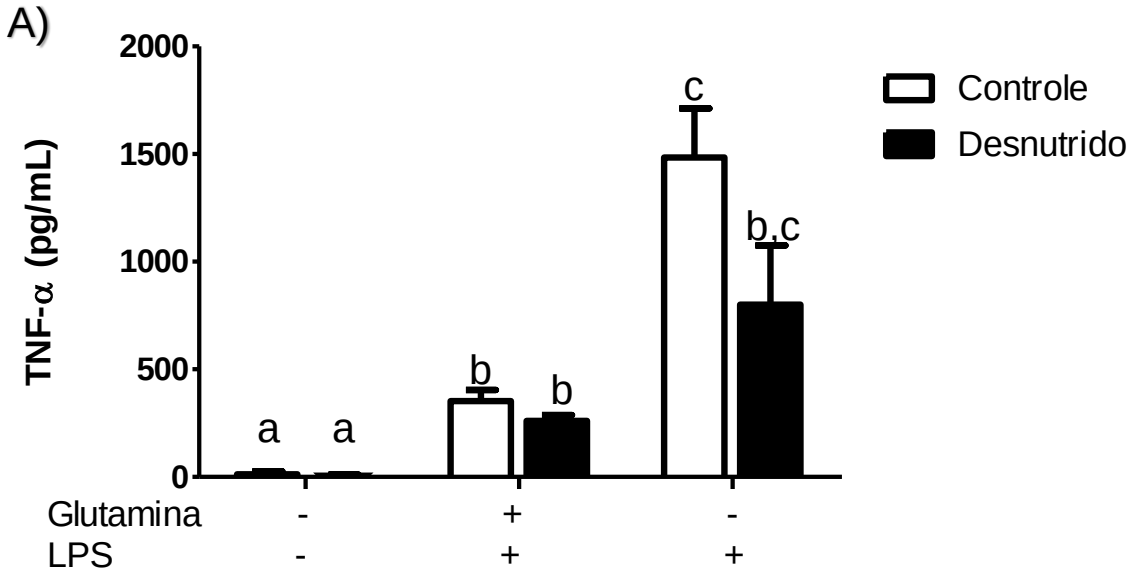
Gráfico 4. Produção de IL1-α, IL6 e TNF-α por células medulares em cultura com diferentes concentrações de GLUT. (A) Produção de IL-1α com as diferentes concentrações de glutamina e estimuladas com LPS (n=4). (B) Produção de IL-6 com as diferentes concentrações de glutamina e estimuladas com LPS (n=4). (C) Produção de TNF-α com as diferentes concentrações de glutamina e estimuladas com LPS (n=4). Resultados expressos em média e erro padrão, n representa o número de animais avaliados. Letras diferentes sobrescritas significam diferenças significativas entre as concentrações de GLUT de um mesmo grupo. * significa diferenças significativas entre os grupos controle e desnutrido tratados com a mesma concentração de glutamina. ($p \leq 0,05$; Mann-Whitney).

4.4.2 *In vivo*

Conforme descrito no item 3.2.4 os animais que receberam o estímulo de LPS, o receberam através de uma injeção por via endovenosa de 100µL de solução na concentração 12,5 ng/µL de LPS, enquanto que a GLUT foi administrada na concentração 0,75mg/Kg, para a avaliação os efeitos da suplementação da GLUT na produção de citocinas *in vivo*.

O TNF-α é uma citocina pró-inflamatória e encontra-se significativamente aumentada nos grupos em que foi feito o estímulo de LPS. A administração de GLUT posterior ao estímulo de LPS foi capaz de diminuir significativamente o aumento na produção de TNF-α causado pelo LPS, tanto no grupo controle quanto no desnutrido **(Gráfico 5A)**.

Os níveis de IL-10 circulante **(Gráfico 5B)** aumentam significante com o estímulo de LPS, entretanto a administração de GLUT nesses animais não altera significativamente a produção desta citocina.



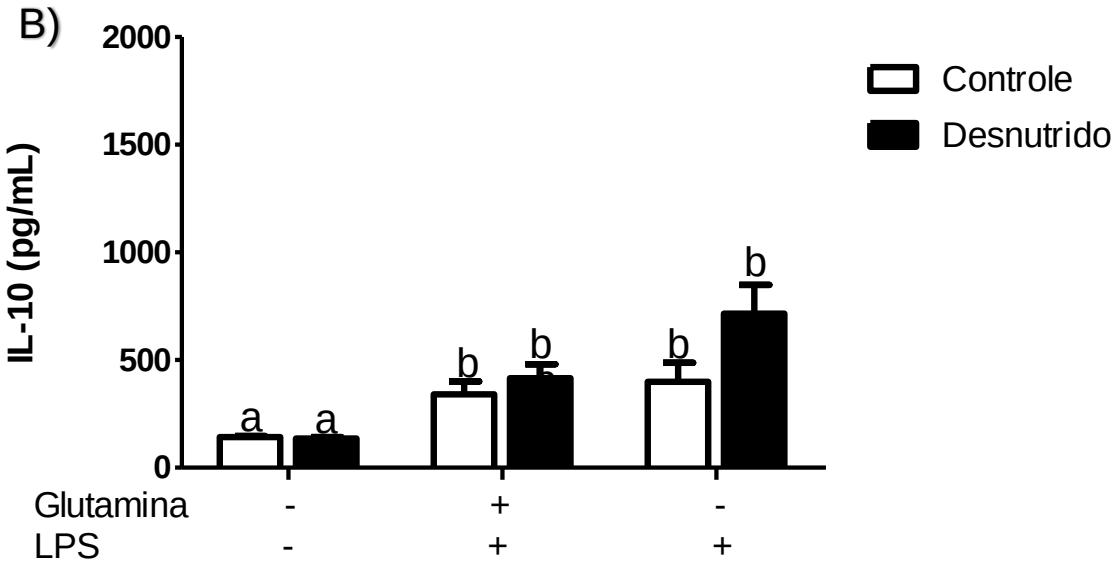


Gráfico 5. Dosagem de TNF-α e IL-10 no soro dos animais controle e desnutridos. (A) Dosagem de TNF-α circulante nos grupos estimulados *in vivo* (n=4). (B) Dosagem de IL-10 circulante nos grupos estimulados *in vivo* (n=4). Resultados expressos em média e erro padrão, n representa o número de animais avaliados. Letras diferentes sobrescritas significam diferenças significativas entre os estímulos recebidos de um mesmo grupo ($p \leq 0,05$; Mann-Whitney).

4.5 EXPRESSÃO DE NF-κB E, IκBα

A expressão do NF-κB e do seu inibidor foram avaliadas em células medulares mantidas em cultura como descrito no item 3.2.9 e estimuladas com LPS pela técnica de Western Blotting, descrita no item 3.2.11.

As bandas foram quantificadas e determinou-se a relação entre as porções fosforilada e total de NF-κB (p-NF-κB/ NF-κB) **(Gráfico-6)**. De acordo com os resultados o meio suplementado com 10mM de GLUT apresenta uma diminuição significativa na razão p-NF-κB/ NF-κB em relação ao meio sem a presença de GLUT, 0mM.

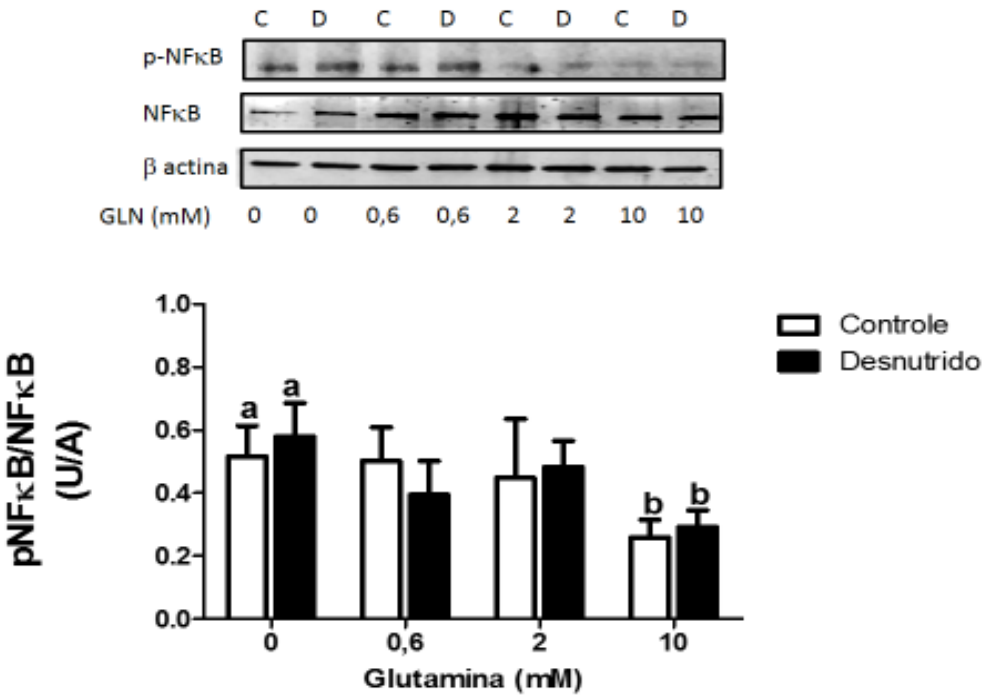


Gráfico 6. Expressão de p-NF-κB/ NF-κB em células medulares em cultura nas diferentes concentrações de GLUT e estimuladas com LPS (n=4). Resultados expressos em média e erro padrão da razão entre a porção fosforilada e total, n representa o número de animais avaliados. Letras diferentes sobrescritas significam diferenças significativas entre as concentrações de GLUT de um mesmo grupo. ($p \leq 0,05$; Mann-Whitney).

A relação entre as porções fosforilada e total de IκBα (p-IκBα/IκBα) **(Gráfico-7)** também foram determinadas depois da quantificação das bandas. Só

foi possível detectar diferença significativa no grupo controle entre as células em cultura na concentração de 2mM de GLUT e as cultivadas com meio sem GLUT, 0mM.

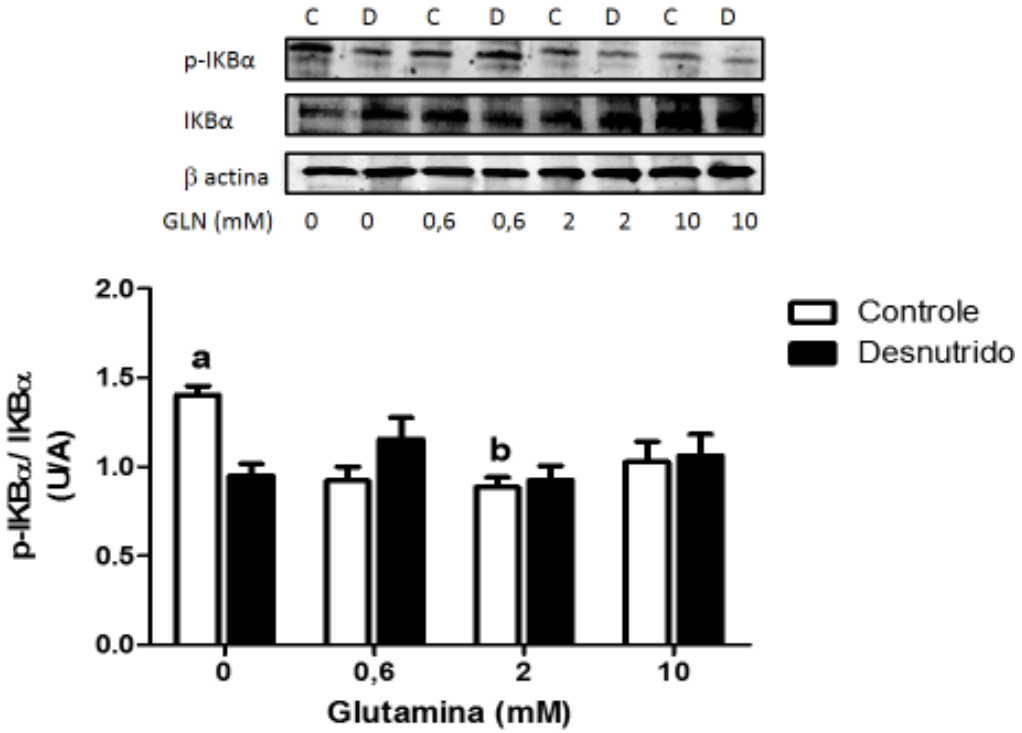


Gráfico 7. Expressão de p-IκBα/IκBα em células medulares em cultura nas diferentes concentrações de GLUT e estimuladas com LPS (n=4). Resultados expressos em média e erro padrão, n representa o número de animais avaliados. Letras diferentes sobrescritas significam diferenças significativas entre as concentrações de GLUT de um mesmo grupo (p ≤0,05; Mann-Whitney).

4.6 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada através de um ensaio com anexina e iodeto de propídio utilizando-se as células medulares em cultura com as diferentes concentrações de GLUT e com o estímulo de LPS. O perfil das populações celulares do lavado medular de camundongos dos grupos controle e desnutrido, obtidos por citometria de fluxo, encontra-se no **Gráfico 8**.

