UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Fisiopatologia e Toxicologia

Avaliação da resposta de macrófagos peritoneais ao lipopolissacarídeo em um modelo de envelhecimento submetido à carência proteica

Gabriela Kodja Vivian

Dissertação para obtenção do Título de Mestre em

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo
2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Fisiopatologia e Toxicologia

Avaliação da resposta de macrófagos peritoneais ao lipopolissacarídeo em um modelo de envelhecimento submetido à carência proteica

Gabriela Kodja Vivian

Versão corrigida da Dissertação

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo
2021

Avaliação da resposta de macrófagos peritoneais ao lipopolissacarídeo em um modelo de envelhecimento submetido à carência proteica

Gabriela Kodja Vivian

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

Aprovada em:

Banca Examinadora

_____
1º Examinador

_____
2º Examinador

_____
3º Examinador

São Paulo,_____de_____de 2021.

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

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Vivian, Gabriela Kodja
V858a Avaliação da resposta de macrófagos peritoneais ao lipopolissacarídeo em um modelo de envelhecimento submetido à carência proteica / Gabriela Kodja Vivian. -- São Paulo, 2020.
89p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Orientador: Fock, Ricardo Ambrósio

1. Envelhecimento. 2. Sistema imunológico. 3. Carência proteica. I. T. II. Fock, Ricardo Ambrósio, orientador.

Dedico a Luciana e Lilian, minha mãe e avó, pelo enorme suporte e dedicação, que ao longo deste período compreenderam minhas ausências quando se fizeram necessárias.

A minha família, sempre ao meu lado em todos os momentos.

Dedico também ao meu falecido avô, que me incentivou a nunca desistir, não importa o que acontecesse

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Ricardo Fock, orientador deste trabalho, meus sinceros agradecimentos pela confiança e profissionalismo, pelos ensinamentos e por auxiliar minha formação.

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 Fisiopatologia e Toxicologia da FCF-USP.

À secretaria do Departamento de Fisiopatologia e Toxicologia da FCF-USP.

A Renaira Oliveira, amiga e mestranda do Laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP, por ser minha amiga, conselheira; por ter me dado suporte ao longo desses anos e por trazer alegria a minha vida nesse período.

A Andressa Santos, amiga e doutora, que me auxiliou e me guiou ao longo desse período, dando um suporte imensurável.

A Talita Santori, amiga e doutora, que me ajudou e alegrou meus dias ao longo dessa jornada.

A Bruna, amiga e mestranda do Laboratório de Hematologia experimental da FCF-USP, por me ouvir e me auxiliar nesses últimos tempos.

Às companheiras de pós-graduação do Laboratório Hematologia Experimental da FCF-USP, Araceli Hastreiter e Caroline Dias, pela ajuda e conhecimentos compartilhados.

A Edison Makiyoma, técnico do Laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP, pela ajuda no suporte técnico.

A Renata Alburquerque, pelo auxílio com o citômetro de fluxo e com o cultivo da *C.albicans.*

Ao apoio financeiro da FAPESP, CAPES e CNPQ, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

RESUMO

Vivian, G. K. **Avaliação da resposta de macrófagos peritoneais ao lipopolissacarídeo em um modelo de envelhecimento submetido à carência proteica.** 2020. 89f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2020.

Nos últimos anos, a população idosa tem aumentado, consideravelmente, no cenário mundial. Tais pessoas tendem a apresentar alterações nutricionais, ocasionadas pelos mais diversos mecanismos. Ambos os processos, envelhecimento e comprometimento nutricional, podem afetar diversas funções do organismo, por exemplo, o sistema imunológico. Por esta razão, o presente estudo tem por objetivo avaliar determinados aspectos relacionados à resposta imunológica inata e seus mecanismos, em um modelo animal idoso, submetido à carência proteica. Para isso, foram utilizados camundongos machos, de linhagem C57BL/6, divididos em dois grupos relacionados à idade: grupo de animais jovens (3-6 meses) e outro de animais idosos (18-19 meses) que, após alcançarem a idade desejada, foram separados em dois grupos, controle e desnutrido. Ao longo do processo, foram realizados mapeamento nutricional, composição corporal, análise bioquímica e hematológica. Foram coletadas células da cavidade peritoneal e realizados imunofenotipagem, além de teste de espraiamento, fagocitose, atividade fungicida com *Candida albicans*, bem como produção de citocinas e avaliação da expressão dos fatores de transcrição NFκB e STAT 3, após estímulo com LPS. Os animais, desnutridos jovens e idosos, apresentaram anemia e leucopenia, bem como níveis menores de proteína total e albumina. A capacidade de espraiamento, fagocitose e atividade fungicida apresentou-se reduzida nas células dos animais jovens desnutridos, bem como nas células dos animais idosos, independente do estado nutricional. Ainda, animais idosos apresentaram menor porcentagem de células F4/80+/CD11b+ e menor expressão de CD86+, independente do estado nutricional. Porém, observamos redução na expressão de TLR4+ somente nos animais desnutridos, independentemente da idade. Em relação à produção de citocinas, observamos que células de animais desnutridos, tanto do grupo jovem como do idoso, apresentaram menor capacidade de produção de IL-1α e TNF-α. Também observamos redução na produção de TNF-α em células de animais idosos controle. Em relação à produção de IL-10, observamos aumento no grupo idoso, principalmente, nos animais desnutridos. Ao analisar a expressão da relação do fator de transcrição NFkB fosforilado pela sua fração total, observamos que células de animais desnutridos apresentaram redução, independentemente da idade. Dessa forma, tais resultados permitem concluir que o envelhecimento e a carência proteica comprometem a resposta imune celular e, quando associados, esse comprometimento tende a ser mais acentuado.

Palavras-chave: envelhecimento; carência proteica; sistema imunológico.

ABSTRACT

Vivian, G.K. **Evaluation of the response of peritoneal macrophages to lipopolysaccharide in an aging model subjected to protein deficiency.,** 2020. 89f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2020.

The elderly population has increased considerably in recent years on the world stage. This population tend to have nutritional changes, caused by the most diverse mechanisms. Both processes, aging and nutritional impairment, can affect various functions of the body, such as the immune system. Therefore, this study aims to evaluate some aspects related to the innate immune response and its mechanisms, in an elderly animal model submitted to protein deficiency. For this, C57BL / 6 male mice were used, divided into two age-related groups: group of young animals (3-6 months) and another group of elderly animals (18-19 months) that, after reaching the desired age, were separated into two groups: control and malnourished. Throughout the process, nutritional mapping, body composition, biochemical and hematological analysis were carried out. The cells of the peritoneal cavity were collected and immunophenotyping, spreading test, phagocytosis and fungicidal activity with *Candida albicans* were performed, as well as cytokine production and evaluation of the expression of the transcription factors NFκB and STAT 3, after stimulation with LPS. The animals, malnourished young and old, had anemia and leukopenia, as well as lower levels of total protein and albumin. Spreading capacity, phagocytosis and fungicidal activity were reduced in the cells of malnourished young animals, as well as in the cells of elderly animals, regardless of nutritional status. Additionally, elderly animals showed a lower percentage of F4/80 + / CD11b + cells and a lower expression of CD86 +, regardless of nutritional status, but we observed a reduction in the expression of TLR4 + only in malnourished animals, regardless of age. Regarding the production of cytokines, we observed that cells from malnourished animals, both from the young and the elderly group, had a lower production capacity of IL-1α and TNF-α, as well as a reduction in the production of TNF-α in cells of elderly animals. control. Additionally, in relation to the production of IL-10, we observed an increase in the elderly group, mainly in malnourished animals. When analyzing the expression of the ratio of the transcription factor NFκB phosphorylated by its total fraction, we observed that cells from malnourished animals showed a reduction regardless of age. Thus, these results allow us to conclude that aging and protein deficiency compromise the cellular immune response and that when associated, this impairment tends to be more pronounced.