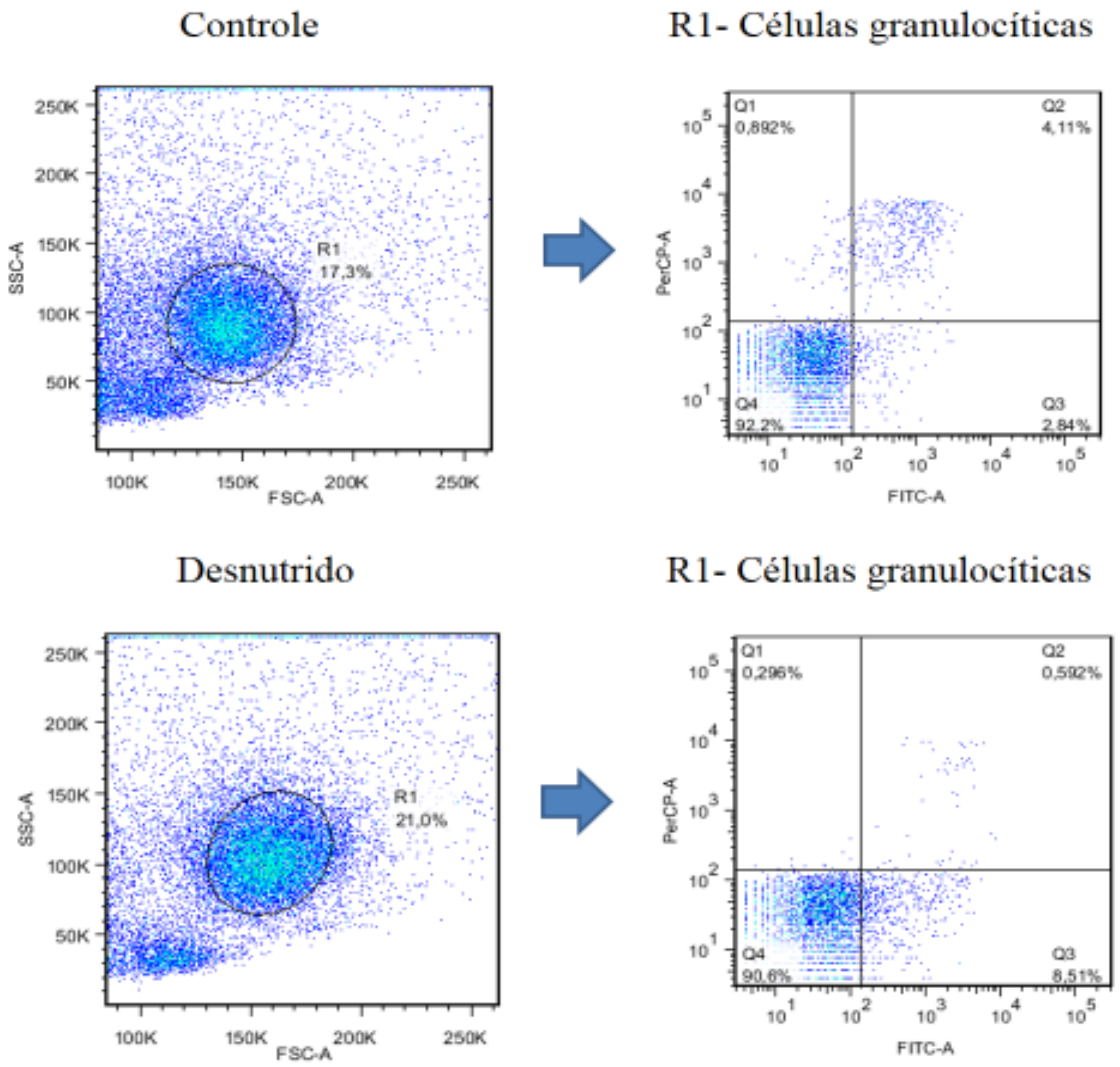


Gráfico 8. Perfil das populações das células medulares em cultura adquiridas em Citômetro de Fluxo. Representação gráfica do resultado da população total de células medulares em cultura de animais controle e desnutrido com aquisição de 50.000 eventos. Seleção do “gate” R1 representativo das células granulocíticas.

A presença de GLUT no meio de cultura não alterou significativamente a viabilidade celular das células provenientes de animais desnutridos, entretanto nas células provenientes dos animais controles destaca-se um aumento na viabilidade celular em culturas com 0,6mM de GLUT, interessante salientar que esta é a concentração presente em animais adultos saudáveis.

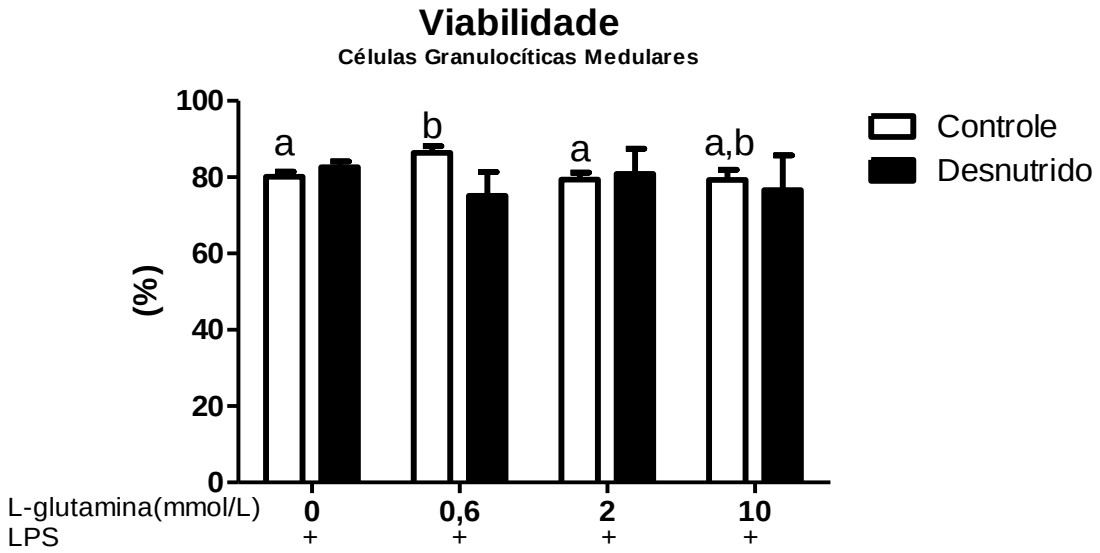
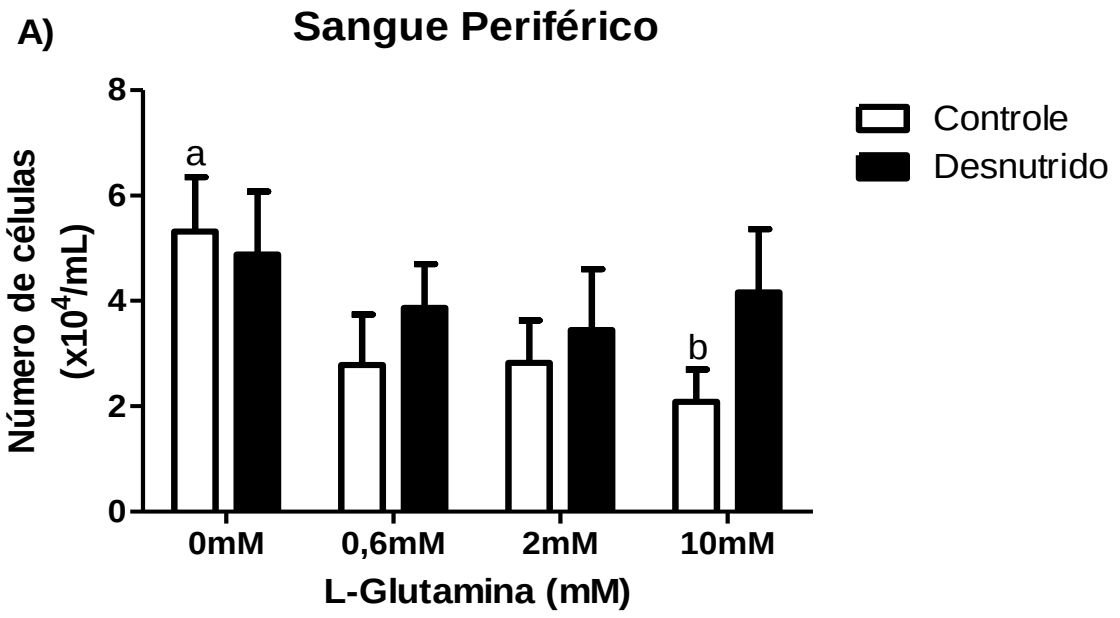


Gráfico 9. Viabilidade das células granulocíticas medulares em cultura. Porcentagem das células granulocíticas medulares viáveis em cultura com diferentes concentrações de GLUT (n=3). Resultados expressos em média e erro padrão, n representa o número de animais avaliados. Letras diferentes sobrescritas significam diferenças significativas entre as concentrações de GLUT de um mesmo grupo (p ≤0,05; Mann-Whitney).

4.7 ENSAIO DE QUIMIOTAXIA

As amostras de sangue e medula óssea foram obtidas como descrito no item 3.2.5 e 3.2.7 respectivamente e então foi realizado o isolamento de polimorfonucleares e o ensaio de quimiotaxia como descrito no item 3.2.13.

Apesar das médias do número de células que migraram nos grupos com suplementação de GLUT serem menores do que no grupo sem a GLUT, só foi encontrada diferença estatística no grupo controle entre as concentrações 0mM e 10mM, tanto nas células do SP quanto da MO. Constatando-se que a suplementação do meio com glutamina teve ação inibitória na capacidade migratória das células na concentração de 10mM.



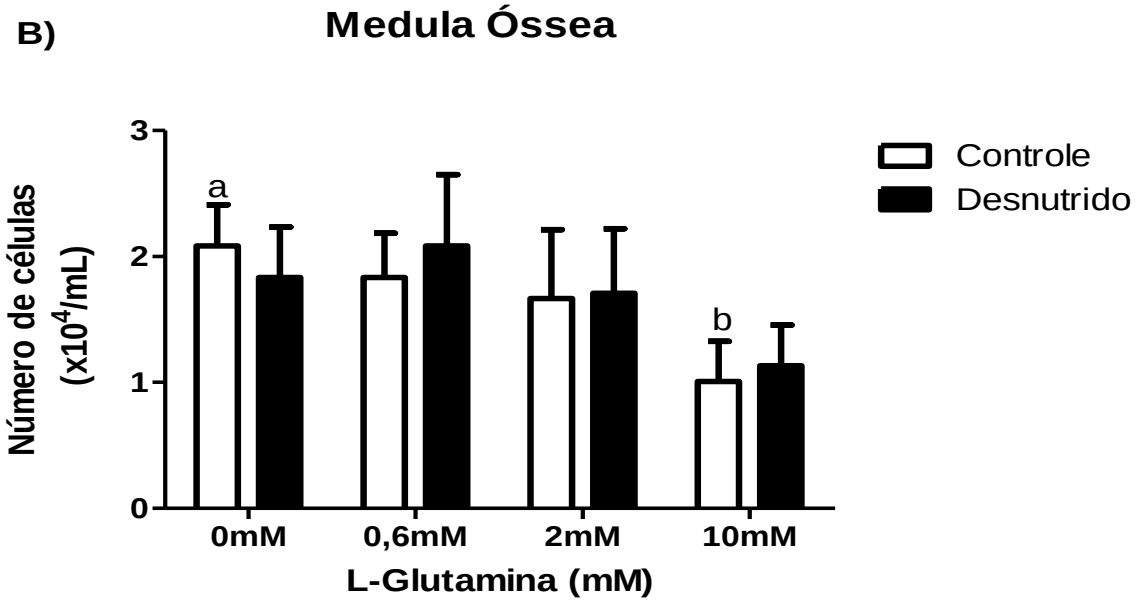


Gráfico 10. Ensaio de Quimiotaxia com polimorfonucleados do SP e MO. (A) Número de células do sangue periférico que migraram com as diferentes concentrações de glutamina (n=6) (B) Resultados representam a média da quantidade de células medulares que migraram com as diferentes concentrações de glutamina (n=6). Resultados expressos em média e erro padrão, n representa o número de animais avaliados. Letras diferentes sobrescritas significam diferenças significativas entre as concentrações de GLUT de um mesmo grupo ($p \leq 0,05$; Mann-Whitney).