Key word: Aging; Protein deficiency; Immune system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:Composição Corporal 43

Figura 2: Estratégia de análise da imunofenotipagem das células da cavidade peritoneal 48

Figura 3: Fotomicrografia representativa de macrófagos residentes ativos. Mostrando o espraiamento em animais controle jovem e idoso e desnutrido jovem e idoso (Aumento x200). 53

Figura 4: Fotomicrografia representativa mostrando a fagocitose de fungo *C.albicans* por macrófagos peritoneais. Nas imagens, podemos ver a presença de fungos viáveis, corados na tonalidade basofilíca, e os macrófagos não corados, os quais estão mortos. (Aumento x1000). 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das rações produzidas *in house* (normoproteica e hipoproteica) 29
Tabela 2: Composição da mistura salínica utilizada na produção das rações in house (normoproteica e hipoproteica) 30
Tabela 3: Composição da mistura vitamínica utilizada na produção das rações in house (normoproteica e hipoproteica) 31
Tabela 4: Número de leveduras fagocitadas (%) e atividade fungicida (score) 37
Tabela 5: Parâmetros hematológicos 46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Variação do peso corpóreo. 41
Gráfico 2 Consumo de ração e proteína 42
Gráfico 3. Tecido adiposo subcutâneo e Gastrocnemius. 43
Gráfico 4 Bioquímica 44
Gráfico 5 Bioquímica 45
Gráfico 6. Células da cavidade peritoneal. 47
Gráfico 7. Imunofenotipagem células B. 49
Gráfico 8. Expressão F4/80 e CD11b. 50
Gráfico 9. Expressão TLR-4. 50
Gráfico 10. Expressão CD86. 51
Gráfico 11. Expressão CD11b e CD18 51
Gráfico 12. Teste de espraiamento de macrófagos peritoneais 52
Gráfico 13. Fagocitose e atividade fungicida utilizando *C.albicans* 54
Gráfico 14. Secreção de IL-1α, IL-6, TNF-α e IL-10 em células peritoneais 55
Gráfico 15. Avaliação de pNF-κB/NF-κB. 56
Gráfico 16. Avaliação p-STAT-3/STAT-3. 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Anticorpo
AP-1	Activator protein 1, Proteína ativadora 1
ALT	Alanina aminotransferase
APC	Células apresentadoras de antígenos
AST	Aspartato aminotransferase
CD	Cluster de diferenciação
CLR	Receptor de leptina tipo C
Células NK	Células Natural Killer
IFN-β	Interferon- β
IL	Interleucinas
IL-10R	Receptor de IL-10
IL-1R	Receptor de IL-1
INF-γ	Interferon- γ
IRAK	Quinase associada ao receptor de IL-1
IRF-3	Interferon regulatory factor 3, Fatores Reguladores de Interferon 3
IκB	Inibidor kappa B
IκBα	Inibidor -kappa B alfa
Iκκ	Inibidor Kappa B quinase
JAK	Janus kinase
LBP	Proteína ligante de lipopolissacarídeo
LPM	Large peritoneal macrophages
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Macrófago perfil 1
M2	Macrófago perfil 2
MAPK	(Mitogen Activated Protein Kinases, Proteíno-quinases ativadas por mitógenos)
MD-2	Proteína diferenciadora mieloide
MHC	Complexo de histocompatibilidade
MyD88	Myeloid differentiation primery response gene 88
NFkB	Fator de transcrição nuclear kappa B
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PGN	Peptidioglicano

PCR	Proteína c reativa
p-NFkB	Fator de transcrição nuclear kappa B fosforilado
PRR_S	Pattern recognition receptors
p-Stat 3	Phosphorylated *Signal Transducer and Activator of Transcription* 3, Transdutor de Sinais e Ativador de Transcrição fosforilado 3
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SPM	Small peritoneal macrophages
Stat 3	*(Signal Transducer and Activator of Transcription 3*, Transdutor de Sinais e Ativador de Transcrição 3)
TGF-β	Fator de transformação do crescimento
TLR	Receptor Toll-like
TNF-a	Fator de necrose tumoral
TRAF-6	Fator associado ao receptor de TNF
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Sumário

1 INTRODUÇÃO 16
1.1 Envelhecimento 17
1.2 Carência proteica 19
1.3 Resposta Imunológica, Envelhecimento e Carência Proteica 21
1.4 Resposta Imunológica Inata: Macrófago 22
1.5 Ativação de Macrófagos por LPS 26
2 OBJETIVOS 27
3 MATERIAL E MÉTODO 28
3.1 Comissão de ética no uso de animais 28
3.2 Animais 28
3.3 Ração 28
3.4 Indução à Desnutrição 32
3.5 Avaliação da Concentração Proteica das Rações 32
3.6 Avaliação da Composição Corporal 32
3.6.1 Processamento de Imagem 32
3.7 Obtenção de Sangue Total e Soro 33
3.7.1 Determinação das Concentrações Séricas de Proteínas totais, Albumina, Ureia, Creatinina, AST, ALT, Colesterol total e triglicerídeos 34
3.8 Obtenção das Células da Cavidade Peritoneal 34
3.9 Imunofenotipagem das Células da Cavidade Peritoneal *(ex vivo)* 34
3.10 Teste de Espraiamento de Células da Cavidade PeritoneaL 35
3.11 Teste de Fagocitose e da Atividade Fungicida, in vitro, de Macrófagos Peritoneais 36
3.11.1 Obtenção de soro homólogo normal (SHN) 36
3.11.2 Preparo e opsonização da suspensão de *Candida albicans* (ATCC 40277) 36
3.11.3 Obtenção da suspensão de células peritoneais 36
3.11.4 Ensaio de fagocitose e de atividade fungicida 36
3.12 Cultura de Células Mononucleares Peritoneais 37
3.13 Dosagem de Citocinas 38
3.14 Determinação da concentração da Proteína NFκB e STAT 3 38

3.14.1 SDS-PAGE e “WESTERN BLOTTING” 38
3.14.2 Preparo do gel de poliacrilamida 38
3.14.3 Preparo de lisado de proteínas para sds-page e “western blotting” 38
3.14.4 Transferência de proteínas do gel para membrana (nitrocelulose) 39
3.14.5 Sondagens das proteínas com anticorpos 39
3.14.6 Revelação com sistema quimioluminescente 40
3.15 Análise Estatística 40