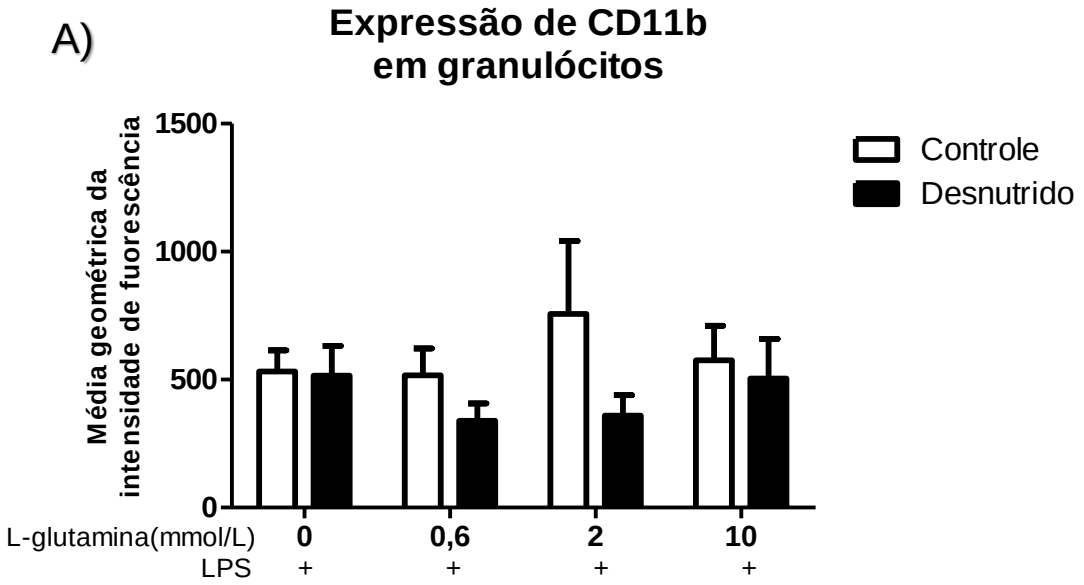
4.8 EXPRESSÃO DE CD11b/CD18

4.8.1 Em granulócitos da MO

Após o período de cultura com as diferentes concentrações de GLUT e estímulo de LPS estas células foram retiradas com o auxílio do scraper e marcadas com anticorpos anti-CD11b e anti-CD18, como descrito no item 3.2.14.

A análise da média geométrica da intensidade de fluorescência foi realizada a partir do “gate” contendo as células granulocíticas, sendo avaliado a expressão do CD11b **(Gráfico 11A)** e do CD 18 **(Gráfico 11B).**

Durante a análise estatística não foi observado diferença significativa na média geométrica da intensidade de fluorescência de ambas as moléculas de adesão, entre os grupos.



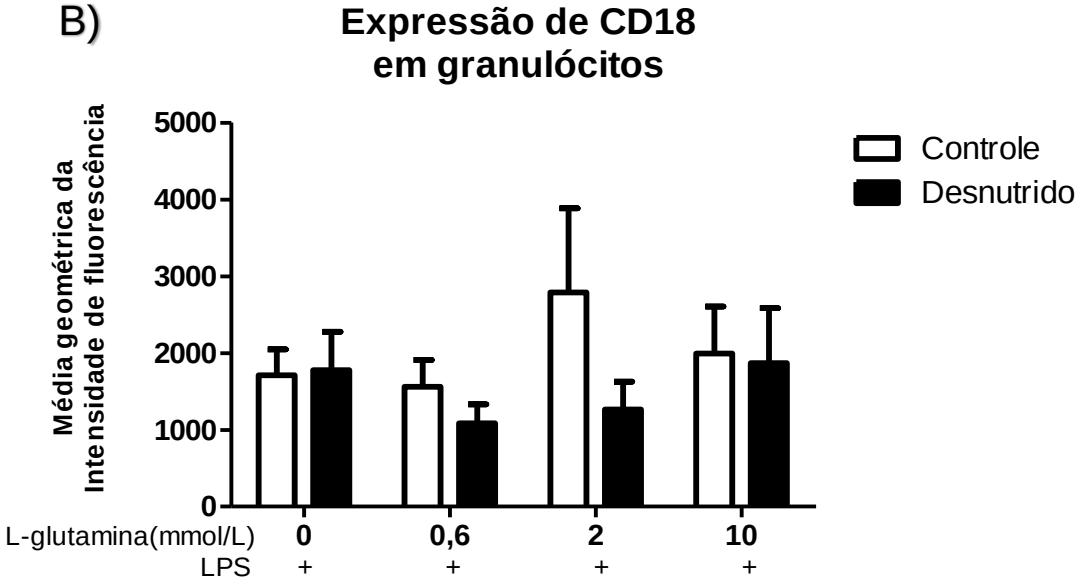


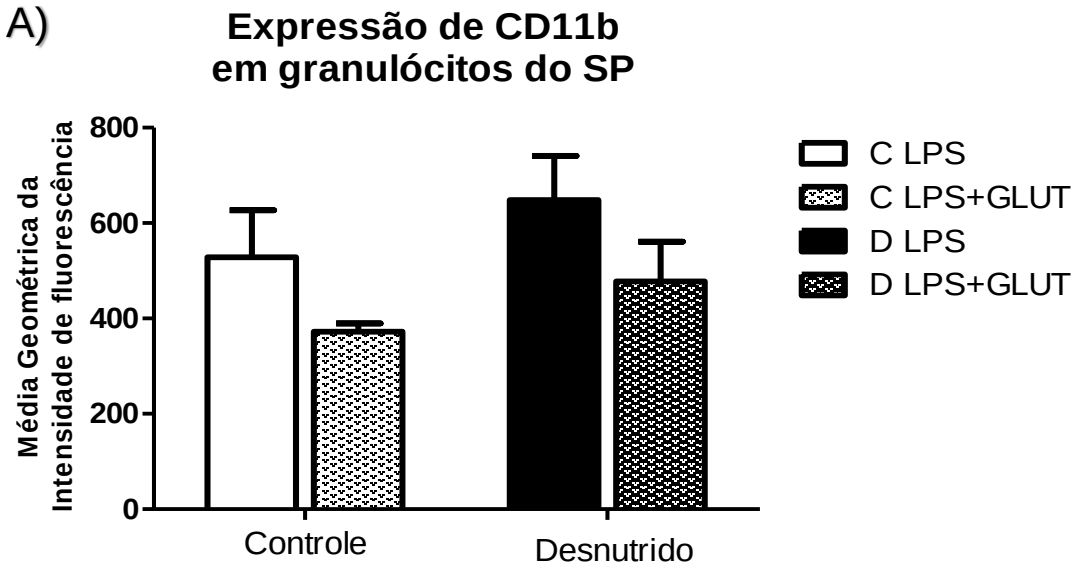
Gráfico 11. Expressão de CD11b e CD18 em granulócitos medulares. (A) Expressão de CD11b em granulócitos medulares provenientes da cultura das células do lavado da MO com as diferentes concentrações de glutamina (n=7). (B) Expressão de CD18 em granulócitos medulares provenientes da cultura das células do lavado da MO com as diferentes concentrações de glutamina (n=7). Resultados expressos em média e erro padrão, n representa o número de animais avaliados. (Mann-Whitney).

4.8.2 Em granulócitos do SP

Para realização da avaliação da expressão de CD11b e CD 18 em células do SP foram utilizados animais estimulados *in vivo,* como descrito no item 3.2.4. Os animais após receberem os estímulos foram anestesiados, tiveram o sangue coletado e então foram eutanasiados. As amostras de SP passaram pelo gradiente de Percoll, descrito no item 3.2.13 e pela lise de hemácias, descrito no item 3.2.14 e então foram marcadas com anticorpos anti-CD11b e anti-CD18, como descrito no item 3.2.14.

A análise da média geométrica da intensidade de fluorescência foi realizada a partir do “gate” contendo as células granulocíticas, sendo avaliado a expressão do CD11b **(Gráfico 12A)** e do CD 18 **(Gráfico 12B).**

No grupo controle a administração da GLUT após o estímulo de LPS não alterou significativamente a média geométrica da intensidade de fluorescência em ambas as moléculas de adesão, entretanto no grupo desnutrido constata-se que a GLUT reduziu a mesma quando avaliado em relação ao CD 18.



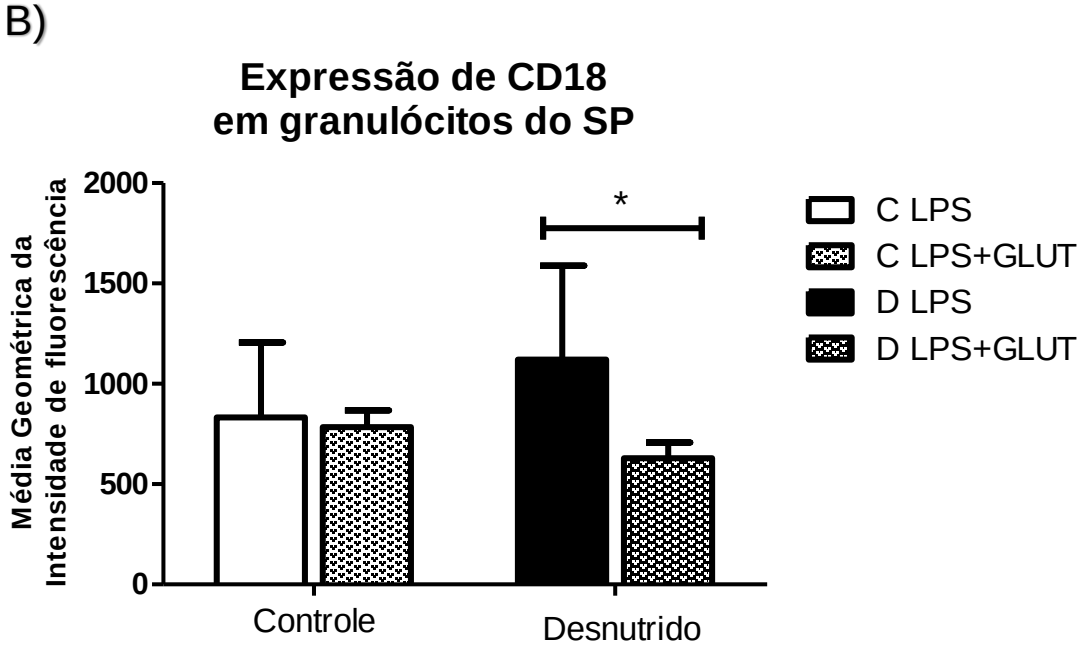


Gráfico 12. Expressão de CD11b e CD18 em granulócitos do Sangue Periférico. (A) Expressão de CD11b em granulócitos do SP provenientes de animais estimulados *in vivo* com LPS e LPS e GLUT (Controle n=3; Desnutrido n=5). (B) Expressão de CD18 em granulócitos do SP provenientes de animais estimulados *in vivo* com LPS e LPS e GLUT (Controle n=3; Desnutrido n=5). Resultados expressos em média e erro padrão, n representa o número de animais avaliados. * significa diferenças significativas entre os grupos controle e desnutrido tratados com a mesma concentração de glutamina. ($p \leq 0,05$; Mann-Whitney).

5 DISCUSSÃO

A desnutrição é globalmente um dos maiores fatores de risco para doenças e morte, afetando principalmente crianças e mulheres grávidas. Este fato se dá devido ao comprometimento da resposta imune, que inclui imunidade inata, produção de citocinas e de anticorpos (AMARE et al, 2012). Sabe-se que a deficiência de alguns nutrientes pode reduzir a função imune do hospedeiro, prejudicando a resistência do organismo às doenças e aumentando o risco de mortalidade (PAPIER et al., 2014). Alguns trabalhos demonstraram que a desnutrição provoca alterações morfofuncionais em tecidos e órgãos linfo-hematopoiéticos, essenciais para ontogenia e maturação de células imunológicas, e modifica a resposta efetora de células das imunidades inata e adaptativa, aumentando assim a susceptibilidade do indivíduo desnutrido a agentes infecciosos (BORELLI et al., 1995; VITURI et al., 2000; XAVIER et al., 2007).

Nas últimas décadas muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de desvendar a relação entre infecção/desnutrição e, embora muitos conhecimentos tenham sido obtidos, os mecanismos pelo quais esta interação ocorre, ainda não estão totalmente esclarecidos. Quanto à relação da resposta inflamatória em situações de desnutrição a literatura é um pouco controversa. O que pode ser devido aos diferentes modelos experimentais, já que grande parte destes estudos é realizada em animais e os mesmos possuem diversas características distintas, como: diferença entre as espécies, isogenicidade ou não das espécies, sexo, idade, tipos e formas de desnutrição e ainda diferentes estímulos infecciosos.

Em nosso trabalho induzimos um modelo de desnutrição proteica em camundongos BALB/c machos devido a sua característica isogênica e com a intenção de evitar flutuações hormonais provocadas pelo ciclo estral das fêmeas. Optamos por animais com cerca de dois a três meses de idade por considerar que animais adultos já tenham atingido a maturidade hematopoiética, sendo consenso que a hematopoese apresenta importantes alterações em função da idade tanto em animais quanto em humanos (BANNERMAN, 2007; FOCK, 2005).

Com o objetivo de controlar de forma mais meticulosa a composição nutricional da ração fornecida durante o período experimental, adotou-se o uso da ração produzida *in house* no lugar da ração comercial, que pode apresentar variações na sua composição de acordo com o lote fabricado.

Dados anteriores do nosso grupo permitiram a padronização do modelo murino experimental de desnutrição. Ensaios demonstraram que a variação do peso dos camundongos desnutridos foi semelhante após os períodos de cinco ou nove semanas de indução a desnutrição (dados não demonstrados) (HASTREITER, 2014). Com o intuito de otimizar o tempo experimental selecionou-se o intervalo de cinco semanas para induzir a desnutrição. Sendo que, segundo Quinn, o período de cinco semanas para o camundongo tem grandeza semelhante a dois anos para o homem (QUINN, 2005), pode-se considerar como crônica a desnutrição induzida em nosso modelo experimental.