4 RESULTADOS 41
4.1 Avaliação do estado nutricional 41
4.1.1 Avaliação do peso corporal 41
4.1.2 Análise do consumo de ração e proteína 41
4.1.3 Avaliação radiográfica da composição corpórea 42
4.1.4 Avaliação da concentração sérica de proteína total, albumina, perfil renal, hepático e lipídico 43
4.1.5 Avaliação hematológica 45
4.2 Avaliação da celularidade da cavidade peritoneal 46
Função dos macrófagos 47
4.2.1 Citometria de fluxo: 47
Imunofenotipagem das células da cavidade peritoneal *(ex vivo)* 47
4.3 Função dos macrófagos 52
4.3.1 Teste de espraiamento de macrófagos peritoneais 52
4.3.2 Avaliação da fagocitose e atividade fungicida 53
4.3.3 Produção de citocinas em sobrenadante de cultura de células peritoneais 54
4.3.4 Concentração proteica NFκB e STAT 3 por Western blot 56

5 DISCUSSÃO 58

CONCLUSÃO 69

REFERÊNCIAS 70

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a população de idosos tem aumentado, consideravelmente, no cenário mundial. O Brasil é um dos países no qual a taxa de envelhecimento se encontra acelerada (LIMA-COSTA,2018). Estima-se que no mundo, em 2050, a população com 60 anos ou mais esteja em torno de 21,3%. Já no Brasil, essa estimativa, para o mesmo ano, tem um percentual de 29,6% (BARROS; GOLDBAUM, 2018).

Em 2018, a população com 65 anos ou mais representava cerca de 9,2%, porém, em 2060, chegará a 25,5 % (IBGE, 2018). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, a população com 60 anos ou mais, até 2043, representará um quarto da população (IBGE, 2019). Em contrapartida, a população de jovens até 14 anos representará uma minoria, o que acarretará em uma mudança do formato da pirâmide etária, estando de acordo com a tendência mundial.

O avançar da idade possui características celulares e moleculares, havendo instabilidade genômica, alterações epigenéticas e na comunicação intracelular, senescência celular, disfunção mitocondrial, imunossensibilidade, além do desenvolvimento de doenças como sarcopenia, osteoporose, câncer, caquexia, demência, entre outras (OH; LEE; SHIN, 2019; CORCORAN, et al., 2019). Ainda, alterações fisiológicas no sistema endócrino, nervoso, digestivo, cardiovascular, musculoesquelético e no sistema imunológico; tanto a resposta inata quanto à adaptativa são afetadas (WEYH; KRÜGER; STRASSER, 2020).

Igualmente, encontramos aumento nas alterações nutricionais, em especial, relacionado a ingesta de proteína, levando à redução da massa muscular e menor eficácia na absorção e utilização dos nutrientes pois, o consumo de proteína é a chave para prevenir a redução de massa muscular, além de ajudar a compensar inflamações e as condições catabólicas associadas a doenças agudas e crônicas, frequentes nessa fase da vida (VENTURINI, et al., 2015; LANDI, et al., 2016; VENTURA, et al., 2017; GRAVAZZI, G., 2019; ENGELHEART, et al., 2020).

No cenário mundial, há um questionamento sobre saúde, sendo um dos principais problemas, a deficiência de macronutrientes (proteína, carboidratos e gorduras). Entre 20% e 50% da população apresenta carência proteica, mas esse

percentual aumenta 29% - 61% nas pessoas acima de 60 anos (SIDDIQUE, et al., 2017). Por outro lado, a carência proteica envolve tanto a subnutrição quanto a supernutrição, sendo responsável pela perda de equilíbrio da carga de saúde em todo o mundo.

Nos últimos anos, estudos mostraram que a carência proteica afeta diferentes sistemas, especialmente, os que possuem um *turnover* proteico alto, como o sistema hematopoiético e as células imunológicas (BORELLI, et al., 2004; FOCK, et al., 2007; BOURKE, et al., 2016). O avançar da idade gera danos celulares que influenciam o desencadeamento de respostas inflamatórias em células fagocitárias, como os macrófagos, células natural killer (NK) (PENCE; YARBRO, 2018). Os macrófagos exercem diversas ações na homeostasia tecidual e na inflamação. No metabolismo gera influência na funcionalidade do macrófago, devido à diversidade de vias metabólicas que regulam o fenótipo e, ainda, na fagocitose e na produção de citocinas.

O metabolismo gera influência sobre o fenótipo inflamatório para o anti-inflamatório e vice-versa (RAMALHO et al., 2020). Ações como a atividade fagocitária, produção de citocinas e espécie reativa de oxigénio (ROS), além da expressão de complexo de histocompatibilidade classe 2 (MHC II) e do receptor Toll-Like (TLR), se apresentam reduzidas nos idosos (OH; LEE; SHIN, 2019). Portanto, o envelhecimento e a carência proteica podem ter influência direta sobre os aspectos fisiológicos do organismo, como no desenvolvimento de um estado pró-inflamatório crônico de baixo grau. Tal estado torna-se fator de risco para o desenvolvimento de multimorbidades e para o comprometimento da resposta imune, predispondo os indivíduos idosos à quadros infecciosos/inflamatórios frequentes (AMARYA et al., 2015).

1.1 Envelhecimento

A humanidade sempre buscou algo que retardasse ou eliminasse o mecanismo do envelhecimento. Mesmo com investimentos científicos sobre o tema, o processo de perda da juventude ainda caminha para sua completa elucidação (FRIES; PEREIRÁ, 2011). Segundo Fechine (2012), o envelhecimento varia de indivíduo para indivíduo, de acordo com aspectos fenotípicos e condições de saúde previamente existentes (diabetes, pressão alta, por exemplo). Espera-se que com o

avançar da idade, o indivíduo venha apresentar alterações cardiovasculares, como queda do débito cardíaco, calcificação das válvulas cardíacas e fibrose no miocárdio. À medida que envelhecemos, perdemos massa muscular, fato que intervém na qualidade de vida do indivíduo idoso, gerando a sarcopenia, que pode ser induzida pela produção de proteínas de fase aguda. As citocinas também podem estar elevadas. Nesse caso, a proteína C reativa (PCR), interleucina- 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina-10 (IL-10), alterações hormonais, de glicocorticoides e catecolaminas auxiliam no aumento da produção das citocinas no processo do envelhecimento (CORCORAN et al., 2019).

A caquexia e a perda de massa livre gorda são fatores espontâneos devido ao catabolismo. Igualmente, a função sensorial reduzida induz a perda de prazer no ato de comer. Distúrbios gastrointestinais acometem cerca de 35 a 40% dos idosos e influenciam na digestão e absorção dos nutrientes (SCOTT et al., 2017). Outro fator importante é a osteoporose, afetando 29% dos idosos que apresentam quadros carenciais (CORCORAN et al., 2019). Com isso, a densidade óssea diminui, há queda no metabolismo basal, redução na resposta nervosa e comprometimento da resposta imunológica (FECHINE[b], 2012).

Em geral, os tecidos são acometidos pela idade e sua capacidade de reparo e regeneração decai frente ao estímulo e lesão (JOSEPHSON et al., 2019). O idoso costuma apresentar alteração no apetite, levando-o a um quadro conhecido como anorexia do envelhecimento. Sua causa pode ser multifatorial, dentre elas, encontram-se a alteração do olfato, a diminuição de movimentação e atraso no esvaziamento gástrico, problemas na mastigação e deglutição, e até mesmo, problemas psicológicos como depressão, que afeta, em média, 20% da população idosa. Tais fatores costumam acarretar a desnutrição proteico-energética (WYSOKINSKI et al., 2015). Há outros quadros que influenciam a saúde no idoso, como o isolamento social, redução do convívio com familiares, o que os deixa deslocados; falta de informação, perda da habilidade locomotiva e de apetite, baixa renda e uso de medicamentos (SHLISKY et al., 2017; HÉBUTERNE et al, 2020).