Na literatura não há um consenso entre a vínculo entre o consumo de ração e as dietas hipoproteicas. Alguns trabalhos relataram comportamento anorético dos animais (BECK et al., 1989; MERCER et al., 1994), enquanto outros relataram o aumento do consumo (COLOMBO et al., 1992; WHITE et al., 1998; NAKAJIMA et al., 2014). Considerando que os animais consumiram quantidades semelhantes de ração, e ponderando que as rações foram formuladas e preparadas com uma composição isocalórica, pode se considerar que os camundongos estiveram submetidos a uma dieta somente de restrição proteica.

Além do consumo de ração como parâmetro nutricional, foram avaliados outros critérios com a finalidade de verificar o perfil nutricional dos animais, ao longo do período de indução da dieta os animais do grupo desnutrido perderam cerca de 18% do peso corpóreo comparando-se ao peso no primeiro dia de indução da dieta, ao passo que os animais do grupo controle ganharam uma média de 12% de peso no período supramencionado.

Por ser um reservatório de proteína no organismo o tecido muscular esquelético é sensível à desnutrição proteica. Portanto, quando há déficit no balanço nitrogenado na dieta, este tecido torna-se alvo de depleção, provocando a perda de peso verificada em indivíduos desnutridos (ALVES, *et. al*. 2008). A musculatura lisa do intestino também pode disponibilizar aminoácidos (EMERY,

2005), mas a principal fonte é proveniente do catabolismo muscular esquelético em casos de restrição proteica (HUANG; FRAKER, 2003; ALVES et al, 2008; MALAFAIA, 2010). Os aminoácidos uma vez presentes no sangue periférico são captados pelo fígado sendo utilizados na síntese proteica e/ou na gliconeogênese (CARPENTIER et al., 1982). Ademais dependendo da intensidade da desnutrição verifica-se a degradação de tecido adiposo para a sustentação do metabolismo energético (GROVER e EE, 2009), contribuindo para a perda de peso do organismo.

Conforme esperado a dieta hipoproteica administrada aos animais desnutridos reduziu significativamente as concentrações séricas de proteínas totais, albumina e pré-albumina. O nível de proteínas, entre elas, principalmente o nível da albumina está frequentemente associado ao estado nutricional e a sua diminuição é proveniente da menor biossíntese hepática, limitada ao substrato proteico restrito em casos de desnutrição (CUPPARI e KAMIMURA, 2009). Apesar dos níveis de proteínas se alterarem em outras situações como é o caso de processos inflamatórios (TAPPENDEN et al, 2013), ao levar em consideração a associação da perda de cerca de 18% do peso corpóreo, ingestão diária de proteína juntamente com a redução de proteínas totais, albumina e pré-albumina e ainda dados do hemograma tem-se bons indicadores da instalação da DP no modelo experimental.

Em relação aos dados hematológicos, os animais do grupo desnutrido apresentaram-se leucopênicos e anêmicos, além de terem comprometimento medular em relação ao grupo controle.

Os resultados dos leucogramas dos animais desnutridos mostraram uma diminuição quantitativa significativa de leucócitos, que foi caracterizada num menor valor absoluto de linfócitos, neutrófilos e monócitos circulantes no sangue periférico, entretanto nenhuma alteração qualitativa foi identificada. Esta leucopenia pode comprometer tanto a imunidade inata, quanto a adquirida, conforme descrito em trabalhos anteriores do nosso grupo (FOCK et al, 2007, 2010; LIMA, 2013).

O quadro anêmico foi caracterizado pela redução do número de hemácias com consequente redução na porcentagem do volume do hematócrito e pela

baixa concentração de hemoglobina. Dados de nosso laboratório demonstram que a anemia provocada pela DP é hipoproliferativa, com redução no número de reticulócitos (BORELLI et al., 2009), baixa responsividade à eritropoetina (BORELLI et al., 2007) e com um maior número de células tronco hematopoiéticas em fase G0 do ciclo celular (NAKAJIMA, 2010). O número de plaquetas foi semelhante nos dois grupos avaliados e está de acordo com dados da literatura descritos desde 1978 (FRIED et al., 1978).

Observou-se também que os animais estimulados com LPS e/ou GLUT não apresentaram alterações significativas no eritrograma, já na série leucocitária constatou-se que animais estimulados com LPS apresentam uma redução no número de leucócitos, consequentemente com a diminuição de todas as séries leucocitárias no SP. Esta redução dos leucócitos pode ser ocasionada pelo aumento da migração destas células para tecidos, como o pulmão (FOCK, 2005). Após 30 a 90 minutos do estímulo de LPS aumenta-se a produção de IL-1 e TNFα, que por sua vez levam a ativação de diversas cascatas inflamatórias, incluindo outras citocinas, espécies reativas de oxigênio, mediadores de lipídios, além de aumentar as moléculas de adesão que resultam em uma maior migração celular para os tecidos (COHEN, 2002).

Quando comparado o grupo em que foi administrado apenas a GLUT com o que não recebeu estímulo, Sham, não se observa efeito algum, no entanto quando comparados os grupos apenas com estímulo de LPS e o com LPS e GLUT, constata-se que a GLUT possui capacidade de reverter, parcialmente, a leucopenia e neutropenia causada pelo LPS.

Isto posto, a hipoplasia medular observada nos grupos desnutridos corrobora as alterações hematológicas encontradas nestes animais. A redução das células nucleadas na MO induzida pela DP é resultante da baixa disponibilidade de substrato, a qual prejudica a síntese proteica essencial para a proliferação celular, ou de alterações no microambiente medular, que modulam as células tronco hematopoiéticas (BORELLI et al., 1995; VITURI et al., 2000; XAVIER et al., 2007). Na celularidade da MO não foi observado efeito decorrente da GLUT frente ao estimulo de LPS, como aquela presente no SP.

Ensaios prévios do nosso grupo demonstraram que o estímulo de LPS por 30 minutos era suficiente para a produção de citocinas e sem provocar morte celular. A avaliação da viabilidade celular das células medulares em cultura de 24horas nas diferentes concentrações de GLUT e com 30 minutos de estímulo de LPS na concentração de 1,25 µg/mL encontra-se entre 75,2-86,3% nos grupos analisados. Sendo que a maior viabilidade foi verificada no grupo Controle 0,6mM, mesma concentração observada em animais adultos saudáveis.

Sabe-se que a estimulação de células por LPS resulta na ativação da IKK, a qual promove a fosforilação do inibidor do NF-κB (IκB-α). Este fato resulta na degradação do IκB-α e, subsequentemente, na liberação e translocação do NF-κB para o núcleo, onde o NF-κB - um fator de transcrição ubíquo que regula a transcrição de diversos genes envolvidos em respostas imunes e inflamatórias - promove a ativação do gene que codifica diversas citocinas pró-inflamatórias (BEUTLER, 2003; BEUTLER et al., 2006).

Notou-se neste trabalho uma tendência na diminuição de expressão da relação de p-NFκB/NFκB em células medulares em cultura quando comparados o grupo 0mM de GLUT com os demais na presença de GLUT (0,6, 2 e 10mM). Logo há menor expressão de proteína ativa, ou seja, menor quantia de NF-κB capaz de ativar expressão gênica. Sendo que se constatou diferença significativa apenas quando comparados os grupos 0mM e 10mM de GLUT em ambos os grupos, controle e desnutrido. Semelhantemente, as células cultivas na presença de GLUT apresentaram uma tendência na diminuição da expressão da relação de p-IκBα/IκBα (ou seja, menor degradação do IκBα) do que aquelas cultivadas na ausência de GLUT, sendo encontrada diferença significativa quando comparados os grupos controle 0mM e 2mM.

Esses resultados corroboram com os dados encontrados na produção das citocinas pró-inflamatórias. Apesar da produção de TNF-α *in vitro* não ter apresentado alterações significativas entre os grupos, os níveis de IL-1α e IL-6 *in vitro* e TNF-α *in vivo* foram reduzidos na presença de GLUT. A citocina anti-inflamatória IL-10 *in vivo*, apresentou médias menores, porém sem diferença estatística quando administrado a GLUT. O que nos leva a correlacionar que a diminuição na produção das citocinas observadas pode estar diretamente

relacionada à diminuição da expressão da porção fosforilada do NF-κB (RENARD et al., 1997; FITZGERALD et al., 2007).

Esse fato pode ser explicado, em parte, pela capacidade da glutamina de aumentar intracelularmente a quantidade de GSH (glutationa reduzida) reduzindo a atividade de quinases sensíveis ao estado redox. Sendo assim, não há liberação do NF-κB para o núcleo. O NF-κB encontra-se no citoplasma celular na forma inativa devido sua associação com IκB e sendo sensível ao estado redox celular, onde pode ser fosforilado, ubiquitinado e posteriormente degradado, liberando o NF-κB para o núcleo, aonde irá se ligar a sequências especificas do DNA regulando a transcrição de diversos genes (ROTH et al., 2002; CAAMAÑO; HUNTER, 2002; LI; VERMA, 2002).

Em nosso grupo já foram encontrados resultados semelhantes, células de macrófagos peritoneais provenientes de animais desnutridos cultivadas com glutamina em concentrações de 2 ou 10 mmol/L, apresentaram redução da proteína fosforilada IκBα e diminuição da expressão de NF-κB fosforilado, bem como redução na produção de citocinas pró–inflamatórias como TNF-α e IL1-α (LIMA et al., 2013). Também em concordância com nossos resultados, Wischmeyer e colaboradores relataram que a suplementação com GLUT acima de 4 mM possui capacidade de diminuir a produção de citocinas TNF-α em células mononucleares do SP estimuladas *in vitro* com LPS (WISCHMEYER et al., 2003). Outros trabalhos demonstraram que os efeitos no pré-tratamento com glutamina nas células epiteliais do intestino humano, diminui a ativação do NF-κB e reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias (HUBERT-BURON et al., 2006) e que a glutamina diminui a produção de IL1, IL6 e IL8 e aumenta a produção de IL10 na mucosa duodenal de humanos (COEFFIER et al., 2001; 2003).

Por outro lado, Cruzat e colaboradores demonstraram, *in vivo*, que a suplementação com GLUT na forma livre ou como dipeptídio diminui a liberação de TNF-α imediatamente após o exercício físico intenso e que a razão GSH/GSSH no músculo sóleo e no fígado encontra-se aumentada (CRUZAT et al., 2009). Segundo Wallace and Keast, 1992 e Yassad et al., 1997, o aumento da secreção de IL1 e IL6 por macrófagos estimulados por LPS foi dependente da concentração extracelular de glutamina e Rogero et al., 2010, mostrou que

macrófagos peritoneais, quando estimulados com LPS e tratados com glutamina, apresentam redução na expressão das proteínas IKK-β e IκB-α, levando a um aumento da expressão do NF-κB e consequentemente aumentando também a síntese de TNF-α.

As citocinas pró inflamatórias, TNF-α e IL-1α, possuem efeitos pró-migratórios sobre os neutrófilos, sendo capaz de promover a ativação de integrinas na superfície nessas células e induzir a expressão de selectinas e ICAM-1 na superfície das células endoteliais, favorecendo assim a migração celular durante a resposta inflamatória (Wagner and Roth 2000). A migração é rigorosamente controlada por uma combinação de processos químicos, mecânicos e moleculares que permite a transição de componentes celulares do sangue para os tecidos, processo essencial para homeostasia dos tecidos (ALVES-FILHO et al., 2008).

Os ensaios de quimiotaxia apresentam uma tendência na diminuição da migração celular de polimorfonucleados em cultura provenientes tanto do SP quanto da MO, no entanto, só foi possível constatar diferença significativa entre os grupos controle 0mM e 10mM de GLUT.

Para a avaliação dos efeitos da GLUT na modulação das moléculas de adesão dos granulócitos, foi avaliada a expressão de CD11b e CD18 *in vitro* e *in vivo*. Na análise *in vitro* utilizou-se de células provenientes da MO que foram cultivadas nas diferentes concentrações de GLUT, não sendo detectado diferenças estatísticas entre os grupos para as médias geométricas de intensidade de fluorescência, tanto para CD11b quanto CD18. Para a análise *in vivo* utilizou-se de amostras de SP provenientes de animais estimulados *in vivo* com LPS e GLUT. Sendo que a administração de GLUT reduziu significativamente apenas a média geométrica de intensidade de fluorescência do CD18 em animais desnutridos.

Outros autores já relataram resultados que corroboram estes dados. Segundo Chu, o pré-tratamento com GLUT reduz o infiltrado de leucócitos devido à indução de colite (CHU et al., 2012). Um estudo realizado em camundongos com sepse por ligação cecal demonstrou que a GLUT aumenta a expressão de CD11a/CD18 em linfócitos e diminui a expressão de CD11b/CD18 em

polimorfonucleados (YEH et al., 2006). Lin descreveu que a suplementação de GLUT diminui a expressão de CD11b/CD18 após gastrectomia em rastos wistar (LIN et al., 2009). A GLUT é capaz de reduzir a expressão de CD11a/CD18 em camundongos diabéticos (TSAI et al., 2011) e em camundongos expostos ao arsênico (PAI et al., 2008).