O desequilibro sofrido com o envelhecimento não só acarreta danos celulares e moleculares, mas leva ao acúmulo de danos oxidativos, contribuindo para o decaimento progressivo de funções celulares (SALMON et al., 2011) e afetando diversas linhagens celulares, como as células-tronco hematopoiéticas, o que abre

caminho para o desenvolvimento de diversas doenças (MOOREFILD et al., 2017). No sistema hematopoiético, há comprometimento da produção, bem como da função das células de defesa, onde ocorrem alterações na composição da matriz hematopoiética. Tal fato ocasiona substituição da medula óssea ativa por tecido adiposo, que passa a ser conhecida como medula óssea amarela, restringindo a demanda de células de defesa frente ao estímulo infeccioso ou fisiológico (SCHAAN; CRUZ, 2003).

A presença de um estado inflamatório crônico de baixo grau é algo que os idosos geralmente tendem a apresentar, podendo ser consequência à exposição contínua à antígenos, combinados com a má função imunológica, produção de citocinas pró-inflamatória, de células T e macrófagos senescentes (FUENTES et al., 2017). A desregulação na produção de citocinas, que auxiliam na remodelação do sistema imunológico, afeta a resposta frente a uma inflamação e torna-se marcador do declínio da resposta no idoso. A IL-6, uma das citocinas que se apresentará alterada, é conhecida como citocina geriátrica (REA et al., 2018).

Além da IL-6, outras citocinas como a interleucina-1 (IL-1), TNF-α, estão ligadas ao processo inflamatório e ao desenvolvimento de sarcopenia, doenças autoimunes e doenças cardiovasculares nos idosos (EWER; RIZZO; KALIL FILHO, 2008; REA et al., 2018). A IL-10, principal citocina anti-inflamatória, tanto por macrófagos/monócitos, quanto por linfócitos, gera aumento a nível sérico. Esse aumento foi detectado em pessoas idosas (REA et al., 2018).

Adicionalmente, a literatura reporta que pacientes idosos (geriátricos) apresentam declínio significativo na porcentagem de linfócitos T e B; aumento na porcentagem de células NK (VALIATHAN; ASHMAN, 2016), bem como aumento da senescência, mediada pela ativação da via *Transdutor de Sinais e Ativador de Transcrição Fosforilado 3*(JAK/STAT), além de outras vias, como a do fator nuclear κappa B (NFκB) e da *Proteíno-quinases ativadas por mitógenos* (MAPK), junto a outras citocinas, IL-1α, interleucina-8 (IL-8), IL-6 (KANDHAYA-PILLAI et a.l, 2017).

1.2 Carência Proteica

As manifestações clínicas, provenientes da carência proteica, dependem do grau e severidade da deficiência, da causa e duração, da idade e se estão associadas, ou não, com outras doenças (AUGUSTO, 1995; ROBBINS et al., 2003;

DE ANGELIS, 1986). O estado nutricional pode ser avaliado por diferentes características clínicas, como medidas antropométricas e parâmetros bioquímicos, por exemplo, dosagem de proteína sérica, albumina, pré-albumina e hemoglobina (SIDDIQUE et al., 2017; KIM; LIM, 2020). Além disso, é importante avaliar se existem alterações na parte bucal do indivíduo, como dificuldade de mastigação, ou até mesmo, se há ou não incapacidade ou dificuldade de locomoção, a qual gera interferência no preparo de alimento, alterando a qualidade de vida (KIM; LIM, 2020).

A carência proteica é uma das deficiências, cuja origem pode ser a falta de ingestão de macronutrientes (proteína, carboidrato), sendo recorrente na população (BATOOL et al., 2015) a perda de equilíbrio da saúde global (BOURKE et al., 2016). Tanto a população jovem como os idosos precisam estar em constante equilíbrio nutricional, para assegurar uma vida saudável. A população idosa é a que necessita mais atenção no seu estado nutricional, a fim de evitar mortes precoces (ENGELHEART; BRUMMER, 2018).

Historicamente, a carência proteica vem sendo associada à pobreza, à dificuldade de acesso ao alimento e também às infecções. Contudo, essa é uma característica não encontrada exclusivamente em indivíduos em vulnerabilidade econômica e social, pois pessoas com sobrepeso e em países desenvolvidos podem apresentar quadros de carência nutricional (WELLS et al., 2020). O consumo de proteína é necessário ao nosso organismo para fornecer-lhe aminoácidos e nitrogênio. Caso haja algum desequilíbrio, o organismo tenta se reestabelecer, aumentando o gasto energético e reduzindo tecido adiposo (TOMÉ et al., 2019) e massa muscular. Quando os níveis de proteína não são atingidos através da alimentação, para continuar a manutenção do conteúdo proteico nos tecidos e órgãos acontece a decomposição da massa muscular, tanto nos humanos quanto nos animais (LANDI et al., 2019).

A ingestão inadequada de proteína propicia a alteração em diversos sistemas, destacando-se aqueles que apresentam altas taxas de proliferação celular, como exemplo, o sistema hematopoiético (FOCK et al., 2007; BORELLI et al., 2009; NAKAJIMA et al., 2015), que altera suas funções e contribui para quadros de anemia, leucopenia e queda na imunidade (SANTOS et al., 2017). Igualmente, a carência proteica é fator muito comum nas internações hospitalares de pacientes idosos. A tendência crescente no mundo é que esse quadro se agrave, pois o

processo de envelhecimento é uma das causas para o desenvolvimento de um estado carencial (DELGADO et al., 2008; AZIZ et al., 2017).

A carência proteica decorre da inadequação, quantitativa ou qualitativa, da dieta ou, ainda, de doenças e da má absorção dos nutrientes (MONTEIRO, 1995; TAKELE et al, 2016). A população idosa requer o consumo mais elevado de alguns nutrientes como proteína, cálcio, vitaminas, do que a população geral. Isso ocasiona aumento na prevalência de casos de carência nessa faixa populacional (SIDDIQUE et al., 2017). A carência é um limitador para o envelhecimento saudável (MARSHALL et al., 2018).

1.3 Resposta Imunológica, Envelhecimento e Carência Proteica

A carência proteica é considerada como um fator capaz de modular o sistema imunológico. Porém, quando o sistema se encontra em condições homeostáticas, o organismo mantém suas funções, como tentar combater patógenos que rompem a barreira de proteção. Há duas formas que nosso organismo possui para combater patógenos invasores, as respostas imunes inata e adaptativa (CRUVINEL et al., 2010; MESQUITA et al., 2010).

A resposta inata é considerada a primeira linha de reconhecimento contra patógenos, agindo como uma defesa aguda. É menos meticulosa, pois é considerada onipresente; suas principais células são os macrófagos, as células dendríticas (CD) e os neutrófilos que irão reconhecer vírus, bactérias e fungos (NEGISHI et al., 2018; HILLION et al., 2020).