Entretanto, em contrastes com nossos resultados, segundo Kim, a migração de células da polpa dental humana imortalizadas é aumentada de maneira dose dependente de GLUT (KIM et al., 2014). Da mesma maneira, um estudo realizado com cultura de monócitos humanos em 7 diferentes concentrações de GLUT entre 0,05 e 2mM revelou que quanto maior a concentração de GLUT maior a expressão de CD11c/CD18, CD11b/CD18 e ICAM-1/CD54 (SPITTLER et al., 1995).

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que a DP induzida acarretou em anemia, leucopenia e diminuição da celularidade medular, além de comprometer o estado nutricional dos animais.

A GLUT, *in vitro*, não comprometeu a viabilidade celular, bem como a expressão de CD11/C18, porém células de animais controles tratadas em concentrações de 10mM de GLUT apresentaram capacidade de migração reduzida. A GLUT *in vitro* foi capaz de reduzir a produção de IL-1α e IL-6, bem como a ativação da via do NF-κB.

No modelo *in vivo* animais estimulados com LPS e administrado GLUT observamos alteração na cinética de migração neutrofílica, e redução da expressão de CD18, bem como diminuição dos níveis de TNFα circulantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Básica**. 4. Elsevier, 2013. ISBN 9788535271102.

AKNER, G.; CEDERHOLM, T. Treatment of protein-energy malnutrition in chronic nonmalignant disorders. **Am J Clin Nutr**, v. 74, n. 1, p. 6-24, Jul 2001. ISSN 0002-9165 (Print).

ALCAMO, E., HACOHEN, N., SCHULTE, L.C., RENNERT, P.D., HYNES, R.O. E BALTIMORE, D. (2002). Requirement for the NF- κB family member RelA in the development of secondary lymphoid organs. **Journal of Experimental Medicine** 195, 233–244.

ALEDO, J. C. Glutamine breakdown in rapidly dividing cells: waste or investment? **Bioessays,** v. 26, n. 7, p. 778-85, Jul 2004. ISSN 0265-9247 (Print) 0265-9247.

ALVES A.P., DÂMASO A. R., DAL PAI A. R. V. , The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats, **Jornal de Pediatria** - Vol. 84, Nº 3, 2008.

ALVES, D. C. Desnutrição. In: AUGUSTO, A. L. P.; MANNARINO, I. C., et al (Ed.). **Terapia nutricional**: Editora Atheneu, 1995. p.220-229.

ALVES-FILHO, J. C. et al. THE ROLE OF NEUTROPHILS IN SEVERE SEPSIS: Shock, v. 30, n. **Suppl** 1, p. 3–9, out. 2008.

AMARE B, MOGES B, FANTAHUN B, et al. Micronutrient levels and nutritional status of school children living in Northwest Ethiopia. **Nutrition Journal**. 2012; 11:108. doi: 10.1186/1475-2891-11-108.

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

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

ASCHKENASY, A. Effects de divers mélanges acides amines sur la regenération des leukocytes chez des rats carénces en proteins, II Lymphoytes. **C. R. Soc. Biol.** v.160, p.1787–92, 1966a.

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

ATHENS, J. W., RAAB, S. O., HAAB, O. P., MAUER, A. M., ASHENBRUCKER, H., CARTWRIGHT, G. E., WINTROBE, M. M. Leukokinetic studies III. The distribution of granulocytes in the blood of normal subjects. **J. Clin. Invest.** v.40, p.159-64, 1961.

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

BAIN, L. E.; AWAH, P. K.; GERALDINE, N.; KINDONG, N. P.; SIGAL, Y.;BERNARD, N.; TANJEKO, A. T. Malnutrition in Sub-Saharan Africa: burden, causes and prospects. **Pan Afr Med J**, v. 15, p. 120, 2013.

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

BARON, R. B. Desnutrição protéico-calórica. In: BENNETT, J. C. & PLUM, F. CECIL Tratado de medicina interna, 20ed, Guanabara-Koogan, v. 1, p. 1273-7, 1997.

BECK, B.; DOLLET, J. M.; MAX, J. P. Refeeding after various times of ingestion of a low protein diet: effects on food intake and body weight in rats. **Physiol Behav**, v. 45, n. 4, p. 761-5, Apr 1989. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2780844 >.

BECKER, P.S., NILSSON, S.K., LI, Z., BERRIOS, V. M., DOONER, M. S., COOPER, C. L., HSIEH, C. C., QUESENBERRY, P. J. Adhesion receptor expression by hematopoietic cell lines and murine progenitors: modulation by cytokines and cell cycle status. **Exp Hematol.** v.27, p. 533-41, 1999.

BEISEL, W. R. Metabolic effects of infection. Prog. **Food. Nutr. Sci**. v.8, p.43-75, 1984.

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

BEUTLER, B.; JIANG, Z.; GEORGEL, P.; CROZAT, K.; CROKER, B.; RUTSCHMANN, S.; DU, X.; HOEBE, K. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. **Annu Rev Immunol**, v. 24, p. 353-89, 2006. ISSN 0732-0582 (Print) 0732-0582.

BEUTLER, B. Science review: key inflammatory and stress pathways in critical illness - the central role of the Toll-like receptors. **Crit Care**, v. 7, n. 1, p. 39-46, Feb 2003. ISSN 1364-8535 (Print) 1364-8535.

BEUTLER, B., RIETSCHEL, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nat Rev Immunol**. v. 3, p. 169-76, 2003.

BHAN, M. K.; BHANDARI, N.; BAHL, R. Management of the severely malnourished child: perspective from developing countries. **Bmj**, v. 326, n. 7381, p. 146-51, Jan 18 2003. ISSN 0959-535x.

BHUTTA, Z. A.; SALAM, R. A. Global Nutrition Epidemiology and Trends. **Annals Of Nutrition And Metabolism.** p. 19-27, 2013.

BORELLI, P., BARROS, F. E., NAKAJIMA, K., BLATT, S. L., BEUTLER, B., PEREIRA, J., TSUJITA, M., FAVERO, G. M., FOCK, R. A. Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. **Braz J Med Biol Res**. v.42, p.523-30, 2009.

BORELLI, P., MARIANO, M., BOROJEVIC, R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflamatory reactions in mice. **Nutrition Research**. v.15, p.1477-85, 1995.

BORELLI, P.; BLATT, S.; PEREIRA, J.; MAURINO, B. B.; TSUJITA, M.; SOUZA, A. C.; XAVIER, J. G.; FOCK, R. A. Reduction Of Erythroid Progenitors In Protein Energy Malnutrition. **Brit J Nut**, 97: 307-314, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, V. 72, P. 248-54, MAY 7 1976. ISSN 0003-2697 (PRINT) 0003-2697.

BROSNAN, J. T. Interorgan amino acid transport and its regulation. **J Nutr**, v. 133, n. 6 Suppl 1, p. 2068s-2072s, Jun 2003. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166.

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

CAAMANO, J; HUNTER, CA. NF-êB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. **Clinical Microbiology**. Reviews, v.15, p.414-28, 2002.

CALDER, P. C.; YAQOOB, P. Glutamine and the immune system. **Amino Acids**, v. 17, n. 3, p. 227-41, 1999. ISSN 0939-4451 (Print) 0939-4451.

CARPENTIER, Y. A.; BARTHEL, J.; BRUYNS, J. Plasma protein concentration in nutritional assessment. **Proc Nutr Soc**, v. 41, n. 3, p. 405-17, Sep 1982. ISSN 0029-6651 (Print) 0029-6651.

CASSATELLA, M., MEDA, L., BONORA, S., CESKA, M., CONSTATIN, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1b in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. **J. Exp. Med**. v.178, p.2207-11, 1993

CASTELL, L. M.; NEWSHOLME, E. A. The relation between glutamine and the immunodepression observed in exercise. **Amino Acids**, v. 20, n. 1, p. 49-61, 2001.ISSN 0939-4451 (Print) 0939-4451.

CATCHATOURIAN, R., ECKERLING, G., FRIED, W. Effect of short term protein deprivation on hemopoietic functions of healthy volunteers. **Blood.** v.55, p.625–8, 1980.

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

CHANDRA, R. K. Food antibodies in malnutrition. **Arch. Dis. Child**. v.50, p.532-4, 1975.

CHANDRA, R. K. Nutrition as a critical determinant in susceptibility to infection. **World Rev. Nutr. Diet.** v.25, p.166–88, 1976.

CHU C-C, Hou Y-C, Pai M-H, Chao C-J, Yeh S-L. Pretreatment with alanyl-glutamine suppresses T-helper-cell-associated cytokine expression and reduces inflammatory responses in mice with acute DSS-induced colitis. **J Nutr Biochem**. 2012 Sep;23(9):1092–9.

COEFFIER M, Miralles-Barrachina O, Le Pessot F, Lalaude O, Daveau M, Lavoinne A, Lerebours E, Déchelotte P. Influence of glutamine on cytokine production by human gut in vitro. **Cytokine**. 13(3):148-54, 2001.

COEFFIER, M.; MARION, R.; DUCROTTE, P.; DECHELOTTE, P. Modulating effect of glutamine on IL1 beta-induced cytokine production by human gut. **Clinical Nutrition**, v.22, p.407-13, 2003.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885–891, 19 dez. 2002.

COLOMBO, J. P.; CERVANTES, H.; KOKOROVIC, M.; PFISTER, U.; PERRITAZ, R.Effect of different protein diets on the distribution of amino acids in plasma, liver and brain in the rat. **Ann Nutr Metab**, v. 36, n. 1, p. 23-33, 1992. ISSN 0250-6807 (Print) 0250-6807 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1590669>.

CORREIA, M. I.; HEGAZI, R. A.; HIGASHIGUCHI, T.; MICHEL, J. P.; REDDY, B. R.; TAPPENDEN, K. A.; UYAR, M.; MUSCARITOLI, M. Evidence-based recommendations for addressing malnutrition in health care: an updated strategy from the feedM.E. Global Study Group. **J Am Med Dir Assoc**, v. 15, n. 8, p. 544-50, Aug 2014. ISSN 1525-8610.

COSIO F. Adhesion molecules and the kidney in health and disease**. J Nephrol**.; p.6: 22-32, 1993.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., ROBBINS, S. L. Environmental and Nutrition Disease. In: Pathologic Basis of the Disease. 5ed., **W. B. Saunders**, p.403-57, 2000.

COURTOIS, G.; GILMORE, T. D. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6831-43, Oct 30 2006. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232.

CRUZAT VF, Tirapegui J. Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. **Nutrition**. 428-35, 2009.

CUPPARI, L.; KAMIMURA, M. Avaliação nutricional na doença renal crônica: desafios na prática clínica. **J Bras Nefrol**, v. 31, p. 28-35, 2009.

CURI, R.; LAGRANHA, C. J.; DOI, S. Q.; SELLITTI, D. F.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T. C.; CORLESS, M.; NEWSHOLME, P. Molecular mechanisms of glutamine action. **J Cell Physiol**, v. 204, n. 2, p. 392-401, Aug 2005. ISSN 0021-9541 (Print) 0021-9541.

DA SILVA LIMA, F.; ROGERO, M. M.; RAMOS, M. C.; BORELLI, P.; FOCK, R. A. Modulation of the nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) signalling pathway by glutamine in peritoneal macrophages of a murine model of protein malnutrition**. Eur J Nutr**, v. 52, n. 4, p. 1343-51, Jun 2013. ISSN 1436-6215 (Electronic) 1436-6207 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22923035 >.

De ANGELIS, R. C. Desnutrição calórico-protéica (Má nutrição calórico-protéica). In: **Fisiologia da nutrição.** 3ed. São Paulo, Nobel, 2v., p.38-56, 1986.

De la FUENTE, M., MUNOZ, M. L. Impairment of phagocytic process in macrophages from young and old mice by protein malnutrition. **Ann. Nutr. Metab**. v.36, p.41-7, 1992.

DELGADO, A. F. et al. Hospital Malnutrition and Inflammatory Response in Critically Ill Children and Adolescents Admitted to a Tertiary Intensive Care Unit. **Clinics.** p. 357-362, 2008.

DELVES, P. J.; MARTIN, S. J.; BURTON, D. R.; ROITT, I. M. Roitt's Essencial **Immunology**. 12. Wiley-Blackwell, 2011.

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

DOUMAS, B. T.; WATSON, W. A.; BIGGS, H. G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green. **Clin Chim Acta**, v. 31, n. 1, p. 87-96, Jan 1971. ISSN 0009-8981 (Print) 0009-8981 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5544065 >.

EAGLE, H.; OYAMA, V.I.; LEVY, M. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v.218, p.607-617, 1956.

EGGLETON, P. Separation of cells using free flow electrophoresis, in: Fisher, D., Francis, G.E., Rickwood D. (Eds.), **Cell Separation**. Oxford University Press, Oxford, pp. 213–252, 1998.

EHRENSVARD, G., Fischer, A. & Stjernholm, R. (1949) Protein metabolism of tissue cells in vitro. The chemical nature of some obligate factors of tissue cell nutrition. **Acta Physiol. Scand.** 18:218.