A resposta inata é conhecida também por sua rápida ação e curta duração (minutos a horas), ativando vias do sistema complementar, como proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas (CRUVINEL et al., 2010; MESQUITA et al., 2010; NETEA et al., 2019). Porém, quando o número ou a virulência do patógeno é alta, às vezes a resposta inata não é eficaz. Neste caso, a resposta adaptativa é ativada para reconhecer esses patógeno através de células T e B. O processo desse reconhecimento é mais demorado, chegando de uma a duas semanas. Com isso, é capaz de gerar uma memória, com o auxílio das células apresentadoras de antígeno (APC), como o macrófago, células dendríticas e o complexo de histocompatibilidade (MHC).

Assim, no próximo contato com o mesmo patógeno, já haverá reconhecimento e anticorpos (AC) (NEGISHI et al., 2018; NETEA et al., 2019). Sabe-se que indivíduos que apresentam estado de carência proteica geram um déficit na função imune, aumentando assim a susceptibilidade de animais e humanos às doenças infecciosas, criando obstáculos para um envelhecimento saudável (LI et al., 2007; SANTOS et al., 2017; MARSHALL et al., 2018).

A carência proteica leva à ocorrência de lesões em tecido com alta rotatividade de proteína. Assim, o sistema hematopoiético acaba sendo um dos primeiros a ser afetado, devido a sua alta capacidade de renovação (HASTREITER et al., 2020). Com isso, funções básicas como proliferação celular, diferenciação e morte celular podem sofrer alteração na presença do estado carencial prolongado (BORELLI et al., 2004; LEDESMA-MARTINEZ et al., 2020).

No envelhecimento, é comum encontrar um estado pró-inflamatório de baixo grau na produção de citocinas, como a IL-6, TNF-α, e IL-1α (REA et al., 2018). Há, também, aumento na produção de IL-10 e baixos níveis de interleucina-12 (IL-12). Dessa forma, tem-se um quadro propício para o desenvolvimento de doenças inflamatórias e crônicas (ESQUENAZI, 2008; REA et al., 2018). Ainda, ao longo do processo de envelhecimento, ocorrem alterações na modulação da população leucocitária. O mesmo acontece em pacientes desnutridos (BORELLI et al., 2004; GROARKE; YOUNG, 2019).

1.4 Resposta Imunológica Inata: Macrófago

Por volta de 1882, Élie Metchinkoff (1845-1916) notou a presença de uma célula móvel, na qual estava englobada uma partícula fazendo o processo de fagocitose; ele notou também que essa célula móvel exercia papel importante na resposta imunológica frente a infecções e a descreveu como sendo a primeira linha de defesa. A célula em questão é o macrófago (DOS ANJOS CASSADO, 2017).

As células mononucleares se originam na medula óssea. Os monoblastos são os precursores mais imaturos, derivados da célula progenitora pluripotente. São diferenciados em promonócitos e monócitos (CALDER, 1995; ZAGO et al., 2004). Os monócitos circulam pelo sangue periférico e migram, através dos vasos sanguíneos, para os vários órgãos e sistema teciduais, onde se transformam em macrófagos. Trata-se de uma célula heterogênia, que possui diferentes nomes e funções, de

acordo com o tecido, porém, a capacidade de controlar a fagocitose ocorre em todos os tecidos. Acredita-se que os macrófagos possam ser uma célula central no processo de inflamação (ZAGO et al., 2004; CAIN et al., 2013; BEEK et al., 2019).

Os macrófagos são células heterogênicas no mesmo microambiente como na cavidade peritoneal. Também é possível encontrar *large peritoneal macrophage* (LPM), que tem como marcador CD11b F4/80^{Hi}, e *small peritoneal macrophage* (SPM), no qual e CD11b F4/80^{Lo}. Contudo, é a SPM que dá início à resposta imune (HUSSAIN; STOHLMAN, 2012). Todavia, os macrófagos são considerados primordiais para se obter a resposta imune, principalmente, a resposta imune inata.

Quando ativados, os macrófagos, devido a suas diversas funções, participam no desenvolvimento e reparo de tecidos; possuem uma plasticidade funcional; fazem apresentação de antígenos, reciclagem e síntese de membrana. Produzem, também, radicais livres (que se destacam na defesa contra patógenos), participando no processo de fagocitose de patógenos e na produção de citocinas, quimiocinas e prostaglandinas; na ativação de complemento e no aumento da capacidade de espraiamento e fagocitose (CORLISS et al., 2017; VENTURA et al., 2017; BONNARDEL; GUILLIAMS, 2018).

Outra consequência da ativação dos macrófagos é o aumento de células inflamatórias ao local da injúria (GREENBERG; GRINSTEIN, 2002; ARTYOMOV; SERGUSHICHEV; SCHILLING, 2016). Como consequência da elevação desses mediadores inflamatórios, além do efeito local, existe um efeito sistêmico. Dessa forma, um quadro febril pode ser instalado devido ao aumento de citocinas como IL-1 e TNF-α, frente à resposta inflamatória aguda (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

Contudo, para que consiga exercer suas funções é necessário haver a ativação inicial, podendo ser da forma “clássica” M1, na qual o macrófago costuma produzir citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-6, IL-1 e IL-12. Já na ativação alternativa, M2, há produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (SICA; MANTOVANI, 2012, SHI et al., 2016; SILVA; VIDEIRA; SACKSTEIN, 2018).

1.5 Ativação de Macrófagos por LPS

A função do macrófago é identificar situações que possam levar ao desequilíbrio, como a invasão de um patógeno, através de receptores de reconhecimento de patógeno (PRRs); esses receptores podem ser encontrados na

membrana plasmática ou no plasma. O receptor toll-like (TLR) e o receptor de leptina tipo C (CLR) irão reconhecer padrões moleculares, associados a patógenos (PAMPs), e os sinais que tecidos danificados emitem, conhecidos como padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (COCHET; PERI, 2017; LEE; LIM; CHO, 2020). Dentre os PAMPs mais conhecidos se encontram o lipopolissacarídeo (LPS), as lipoproteínas e o peptidoglicano (PGN), que costumam estar presente na parede celular de microrganismos, como as bactérias (COCHET; PERI, 2017).

Dentre os PAMPs, o LPS é um componente de bactérias gram-negativas, presente na membrana externa. É dividido em fração lipídica A, segmento distal, núcleo interno, núcleo externo e antígeno O (DIXON; DARVEAU, 2005; EBBENZAARD et al., 2018) e a fração do LPS conservada.

A fração lipídica A é o local que receptores irão reconhecer a presença de endotoxina, desencadeando uma resposta imunológica (DOBRAVALSKAIA; VOGEL, 2002; BERTANI; RUIZ, 2018; POTTER et al., 2019). Células como o macrófago reconhecem a fração lipídica A do LPS através de receptores acoplados à membrana, como o receptor da família toll-like 4 (TLR-4) (DIXON; DARVEAU, 2005; BERTANI; RUIZ, 2018). O TLR-4 formará o complexo TLR-4/, fator de diferenciação mieloide 2 (MD-2) / LPS e o receptor cluster de diferenciação 14 (CD14), auxiliando a formação do complexo onde o LPS se liga ao MD-2, para iniciar a formação da cascata de inflamação e ativar a proteína de diferenciação mieloide 88 (MyD88) (MALGORZATA-MILLER, et al., 2016; COCHET; PERI, 2017).

Uma vez ativado o complexo TLR-4, algumas vias de sinalização podem ser desencadeadas como MAPK, AP-1 (*activator protein 1*), STAT e o NFκB. A ativação dessas vias media fortemente a produção de citocinas com caráter pró-inflamatório, dentre elas, o interferon-β (INF-β), IL-12, TNF-α, IL-6 e a IL-1 (ABBAS et al., 2003; BOCHUD; CALANDRA, 2003; BODE et al., 2012; MARTINEZ; GORDON, 2014; BASHIR et al., 2016; MALDONADO et al., 2016).

Na resposta imune inata, o macrófago é uma das células de reconhecimento mais estudada, juntamente com o receptor TLR-4 (SHI et al., 2016). Outra via pesquisada é a do NFkB, devido à sua participação em regular a resposta inata, através da regulação e ativação de genes de fase aguda da inflamação e secreção de citocinas, principalmente, de caráter inflamatório (ORIHUELA, 2009).

A via do fator de transcrição NFκB começa através do receptor TLR-4, que irá reconhecer o LPS, por intermédio da proteína ligante (LBP), juntamente com a proteína CD14 e da MD-2 (FOCK et al., 2007). Após a ligação, ocorrerá o recrutamento de MyD88, que irá se ligar ao IRAK (quinase associada ao receptor de IL-1). Esse receptor sofrerá o processo de fosforilação, ligando-se ao TRAF-6 (fator associado ao receptor de TNF) desencadeando, assim, a ativação MAP, quinase ativadora de Iκκ (quinase IκB) e Iκκ2. O TLR-4 é um dos únicos da família TLR capaz de utilizar e ativar todas essas proteínas ativadoras e, com tal ligação, levar à ativação da via do fator de transcrição NFκB (LI; VERMA, 2002; LU et al., 2008).

O NFκB, enquanto permanecer no citoplasma, é encontrado na forma inativa, ligado a uma proteína inibitória, conhecida como IκBα, que irá impedir a translocação do NFκB para o núcleo local, onde vai gerar a ativação de suas respostas. Para que sua ação seja executada, é necessário que ocorra a fosforilação e degradação da IκBα. Desta forma, ocorrerá a translocação para o núcleo. Quem levará a ativação, para gerar o processo de fosforilação da IκBα, são as Iκκs. Com o resultado dessa degradação, o NFκB irá se dissociar do seu inibidor, tornando-se ativo e favorecendo o acionamento de genes relacionados à inflamação, à resposta imunológica inata, à anti-apoptose e à sobrevivência celular (BAEUERLE; BALTIMORE, 1996; GLEZER et al., 2000; MANKAN et al., 2008; GONZALEZ-MURILLO et al., 2015; LI et al., 2017).

Alguns estudos recentes mostraram que o NFκB, dependendo do local onde esteja, pode vir a agir como anti-inflamatório, inibindo diretamente genes pró-inflamatórios, levando a alteração na secreção de citocinas inflamatórias e aumentando a atividade de citocinas, como a IL-10. Ainda, pode agir inibindo a apoptose de macrófagos, devido a indução de agentes patológicos, bloqueando a inflamação (LAWRENCE, 2009). Uma das funções que o NFκB está envolvido é as inúmeras respostas fisiológicas, levando tanto à indução de citocinas no desenvolvimento da resposta imune celular, como a indução da resposta inflamatória (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

Algumas citocinas ativam e são ativadas por outras vias de sinalização, como a IL-6, que ativa a STAT. Uma de suas funções é a manutenção do microambiente inflamatório (LEVY; LEE, 2002). Dados da literatura têm demonstrado que indivíduos deficientes para STAT3 apresentaram comprometimento nas funções de

reconhecimento e combate a patógenos (TAKEDA et al., 1999). Animais deficientes para STAT3 mostraram-se altamente suscetíveis ao choque endotóxico, com aumento na produção de citocinas inflamatórias, como TNF-α, IL-1 e IFN-γ, bem como a supressão da produção de IL-10, o que mostra que a STAT3 tem participação na sinalização da resposta anti-inflamatória (AK; TAKEDA, 2004).

Sabe-se que a STAT3 é um fator importante para a produção de citocinas, como a IL-10. A ativação via macrófagos é mediada, justamente, por essa citocina, mostrando, novamente, a interação entre a IL-10 e a STAT3 para uma resposta anti-inflamatória (MATSUKAWA et al., 2013).

2 OBJETIVOS

O envelhecimento, no seu processo natural, pode gerar grandes consequências para o sistema imunológico do idoso; fatores externos, como a carência proteica, podem vir a agravar essas mudanças. O presente trabalho tem como objetivo principal, avaliar a relação entre o envelhecimento, carência proteica e a resposta imunológica, principalmente, das células peritoneais.

Para tal, foram avaliados:

- O perfil nutricional (com o consumo de ração, ingestão de proteína, perda de peso, dosagem de proteína total e albumina sérica);
- O perfil bioquímico (creatinina, ureia, AST, ALT, colesterol e triglicérides);
- Perfil hematológico (hemograma);
- Composição corporal (tecido adiposo e muscular);
- Avaliação da expressão (CD11b, F4/80, TLR-4, CD86, CD19 e CD5) nas células da cavidade peritoneal *ex vivo*;
- Perfil celular das células da cavidade peritoneal;
- Capacidade de espraiamento das células mononucleares da cavidade peritoneal frente a estímulo *in vitro* com LPS;
- Capacidade de fagocitose e atividade fungicida das células mononucleares peritoneais frente a *Candida albicans*;
- Capacidade das células da cavidade peritoneal em cultura em sintetizar citocinas: IL-1α, IL-6, TNF-α e IL-10 quando estimuladas *in vitro* com LPS;
- Dosagem do conteúdo proteico das proteínas NFκB e STAT3 ambas total e fosforilada em células peritoneais após estímulo de LPS.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Comissão de Ética no uso de Animais

O presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF 085.2018-P544**,** ANEXO A).

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos C57bl/6 machos, de três a seis meses (grupo jovem); de 18 a 19 meses (grupo idoso), isogênicos, provenientes do Biotério Central do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo.

Os animais foram submetidos, desde o nascimento, às mesmas condições ambientais (temperatura ambiente entre 22-25°C, ciclo de luz de 12 horas). Logo após o desmame, os animais passaram a ser alimentados com Ração Purina® e Água Ad Libitum até o início dos experimentos. Os animais foram pesados, distribuídos em gaiolas semi-metabólicas e pesados a cada 48 horas, durante o período de adaptação (FOCK et al., 2010), indicado ganho e ou estabilidade do peso corpóreo.

3.3 Ração

A Ração I, destinada aos animais do Grupo Controle, possuía 12% de proteína. A Ração II, destinada aos animais do Grupo Desnutrido, possuía 2% de proteína. A caseína era a fonte proteica das rações. A mistura salínica e vitamínica utilizadas foram recomendadas por Reeves et al. (1993) e encontram-se nas Tabelas 1, 2 e 3, nas páginas seguintes. As rações foram produzidas por nós, na forma de granulado, e conservadas a -4°C até o momento do uso. A concentração proteica das rações foi feita pelo método de Micro-Kjedahl (WARD, 1963) e realizada no Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP.