EMERY P.W.. Metabolic changes in malnutrition. **Eye** (2005) 19, 1029–1034. doi:10.1038/sj.eye.6701959.

FAO. The FAO Hunger Map 2014. < http://www.fao.org/hunger/en/> Acesso em 30/10/2014.

FAO. The State of Food Insecurity in the World 2015. <http://www.fao.org/hunger/glossary/en/> Acesso em 30/10/2015.

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

FITZGERALD, D. C.; MEADE, K. G.; MCEVOY, A. N.; LILLIS, L.; MURPHY, E. P.;MACHUGH, D. E.; BAIRD, A. W. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases nuclear factor kappaB (NFkappaB) activity in and interleukin-8 (IL-8) release from bovine mammary epithelial cells**. Vet Immunol Immunopathol**, v. 116, n. 1-2, p. 59-68, Mar 15 2007. ISSN 0165-2427 (Print) 0165-2427.

FOCK, R. A., BLATT, S. L., BEUTLER, B., PEREIRA, J., TSUJITA, M., DE BARROS, F. E., BORELLI, P. Study of lymphocyte subpopulations in bone marrow in a model of protein-energy malnutrition. **Nutrition**. v. 26, p. 1021-1028, 2010.

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

FOCK, R. A.; ROGERO, M. M.; VINOLO, M. A.; CURI, R.; BORGES, M. C.; BORELLI,P. Effects of protein-energy malnutrition on NF-kappaB signalling in murine peritoneal macrophages. **Inflammation**, v. 33, n. 2, p. 101-9, Apr 2010. ISSN 1573-2576 (Electronic) 0360-3997 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19876726>.

FOCK, R. **Avaliação de aspectos da resposta inflamatória desencadeada pelo lipopolissacarídeo (LPS) em desnutrição protéica experimental. Quantificação dos receptores de LSP (CD14/TLR-4) e do fator de transcrição NFkB**. 2005. 218 (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Área de Análises Clínicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FRANCISCHETTI, IEDA; MORENO, JOSÉ BITU; SCHOLZ, MARTIN E YOSHIDA, WINSTON BONETTI. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão**. Rev Bras Cir Cardiovasc** [online]. 2010, vol.25, n.4, pp. 575-584. ISSN 0102-7638. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-76382010000400023.

FRIED, W., SHAPIRO, S., BARONE, J., ANAGNOST, A. Effect of protein deprivation on hematopoietic Stem Cells and on peripheral blood counts. **J. Lab. Clin. Med**. v.92, p.303–10, 1978.

FRISINA, J. et al. Effects of Acute Exercise on Lymphocyte Subsets and Metabolic Activity. **International Journal of Sports Medicine**, v. 15, n. 01, p. 36–41, jan. 1994.

FRUHMAN, G. J. Extravascular mobilization of neutrophils. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v.113, p.968-1002, 1964.

FUJIHARA, M., MUROI, M., TANAMOTO, K. SUZUKI, T., AZUMA, H., IKEDA, H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex**. Pharmacol. & Therapeuties.** v.100, p.171-94, 2003.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J Biol Chem,** v. 177, n. 2, p. 751-66, Feb 1949. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18110453>.

GOYAL, H. K., KAUSHIK, S. K., DHAMIEJA, J. P., SUMAN, R. K., KUMAR, K. K. A study of granulocyte adherence in protein calorie malnutrition**. Indian Pediatr.** v.18, p.287-92, 1981.

GRIVENNIKOV, S.; KARIN, E.; TERZIC, J.; MUCIDA, D.; YU, G. Y.; VALLABHAPURAPU, S.; SCHELLER, J.; ROSE-JOHN, S.; CHEROUTRE, H.; ECKMANN, L.; KARIN, M. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. **Cancer Cell**, v. 15, n. 2, p. 103-13, Feb 3 2009. ISSN 1535-6108.

GROSS, R. L., NEWBERNE, M. P. Role of nutrition in immunologic function. **Physiol. Rev.** v.60, p.188–302, 1980.

GROVER, Z.; EE, L. C. Protein energy malnutrition. **Pediatr Clin North Am**, v. 56, n. 5, p. 1055-68, Oct 2009. ISSN 0031-3955.

HAMILTON, C.; BOYCE, V. J. Addressing malnutrition in hospitalized adults. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 37, n. 6, p. 808-15, Nov 2013. ISSN 0148-6071 (Print)0148-6071.

HARDIE, D. G. AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism**. Int J Obes (Lond),** v. 32 Suppl 4, p. S7-12, Sep 2008. ISSN 0307- 0565.

HASTREITER, A. A. **Avaliação de aspectos regulatórios da hematopoese em desnutrição proteico-energética experimental: papel das células endoteliais derivadas das células tronco mesenquimais medulares**. 2014. 103 Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Área de Análises Clínicas, Universidade de São Paulo.

HEEMANN, U.W. Early events in acute allograft rejection: leukocyte/endothelial cell interactions. **Clin Transplant.**p.7: 82-89, 1993.

HUANG, Z. L.; FRAKER, P. J. Chronic consumption of a moderately low protein diet does not alter hematopoietic processes in young adult mice. **J Nutr**, v. 133, n. 5, p. 1403-8, May 2003. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730429>.

HUBERT-BURON, A.; LEBOND, J.; JACQUOT, A.; DUCROTTE, P.; DECHELOTTE, P.; COEFFIER, M. Glutamine pretreatment reduces IL-8 production in human intestinal epithelial cells by limiting LkappaB-alpha ubiquitination. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 1461-1465, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável. Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão 2010.

IMHOF, B.A., DUNON, D. Leukocyte migration and adhesion. **Adv Immunol**. 1995; 58: 345-416.

JAYARAJAN, S., DALY, J. M. The Relationships of Nutrients, Routes of Delivery, and Immunocompetence. **Surgical Clinics Of North America**. p. 737-753, 2011.

JOBIN, C.; HOLT, L.; BRADHAM, C. A.; STREETZ, K.; BRENNER, D. A.; SARTOR, R. B. TNF receptor-associated factor-2 is involved in both IL-1 beta and TNF-alpha signaling cascades leading to NF-kappa B activation and IL-8 expression in human intestinal epithelial cells. **J Immunol**, v. 162, n. 8, p. 4447-54, Apr 15 1999. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.

JONES, K. D.; THITIRI, J.; NGARI, M.; BERKLEY, J. A. Childhood malnutrition: toward an understanding of infections, inflammation, and antimicrobials. **Food Nutr Bull**, v. 35, n. 2 Suppl, p. S64-70, Jun 2014. ISSN 0379-5721 (Print) 0379-5721.

KEUSCH, G. T. Nutrition and infection. In: SHILS, M. E., OLSON, J. A., SHIKE, M. **Modern nutrition in health diseases.** Lea & Febiger. v.2, p.1241-58, 1994.

KEUSCH, G. T., FARTHING, M. J. G. Nutrition and infection. **Ann. Ver. Nutr.** v.6, p.131-54, 1986.

KIM D-S, JUE S-S, LEE S-Y, KIM Y-S, SHIN S-Y, KIM E-C. Effects of glutamine on proliferation, migration, and differentiation of human dental pulp cells. **J Endod**. 2014 Aug;40(8):1087–94.

KIM, H. Glutamine as an immunonutrient. **Yonsei Med J**, v. 52, n. 6, p. 892-7, Nov 2011. ISSN 0513-5796.

KOMATSU,W.; MAWATARI K.; MIURA Y.; YAGASHAKI K.; Restoration by dietary glutamine of reduced tumor necrosis factor production in a low-protein-diet-fed rat model. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 71 (2) 352-357, 2007.

KRAFT, M. D.; BTAICHE, I. F.; SACKS, G. S. Review of the refeeding syndrome. **Nutr Clin Pract,** v. 20, n. 6, p. 625-33, Dec 2005. ISSN 0884-5336 (Print) 0884-5336.

KRAWINKEL, M. Kwashiorkor is still not fully understood**. Bull World Health Organ,** v. 81, n. 12, p. 910-1, 2003. ISSN 0042-9686 (Print) 0042-9686.

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

LI Q.; VERMA I.M. NFKappaB regulation in the immune system. **Nat Rev Immunol**. 2002 Oct; 2(10) :725-34.Review.Erratum in: Nature Review Immunology, v.2, p. 975, 2002.

LI, P.; YIN, Y.L.; LI, D.; KIM.S.W.; WU.G.; Amino acids and immune function. Britsh **Journal of Nutrition,** v.98, p.237-252,2007.

LIMA, A. L.; SILVA, A. C.; KONNO, S. C.; CONDE, W. L.; BENICIO, M. H.;MONTEIRO, C. A. Causes of the accelerated decline in child undernutrition in Northeastern Brazil (1986-1996-2006). **Rev Saude Publica**, v. 44, n. 1, p. 17-27, Feb2010. ISSN 0034-8910.

LIMA, F. **Modulação da glutamina sobre a via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF-kB) em macrófagos peritoniais em um modelo murínico de desnutrição protéica**. 2011. 72 Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciencias Farmacêuticas - Departamento de Análises Clínicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LIMA, F. S., ROGERO M. M., RAMOS, M. C., BORELLI, P., FOCK, R.A. Modulation of the nuclear factor-kappa B (NF-jB) signalling pathway by glutamine in peritoneal macrophages of a murine model of protein malnutrition. **European Journal Of Nutrition**. 2013.

LIN M-T, CHOU S-Y, TSOU S-S, WANG M-Y, WU M-H, YEH S-L. Effects of parenteral glutamine supplementation on modulating the immune response in rats undergoing a total gastrectomy. **Br J Nutr**. 2009 Aug;102(4):520–5.

LIU, Y.; DONG, W.; CHEN, L.; XIANG, R.; XIAO, H.; DE, G.; WANG, Z.; QI, Y.BCL10 mediates lipopolysaccharide/toll-like receptor-4 signaling through interaction with Pellino2. **J Biol Chem**, v. 279, n. 36, p. 37436-44, Sep 3 2004. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

LOO, J.C., XIAO X, MCMILLIN D, HASHINO K, KATO I, WILLIAMS DA. VLA-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin. **J Clin Invest.** Sep 1;102(5):1051-61, 1998.

MALAFAIA G.; MARTINS R. F.; SILVA M. E; Avaliação dos Efeitos, em Curto Prazo, da Deficiência Protéica nos Parâmetros Físicos e Bioquímicos de camundongos Swiss. **REB** Volume 3 (1): 65-83, 2010. ISSN 1983-7682.

MALONE, A.; HAMILTON, C. The Academy of Nutrition and Dietetics/the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition consensus malnutrition characteristics: application in practice. **Nutr Clin Pract**, v. 28, n. 6, p. 639-50, Dec 2013. ISSN 1941-2452 (Electronic) 0884-5336 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24177285 >

MARCOS, A. Eating disorders: a situation of malnutrition with peculiar changes in the immune system. **Eur J Clin Nutr**, v. 54 Suppl 1, p. S61-4, Mar 2000. ISSN 0954-3007 (Print) 0954-3007.

MERCER, L. P.; KELLEY, D. S.; HUMPHRIES, L. L.; DUNN, J. D. Manipulation of central nervous system histamine or histaminergic receptors (H1) affects food intake in rats. **J Nutr**, v. 124, n. 7, p. 1029-36, Jul 1994. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7913125 >.

METSCHNIKOFF, M. E. Sur la lutte des cellules de 1'organism contre 1'invasion des microbes. **Ann. Inst. Pasteur**. v.1, p.332-6, 1887.

MOK, E., HANKARD, R. Review Article Glutamine Supplementation in Sick Children: Is It Beneficial? **Journal Of Nutrition And Metabolism**. p. 1-41, 2011.

MONTEIRO, C. A. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. Estudos Avançados, v. 17, n. 48, p. 7-20, 2003. ISSN 0103-4014.

NAKAJIMA, K.; CRISMA, A. R.; SILVA, G. B.; ROGERO, M. M.; FOCK, R. A.;BORELLI, P. Malnutrition suppresses cell cycle progression of hematopoietic progenitor cells in mice via cyclin D1 down-regulation. **Nutrition**, v. 30, n. 1, p. 82-9, Jan 2014. ISSN 1873-1244 (Electronic) 0899-9007 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24290603 >.

NAKAJIMA, K. **Avaliação do ciclo celular de células-tronco/progenitoras hemopoéticas de medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica**. 2010. 170f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

NARDINELLI, L. & BORELLI, P. Protein calorie-malnutrition a decreased in the macrophage's respiratory burst capacity. **Rev. Bras. Cienc**. Farm. v.37, p.51-60, 2001.

NEWSHOLME P, LIMA MMR, PROCOPIO J, PITHON-CURI TC, DOI SQ, BAZOTTE RB, et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Braz J Med Biol Res**. 2003a Feb;36(2):153–63.

NEWSHOLME, P. et al. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: its importance in health and disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, n. 6, p. 316–324, jun. 1999.

NEWSHOLME, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? **Journal of Nutrition**, v.131, p.2515S-2522S, 2001.

NOVA, E.; SAMARTIN, S.; GOMEZ, S.; MORANDE, G.; MARCOS, A. The adaptive response of the immune system to the particular malnutrition of eating disorders. **Eur J Clin Nutr,** v. 56 Suppl 3, p. S34-7, Aug 2002. ISSN 0954-3007 (Print) 0954-3007.

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

PAI M-H, CHIEN Y-W, TSAI Y-H, HU Y-M, YEH S-L. Glutamine reduces the expression of leukocyte integrins leukocyte function-associated antigen-1 and macrophage antigen-1 in mice exposed to arsenic. **Nutr Res**. 2008 Aug;28(8):544–9.

PAPIER, K.; WILLIAMS, G. M.; LUCERES-CATUBIG, R.; AHMED, F.; OLVEDA, R. M.; MCMANUS, D. P.; CHY, D.; CHAU, T. N.; GRAY, D. J.; ROSS, A. G. Childhood malnutrition and parasitic helminth interactions. **Clin Infect Dis**, v. 59, n. 2, p. 234-43, Jul 15 2014. ISSN 1058-4838.

PERKINS, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 8, n. 1, p. 49-62, Jan 2007. ISSN 1471-0072 (Print) 1471-0072.

PETERSEN, A. M., PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Appl Physiol.** v.98, p. 1154-62, 2005.

POWANDA, M. C. & BEISEL, W. R. Metabolic effects of infection on protein and energy status. **J. Nutr**. v.133, p.322S-7S, 2003.

PROSPER F, STRONCEK D, MCCARTHY JB, VERFAILLIE CM. Mobilization and homing of peripheral blood progenitors is related to reversible downregulation of alpha4 beta1 integrin expression and function. **J Clin Invest**. 1998 Jun 1;101(11):2456-67.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 775-7, Jun 2005. ISSN 0899-9007 (Print) 0899-9007 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15925305 >.

REDMOND, H. P., LEON, P., LIEBERMAN, M. D., HOFMANN, K., SHOU, J., REYNOLDS, J., GOLDFINE, J., JOHNSTON, R. B., DALY, J. M. Impared macrophage function in severe protein – energy malnutrition. **Arch. Surg**. v.126, p.192–6, 1991.

REEVES, P.G., NIELSEN FH, FAHEY GC Jr. 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. **J Nutr.** 1993 Nov;123(11):1939-51.

RENARD, P.; ZACHARY, M. D.; BOUGELET, C.; MIRAULT, M. E.; HAEGEMAN, G.;REMACLE, J.; RAES, M. Effects of antioxidant enzyme modulations on interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation. **Biochem Pharmacol**, v. 53, n. 2, p. 149- 60, Jan 24 1997. ISSN 0006-2952 (Print) 0006-2952.

RIETSCHEL, E. T., SCHADE, U., JENSEN, M., WOLLENWEBER, H. W., LUDERITZ, O., GREISMAN, S. G. Bacterial endotoxins: chemical structure, biological activity and role in septicaemia. **Scand. J. Infect. Dis.** v.31, p.8-21, 1982.

RIETSCHEL, E.T., KIRIKAE T, SCHADE FU, MAMAT U, SCHMIDT G, LOPPNOW H, ULMER AJ, ZÄHRINGER U, SEYDEL U, DI PADOVA F, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB J**. 1994 Feb;8(2):217-25. Review

ROBBINS, S. L.; CONTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**. 4. Rio de Janeiro: 2003.

RODKEY, F. L. Direct Spectrophotometric Determination of Albumin in Human Serum. **Clin Chem**, v. 11, p. 478-87, Apr 1965. ISSN 0009-9147 (Print) 0009-9147 (Linking).Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14277286 >.

ROGERO MM, BORELLI P, FOCK RA, BORGES MC, VINOLO MA, CURI R, NAKAJIMA K, CRISMA AR, RAMOS AD, TIRAPEGUI J. Effects of glutamine on the nuclear factor-kappaB signaling pathway of murine peritoneal macrophages. **Amino Acids**. 2010.

ROGERO, M. M..; BORELLI, P.; FOCK, R. A.; DE OLIVEIRA PIRES, I. S.; TIRAPEGUI, J. Glutamine in vitro supplementation partly reverses impaired macrophage function resulting from early weaning in mice. **Nutrition** (Burbank, Los Angeles County, Calif.), v. 24, n. 6, p. 589–598, jun. 2008a.

ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI,J.; VINOLO, M.A.; BORGES,M.C.; CASTRO, I. A,; PIRES, I.S.O,; BORELLI, P. Dietary glutamine supplementation increases the activity of peritoneal macrophages and hemopoiesis in early-weaned mice inoculated with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 7, p. 1343–1348, jul. 2008b.

ROSEN, E., BUCHANAN, N., HANSEN, J. D. Letter: Evolution of Kwashiorkor and Marasmus. Lancet. v.4, p.458, 1974.

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

ROTH E, Oehler R, Manhart N, Exner R, Wessner B, Strasser E, Spittler A. Regulative potential of glutamine--relation to glutathione metabolism.**Nutrition**. 217-21, 2002.

ROTH, E. Immune and cell modulation by amino acids. **Clin Nutr**, v. 26, n. 5, p. 535- 44, Oct 2007. ISSN 0261-5614 (Print) 0261-5614.

ROWBOTTOM, D. G. et al. The haematological, biochemical and immunological profile of athletes suffering from the overtraining syndrome. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 70, n. 6, p. 502–509, 1995.

RUST, D. M.; SIMPSON, J. K.; LISTER, J. Nutritional issues in patients with severe neutropenia**. Semin Oncol Nurs**, v. 16, n. 2, p. 152-62, May 2000. ISSN 0749-2081 (Print) 0749-2081.

SACKS, G. S.; DEARMAN, K.; REPLOGLE, W. H.; CORA, V. L.; MEEKS, M.;CANADA, T. Use of subjective global assessment to identify nutrition-associated complications and death in geriatric long-term care facility residents. **J Am Coll Nutr**, v. 19, n. 5, p. 570-7, Oct 2000. ISSN 0731-5724 (Print) 0731-5724.

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

SCHUMANN, R. R.; LEONG, S. R.; FLAGGS, G. W.; GRAY, P. W.; WRIGHT, S. D.;MATHISON, J. C.; TOBIAS, P. S.; ULEVITCH, R. J. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. **Science**, v. 249, n. 4975, p. 1429-31, Sep 21 1990. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

SCRIMSHAW, N. S. Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection. **J. Nutr.** v.133, p. 316S-21S, 2003.

SHETTY, P. Malnutrition and Undernutrition. **Medicine**, v. 31, n. 4, p. 18–22, abr. 2003.

SMITH, R.J.; WILMORE, D.W. Glutamine nutrition and requirementes. **J. Parent. Enter. Nutr.,** 14: 94S-9S, 1990.

SPITTLER A, WINKLER S, GÖTZINGER P, OEHLER R, WILLHEIM M, TEMPFER C, et al. Influence of glutamine on the phenotype and function of human monocytes. **Blood**. 1995 Aug 15;86(4):1564–9

SPRINGER TA. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**. 1990; 346: 425-434.

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

TAPPENDEN, K. A. et al. Critical Role of Nutrition in Improving Quality of Care: An Interdisciplinary Call to Action to Address Adult Hospital Malnutrition. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics,** v. 113, n. 9, p. 1219–1237, set. 2013.

TSAI P-H, Liu J-J, Chiu W-C, Pai M-H, Yeh S-L. Effects of dietary glutamine on adhesion molecule expression and oxidative stress in mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes. **Clin Nutr.** 2011 Feb;30(1):124–9.

VANDEWALLE, A. Toll-like receptors and renal bacterial infections. **Chang Gung Med J**, v. 31, n. 6, p. 525-37, Nov-Dec 2008. ISSN 2072-0939 (Print) 2072-0939.

VITURI, C. L.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G.; BORELLI, P. Alterations in proteins of bone marrow extracellular matrix in undernourished mice. **Braz J Med Biol Res,** v. 33, n. 8, p. 889-95, Aug 2000. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10920430 >.

WAGNER, J. and R. ROTH (2000). "Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature." **Pharmacol Rev** 52: 349-374.

WAITZBERG, D. L. Nutrição enteral e parenteral na prática clínica. 3. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

WAITZBERG, D. L.; PLOPPER, C.; TERRA, R. M. Postoperative total parenteral nutrition. **World J Surg,** v. 23, n. 6, p. 560-4, Jun 1999. ISSN 0364-2313 (Print) 0364-2313.

WALLACE, C., KEAST, D. Glutamine and macrophage function. **Metabolism Clinical and Experimental**. v.41, p.1016-20, 1992

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

WHITE, B.; DEAN, R.; MARTIN, R. An association between low levels of dietary protein, elevated NPY gene expression in basomedial hypothalamus and increased food intake. **Nutritional Neurosciences**, v. 1, p. 173-182, 1998.

WHO. Global burden of protein-energy malnutrition in the year 2000. 2011. Disponível em: < http://www.who.int/healthinfo/statistics/bod_malnutrition.pdf >. Acesso em: 30/05/15.

WILLIAMS, BEUTLER, ERNEST, LEICHTMAN. A. MARSHALL; COLLER, S.; BARRY. Hematology, McGraw-Hill, p.406–15, 2001.

WISCHMEYER, P.E.; RIEHM, J.; SINGLETON, K.D.; REN, H.; MUSCH, M.W.; KAHANA, M.; CHANG, E.B. Glutamine attenuates tumor necrosis factor-alpha release and enhances heat shock protein 72 in human peripheral blood mononuclear cells. **Nutrition**. v. 19, p. 1-6, 2003.

XAVIER, J.G., FAVERO ME, 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**. Jun;22(6):651-60, 2007.

XIAO, W. Advances in NF-κB signaling transduction and transcription. **Cellular & Molecular Immunology.**1, 425–433, 2004.

YASSAD, A., LAVOINNE, A., BION, A., DAVEAU, M., HUSSON, A. Glutamine accelerates interleukin-6 production by rat peritoneal macrophages in culture. **FEBS Lett**. v.413, p.81-4, 1997.

YEH C-L, HSU C-S, YEH S-L, LIN M-T, CHEN W-J. Dietary glutamine supplementation reduces cellular adhesion molecule expression and tissue myeloperoxidase activity in mice with gut-derived sepsis. **Nutrition**. 2006 Apr;22(4):408–13.

YUNEVA, M.; ZAMBONI, N.; OEFNER, P.; SACHIDANANDAM, R.; LAZEBNIK, Y.Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. **J Cell Biol,** v. 178, n. 1, p. 93-105, Jul 2 2007. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525.

ZELIĆ M, BENDER DV, KELECIĆ DL, ZUPAN Z, CICVARIĆ T, MALDINI B, DURUT I, RAHELIĆ V, SKEGRO M, MAJEROVIĆ M, PERKO Z, SUSTIĆ A, MADZAR T, KOVACIĆ B, KEKEZ T, KRZNARIĆ Z. Croatian guidelines for perioperative enteral nutrition of surgical patients. **Liječnički vjesnik** 136:7-8 pg 179-85, 2014.

ZIEGLER, T. R.; OGDEN, L. G.; SINGLETON, K. D.; LUO, M.; FERNANDEZ-ESTIVARIZ, C.; GRIFFITH, D. P.; GALLOWAY, J. R.; WISCHMEYER, P. E. Parenteral glutamine increases serum heat shock protein 70 in critically ill patients. **Intensive Care Med,** v. 31, n. 8, p. 1079-86, Aug 2005. ISSN 0342-4642 (Print) 0342-4642.

ANEXO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

ANEXO II

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF 132013

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP) CERTIFICA que o Projeto "**Efeito da desnutrição protéica sobre aspectos da mobilização, migração e sinalização celular: Papel da glutamina na modulação desses processos**" (Protocolo CEUA/FCF/394), de responsabilidade do(a) **Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 18 de fevereiro de 2013.

São Paulo, 20 de fevereiro de 2013.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

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

ANEXO III

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF **2.2014-P394**

São Paulo, 24 de fevereiro de 2014.

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), em reunião realizada em 21 de fevereiro de 2014, **aprovou** as alterações propostas para o projeto de pesquisa "**Efeito da desnutrição protéica sobre aspectos da mobilização, migração e sinalização celular: Papel da glutamina na modulação desses processos**" (Protocolo CEUA nº 394), a saber: inclusão de pesquisadora responsável (Andressa Cristina Antunes Santos).