Tabela 1: **Composição das Rações**

Constituintes	**Ração normoproteica** (g/Kg de ração)	**Ração hipoproteica** (g/Kg de ração)
Caseína (85% pureza)	120	20
Mistura salínica	35	35
Mistura vitamínica	10	10
Sacarose	100	100
Óleo de Milho	80	80
Fibra alimentar (Celulose)	10	10
Metionina	1,5	1,5
Bitartarato de Colina	2,5	2,5
Tert-butilhidroquinona	0,008	0,008
Amido de milho	640,992	740,992

As misturas salínica e vitamínica foram preparadas sob encomenda, de acordo com as recomendações de 1993 do Instituto Americano de Nutrição para camundongos adultos.

Fonte: REEVES et al. (1993).

Tabela 2: **Composição da mistura vitamínica**

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

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

Fonte: REEVES et al. (1993).

Tabela 3 – Composição da mistura salínica (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

Composição da mistura salínica utilizada na produção das rações in house (normoproteica e hipoproteica).
Fonte: REEVES et al. (1993).

3.4 Indução à desnutrição

Após o período de adaptação, aproximadamente sete a 14 dias, caracterizado pela manutenção ou o ganho de peso, os animais foram separados em dois grupos: o Grupo Controle recebeu a ração I e o Grupo desnutrido recebeu a ração II. Ambos receberam água e ração *ad libitum*, avaliando-se, a cada 48 horas, o consumo de ração e o peso corpóreo de cada animal.

A avaliação do estado nutricional dos animais foi baseada na metodologia utilizada por nosso grupo de pesquisa, que consiste no peso corpóreo, no consumo diário de ração, no consumo total de proteína e albumina, juntamente com o

hemograma desses animais. Para realizarmos os experimentos, os animais do Grupo Desnutrido necessariamente tinham que atingir perda de peso de cerca de 15 a 20% do peso corpóreo e apresentar redução da concentração de proteínas totais e albumina, em conjunto com o hemograma desses animais.

3.5 Avaliação da concentração proteica das rações

A determinação da concentração proteica das rações foi feita pelo método de micro-kjedahl (WARD, 1963) e realizada no laboratório de nutrição experimental da FCF– USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. JúlioTirapegui.

3.6 Avaliação da composição corporal

Os camundongos foram anestesiados para esse procedimento com isoflurano 2-3% (Isofluorine, Cristália) em oxigênio medicinal. Cada camundongo foi posto no equipamento Albira micro PET-SPECT-CT (Bruker Biospin, Valência, Espanha), em decúbito ventral. Foram realizadas manutenções constantes da anestesia. Para cada camundongo foi realizada tomografia de raio-X, utilizando correntes de 400μA e voltagem de 35 kVp para aquisição de 600 projeções. Posteriormente, foi utilizado algoritimo FBP (filtered back projection) para reconstrução da imagem tomográfica, resultando em imagem com voxel isotrópico de 0,125 mm.

3.6.1 Processamento de Imagem

A imagem obtida é composta de voxels, com valor numérico dependente da escala de Hounsfield (HU), portanto, de acordo com a densidade do material que ocupa o voxel em questão, sendo atribuído o valor mínimo de -1000 HU para o voxel ocupado por ar, 0 HU. O voxel ocupado por água e valores positivos são proporcionalmente mais altos para materiais com densidade maior que a água. Dessa forma, inicialmente, foi obtido um volume de interesse (VOI), composto pelo contorno de todo animal, através do qual é calculado seu volume corpóreo total. Dentro dos voxels que compõem esse volume de interesse, foram feitas três rodas de segmentação. No primeiro segmento, os tecidos com baixa densidade, entre -300 e -50 HU para seleção de gordura; o segundo seguimento foram os tecidos de densidade intermediária, entre -50 e +285 HU, para seleção de tecidos magros; o

terceiro e último segmento englobou todos os voxels com valores maiores que 285 HU para seleção de ossos.

A comparação do volume ocupado por cada intervalo de segmentação, com o volume total ocupado pelo animal, permitiu o cálculo da porcentagem de gordura, massa magra e ossos de cada um deles. Todas as etapas foram realizadas em software PMOD, versão 3.706 (PMOD Technologies, Zurich, Suiça). Posteriormente, as imagens obtidas após cada etapa de segmentação foram editadas em ImageJ (versão 1.53), para obtenção das imagens apresentadas.

3.7 Obtenção de sangue total e soro

As amostras de sangue e soro foram obtidas após os animais serem previamente anestesiados com cloridrato de quetamina (100 mg/Kg de massa corporal, Vetnil, São Paulo, Brasil), associado ao cloridrato de xilazina (10 mg/Kg de massa corporal, Ceva, São Paulo, Brasil) por via intramuscular. As amostras foram obtidas a partir do plexo axilar, com auxílio de uma pipeta de transferência. O soro coletado foi separado por centrifugação (1500 x rpm por 15 min) a 4°C e congelado em alíquotas a -40°C para, posteriormente, serem feitas dosagens de proteína e albumina. Para obtenção de plasma, as amostras foram colhidas com EDTA 10% (anticoagulante). Com o sangue total foi realizado hemograma. Os valores relativos do número de leucócitos foram determinados em extensões sanguíneas, realizadas após coleta do sangue e coradas pela coloração de May Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947).

3.7.1 Determinação das Concentrações Séricas de Proteínas totais, Albumina, Ureia, Creatinina, AST, ALT, Colesterol total e triglicerídeos

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método do Biureto (GORNALL, 1949) e a determinação da albumina pelo método do Verde de Bromo Cresol (RODKEY, 1965; DOUMAS et al., 1971). Para as análises bioquímicas foram utilizados "kits" comerciais da Labtest® (Labtest Diagnóstica AS, Lagoa Santa, Brasil) e processados de acordo com as recomendações do fabricante. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (EL800 Universal Microplate Reader- Bio-Tek® Instrumentais, Winoosk, EUA).

3.8 Obtenção das células da cavidade peritoneal

Os animais dos dois grupos, controle e desnutrido, foram anestesiados, exsanguinados. Por último, os animais foram eutanásiados por deslocamento cervical. Em seguida, foi realizada a lavagem na cavidade peritoneal do animal com 10 mL de meio RPMI 1640 (Cultilab®, Campinas, Brasil), pH 7,4, estéril, contendo 10% de soro bovino fetal (Cultilab® Campinas, Brasil), aspirando-se em seguida o líquido peritoneal contendo as células.

As células obtidas foram quantificadas em hemocitômero de Neubauer, após diluição de 1:20 do líquido de Turk. Já para a avaliação morfológica foram feitas lâminas de citocentrifugados da suspensão celular e, posteriormente, submetidas à coloração de May Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947).

3.9 Imunofenotipagem das células da cavidade peritoneal *(ex vivo)*

Após ser feita a lavagem peritoneal, foi realizada contagem para, após, caracterizar a imunifenotipagem das células, utilizando uma alíquota de $5x10^5$/mL de suspensão celular do lavado peritoneal de ambos os grupos. Para esse experimento, foram realizados três painéis. O painel A continha os anticorpos anti-CD11b - FITC (Catálogo 553310, BD Pharminger™), anti-CD19- PE (Catálogo 12-0191-82, eBioscience), anti-CD5- APC (Catálogo 17-0051-82, eBioscience). O painel B continha os anticorpos anti-CD11b - FITC (Catálogo 553310, BD Pharminger™), F4/80 - APC (Catálogo 17-4801-82, eBioscience) e TLR-4 - PE (Catálogo SC-13591, Santa Cruz). O painel C continha os anticorpos antiCD11b - FITC (Catálogo 553310, BD Pharminger™), F4/80 - APC (Catálogo 17 4801-82, eBioscience) e anti-CD86-PE (Catálogo 553692, BD Pharminger™). O painel D continha os anticorpos anti-CD11b- FITC (Catálogo 553310, BD Pharminger™), CD18- APC (Catálogo 562828, BD Pharminger™); foi adicionado ao pellet 10µL da solução contendo os anticorpos anti-CD11b (FITC), anti-CD19 (PE), anti-CD5 (APC), anti-F4/80 (APC), anti-CD86 (PE) e anti-CD18 (APC).