Cordialmente,

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Ilmo(a). Sr(a).
Andressa Cristina Antunes Santos
Orientador(a)/supervisor(a): Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock
FBC/FCF/USP

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

ANEXO IV

Composição da ração comercial CR-1 Nuvilab®

Constituintes	**Ração CR-1 Nuvilab®** (g/kg de ração)
Proteína bruta	220
Umidade	125
Material mineral	90
Matéria fibrosa	70
Gordura bruta	40

ANEXO V

Composição da mistura salínica da ração comercial CR-1 Nuvilab®

Constituintes	**Ração CR-1 Nuvilab®** (g/kg de ração)
Cálcio	12
Cobalto	0,0015
Cobre	0,01
Ferro	0,05
Fósforo	8
Flúor	0,08
Iodo	0,02
Manganês	0,06
Selênio	0,00005
Sódio	2,7
Zinco	0,06

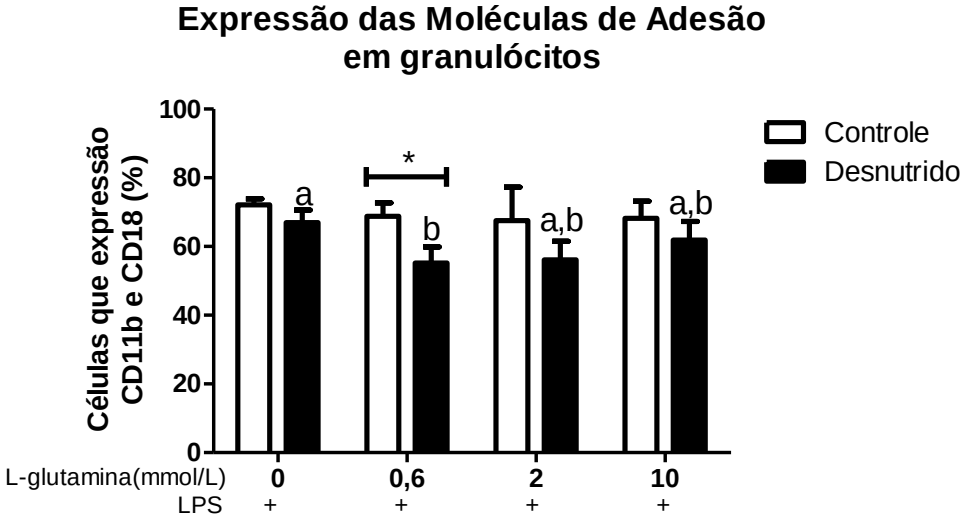
ANEXO VI

Composição da mistura vitamínica e de aminoácidos da ração comercial CR-1 Nuvilab®

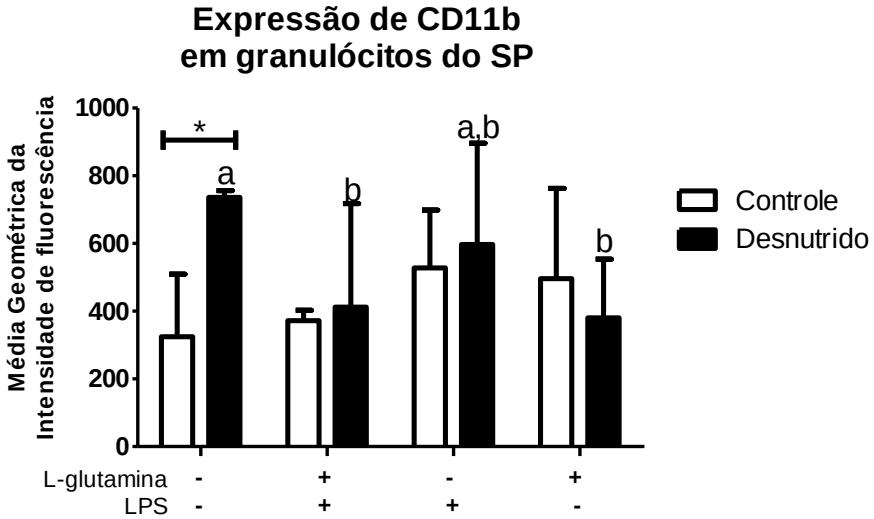
Constituinte	**Ração CR-1 Nuvilab®** (mg/kg, g/kg, UI/kg de ração)
Lisina	12g/kg
Metionina	4g/kg
Vitamina A	13000UI/kg
Vitamina B1	5mg/kg
Vitamina B2	6mg/kg
Vitamina B3	60mg/kg
Vitamina B5	20mg/kg
Vitamina B6	7mg/kg
Vitamina B7	0,05mg/kg
Vitamina B8	1900mg/kg
Vitamina B9	1mg/kg
Vitamina B12	22mg/kg
Vitamina D3	2000UI/kg
Vitamina E	34UI/kg
Vitamina K3	3mg/kg

ANEXO VII

Resultados não demonstrados (parte I)



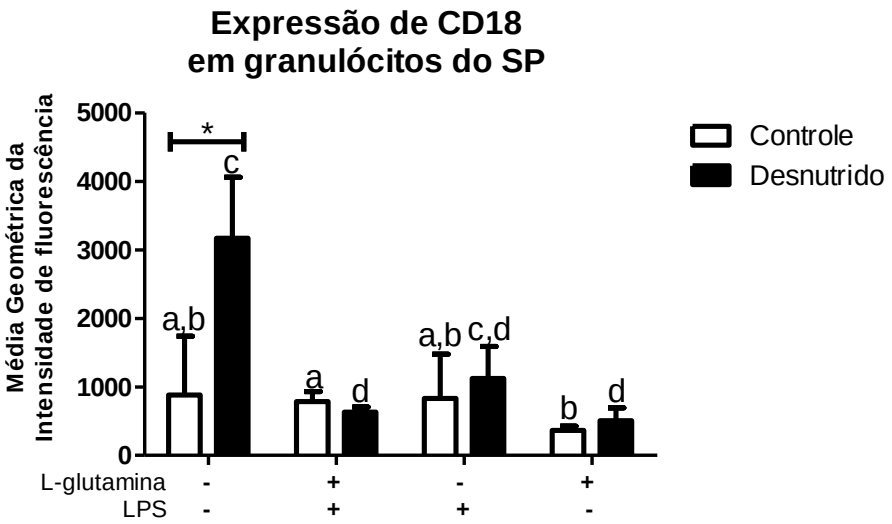
Expressão de CD11b e CD18 em granulócitos medulares. Expressão de CD11b e CD18 em granulócitos medulares provenientes da cultura das células do lavado da MO com as diferentes concentrações de glutamina (n=7). Resultados expressos em média e erro padrão, n representa o número de animais avaliados. Letras diferentes sobrescritas significam diferenças significativas entre as concentrações de GLUT de um mesmo grupo. * significa diferenças significativas entre os grupos controle e desnutrido tratados com a mesma concentração de glutamina. ($p \leqslant 0,05$; Mann-Whitney).



Média Geométrica da Intensidade de Fluorescência do CD11b em granulócitos do Sangue Periférico. Média Geométrica da Intensidade de Fluorescência do CD11b em granulócitos do SP provenientes de animais estimulados *in vivo* com LPS e/ou GLUT (Controle n=3; Desnutrido n=5). Resultados expressos em média e erro padrão, n representa o número de animais avaliados. Letras diferentes sobrescritas significam diferenças significativas entre as concentrações de GLUT de um mesmo grupo. * significa diferenças significativas entre os grupos controle e desnutrido tratados com a mesma concentração de glutamina. ($p \leqslant 0,05$; Mann-Whitney).

ANEXO VII

Resultados não demonstrados (parte II)



Média Geométrica da Intensidade de Fluorescência do CD11b em granulócitos do Sangue Periférico. Média Geométrica da Intensidade de Fluorescência do CD11b em granulócitos do SP provenientes de animais estimulados *in vivo* com LPS e/ou GLUT (Controle n=3; Desnutrido n=5). Resultados expressos em média e erro padrão, n representa o número de animais avaliados. Letras diferentes sobrescritas significam diferenças significativas entre as concentrações de GLUT de um mesmo grupo. * significa diferenças significativas entre os grupos controle e desnutrido tratados com a mesma concentração de glutamina. ($p \leqslant 0,05$; Mann-Whitney).

ANEXO VIII

Histórico escolar (parte I)

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 8720001/1 - Andressa Cristina Antunes Santos

Email:	andressaantunes@usp.br
Data de Nascimento:	10/02/1991
Cédula de Identidade:	RG - 38.926.864-1 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Biomedicina - Centro Universitário Lusíada - Fundação Lusíada - São Paulo - Brasil - 2013

Curso:	Mestrado
Programa:	Farmácia (Análises Clínicas)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	27/01/2014
Início da Contagem de Prazo:	27/01/2014
Data Limite para o Depósito:	27/07/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Ricardo Ambrosio Fock - 27/01/2014 até o presente. Email: hemato@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 27/01/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 29/01/2015
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 27/01/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula Regular em 13/07/2015

Impresso em: 17/11/2015 14:05:47

ANEXO VIII – Histórico escolar (parte II)

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 8720001/1 - Andressa Cristina Antunes Santos

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Disp.	Situação
FBC5705-4/4	Tópicos em Microscopia Quantitativa	03/02/2014	09/02/2014	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5803-3/3	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	11/03/2014	24/03/2014	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5793-12/1	Tópicos em Análises Clínicas I	11/03/2014	23/06/2014	15	1	80	A	N	Concluída
BMB5760-5/1	Metabolismo Celular e sua Regulação (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	17/03/2014	27/04/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5771-7/2	Bioinformática Aplicada às Análises Clínicas	02/06/2014	15/06/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5757-6/1	Tópicos em Análises Clínicas II	05/08/2014	17/11/2014	15	1	100	A	N	Concluída
BMB5818-2/1	Praticando Análise de Proteínas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	13/08/2014	10/09/2014	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBA5728-3/10	Aprimoramento Didático	19/08/2014	15/09/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5722-2/3	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	02/09/2014	22/09/2014	60	4	90	A	N	Concluída
BIO5788-3/1	Inglês em Ciência (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	04/03/2015	16/06/2015	120	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
BIO5726-9/3	Evolução dos Animais ao Nível de Espécie (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	11/03/2015	23/06/2015	120	8	83	A	N	Concluída
FBT5700-3/2	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	08/05/2015	09/07/2015	90	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5734-3/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	03/08/2015	09/08/2015	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5780-2/3	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/08/2015	21/09/2015	90	6	94	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	36
Estágios:			
Total:	0	25	36

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula Regular em 13/07/2015
Impresso em: 17/11/2015 14:05:47

ANEXO IX

Curriculum lattes (parte I)

Andressa Cristina Antunes Santos

Bolsista de Mestrado do CNPq

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/1448468996510591

Última atualização do currículo em 17/11/2015

Mestranda em farmácia na área de Hematologia Experimental na Universidade de São Paulo. Possui graduação em Biomedicina pelo Centro Universitário Lusíada (2012). Tem experiência na área de análises clínicas, com ênfase em hematologia, atuando em mecanismos de transcrição, inflamação e sinalização celular em um modelo de desnutrição e o papel da glutamina na modulação destes processos. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Andressa Cristina Antunes Santos

Nome em citações bibliográficas ANTUNES, A. C. P.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2014 Mestrado em andamento em Farmácia (Análises Clínicas) (Conceito CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Efeito da desnutrição proteica sobre aspectos da mobilização, migração e sinalização celular. Papel da glutamina na modulação desses processos,Orientador: Ricardo Ambrósio Fock.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Formação acadêmica/titulação

2014 Mestrado em andamento em Farmácia (Análises Clínicas) (Conceito CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Efeito da desnutrição proteica sobre aspectos da mobilização, migração e sinalização celular. Papel da glutamina na modulação desses processos,Orientador: Ricardo Ambrósio Fock.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

2009 - 2012 Graduação em Biomedicina.
Centro Universitário Lusíada, UNILUS, Brasil.
Título: Efeito protetor e antitumoral do extrato de Ganoderma lucidum em ratos induzidos ao plasmocitoma com droga carcinogênica pristane.
Orientador: Edgar Matias Bach HI.

Formação Complementar

2015 - 2015 8° Curso de Citometria de Fluxo. (Carga horária: 40h).
Instituto Adolfo Lutz, IAL, Brasil.

2010 - 2010 Microbiologia alimentar. (Carga horária: 12h).
Centro Universitário Lusíada, UNILUS, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - Atual Vínculo: Aluno de mestrado, Enquadramento Funcional: Aluno, Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional

2013 - 2013 Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 20

Outras informações Estágio na Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP em Hematologia para ingressar na pós-graduação.

ANEXO IX

Curriculum lattes (parte II)

Pref. Munic. Estância Balneária de Peruíbe, PMEBP, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - 2012 Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 30

Outras informações Estágio em análises clínicas no Pronto Socorro Municipal de Peruíbe.

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Produções

Produção bibliográfica

Apresentações de Trabalho

1. **ANTUNES, A. C. P.** ; Papel da glutamina na modulação da migração e na expressão de CD11b/CD18 de células polimorfonucleares de camundongos submetidos a desnutrição proteica. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. ★ **ANTUNES, A. C. P.** ; HI, E. M. B. . Efeito protetor do extrato de Ganoderma lucidum em ratos inoculados com droga carcinogênica Pristane. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
3. HI, E. M. B. ; **ANTUNES, A. C. P.** . Hipertensão e Diabetes. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
4. ★ **ANTUNES, A. C. P.** ; Efeito protetor do extrato de ganoderma lucidum em ratos inoculados com droga carcinogênica pristane. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 13º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. Papel da glutamina na modulação da migração e na expressão de CD11b/CD18 de células polimorfonucleares de camundongos submetidos a desnutrição proteica. 2015. (Congresso).
2. VII Congresso de Biomedicina da Baixada Santista. 2012. (Congresso).
3. XIII Congresso brasileiro e internacional de biomedicina. 2012. (Congresso).
4. VI Congresso de Biomedicina da Baixada Santista. 2011. (Congresso).
5. VIII Feira da saúde e educação.Feira da saúde. 2009. (Outra).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 19/11/2015 às 14:35:04