Ainda, foi adicionado ao pellet, 25µL da solução contendo o anti-TLR-4 (PE), na concentração de 1/200 µL. As amostras foram encubadas por 20 min. em temperatura ambiente e no escuro. Após o período de encubação, as amostras foram ressuspendidas com 250 µL de PBS. Em seguida, foi realizada a análise no citometro de fluxo FACS Canto II (FACScan®, Becton Dickinson, New Jersey, USA).

Um total de 50.000 eventos foram adquiridos. Para as análises posteriores a aquisição, utilizou-se o programa Flow Jo® 10 software (Tree Star Inc., Ashland, USA). Foi feita a relação utilizando-se controles negativos, onde há ausência de fluorescência, e a fluorescência menos um (FMO). No total de 10.000 eventos, adquiridos no FACS Canto II e analisado no Flow Jo®10, com a estratégia de análise usada para analisar os resultados (ver Figura 2).

3.10 Teste de espraiamento de células da cavidade peritoneal

As células da cavidade peritoneal foram obtidas conforme o item 3.8 e, posteriormente, plaqueadas na concentração de $3x10^5$ célula/Ml, em placa de cultura de 24 poços. Em cada poço, uma lamínula de vidro circular e estéril (13 a 15mm de diâmetros); foram cultivadas em duplicata na presença de 1,25µg/mL de LPS por 48 horas a 37°C, 5% de CO_2. Após o período de incubação, as lamínulas foram coradas pela coloração de May Grunwald-Geimsa modificada (ROSENFELD, 1947). Consideraram-se, como célula espraiada, aquelas que estavam aderidas à lamínula e emitiam pseudopodes (RABINOVITCH; DESTEFANO, 1973). Foi padronizado esse período de incubação de acordo com trabalhos realizados em nosso laboratório, para melhor aproveitamento das células peritoneais (FOCK et al., 2007; SANTOS et al., 2016).

3.11 Teste de fagocitose e da atividade fungicida, in vitro, de macrófagos peritoneais

3.11.1 Obtenção de soro homólogo normal (SHN)

Foram coletadas amostras, sem anticoagulante, de sangue de camundongos normais da linhagem C57BL/6, machos, adultos, por punção do plexo axilar. Após o soro separado, constituiu-se um “pool”, o qual foram aliquotados em volumes de 1 ml e congelados a -40°C. Esse “pool” foi utilizado, posteriormente, para a opsonização da levedura *Candida albicans*.

3.11.2 Preparo e opsonização da suspensão de *Candida albicans* (ATCC 40277)

As leveduras foram obtidas após cultura de 24 horas, em meio de ágar sabouraud (Difco®). Preparou-se uma suspensão de levedura em 1 mL de tampão PBS, pH 7,4, estéril (Suspensão A) e, a seguir, uma suspensão (B) contendo: 1mL da suspensão A, 5 mL de PBS, pH 7,4, estéril e 1 mL de soro homólogo normal (SNH- item 3.11.1). As leveduras foram contadas em hemocitômetro de Neubauer e sua viabilidade avaliada por solução de azul de metileno (1%), sendo utilizadas somente suspensões de leveduras que apresentaram viabilidade acima de 95%. A suspensão B foi incubada a 37°C, 30 minutos, sob agitação contínua a 10 rpm e ajustada para $3x10^6$ de *Candida albicans* / mL.

3.11.3 Obtenção da suspensão de células peritoneais

As células da cavidade peritoneal foram obtidas conforme descrito no item 3.8. A suspensão de células foi ajustada para a concentração de $3x10^5$ células/mL com meio RPMI 1640, pH 7,4, estéril, contendo 10% de soro bovino fetal (suspensão C).

3.11.4 Ensaio de fagocitose e de atividade fungicida

Em tubos plásticos cônicos, estéreis, foram adicionados 250µL da suspensão de células, coletadas na cavidade peritoneal (suspensão C) e 250µL da suspensão opsonização de *Candida albicans* (suspensão B). Manteve-se uma proporção de 1 célula/10 de leveduras, constituindo-se assim a suspensão D. Os tubos foram incubados à 37°C, em sistema rotatório, à velocidade de 10 rpm, durante 90 minutos. Como controle da reação, foram utilizados tubos contendo 250µL de PBS, pH7,4, estéril e 250µL da suspensão de células do lavado peritoneal (suspensão C).

Após o tempo de 90 minutos, alíquotas 200µL da suspensão D foram retidas em lâminas preparadas por citocentrifugação (Incibras®) e, imediatamente, fixadas e coradas pela técnica de May-Grunwald-Giemsa modificada (ROSENFELD, 1947). A atividade fungicida foi avaliada pela técnica de coloração por Herscowitz, (1981). Nessa técnica, as leveduras vivas, intracelular, coram-se em azul pelo corante de May-Grunwald-Ginemsa. As leveduras mortas não se coram.

A atividade fagocítica foi considerada pelas células que apresentaram uma ou mais de *Candida albicans* internalizadas. Para a atividade fungicida, foram avaliadas

as células que possuíam a *Candida albicans* internalizadas, porém, sem serem coradas, significando “morte da levedura”. Foram contadas ao menos 200 células que fagocitaram a *Candida albicans*. Como o número de leveduras fagocitadas e mortas é variável de célula para célula, expressamos a atividade fagocítica em porcentagem e a atividade fungicida por meio de "score", conforme critério estabelecido por CORAZZINI (1993) e abaixo descrito:

Tabela 4: Número de leveduras fagocitadas (%) e atividade fungicida (score)

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

3.12 Cultura de células mononucleares peritoneais

As células foram coletadas como descrito no item 3.8. As células foram incubadas na concentração de $1x10^6$, em meio RPMI 1640 (Cultilab®, Campinas, Brasil), com 10% de soro bovino fetal, em duplicata, na presença de 1,25 µg/mL de LPS de Eschericia coli, sorotipo 026:B6 (Sigma Chemical Company, USA®), por um período de 24 horas, em cultura a 37°C, 5% de CO_2, em placa de 24 poços com volume total de 1mL. Após esse período, o sobrenadante da cultura celular foi removido e congelado (-40 °C) para dosagem de citocinas TNF-α, IL-1α, IL-10 e IL-6. As células foram lisadas para análise da concentração de proteína de NF-κB total e fosforilado e STAT3 total e fosforilada.

3.13 Dosagem de Citocinas

O sobrenadante obtido no item 3.12 foi utilizado para determinar a concentração de IL-1α (Catálogo DY400, R&D Systems), IL-6 (Catálogo DY406, R&D System), TNF-α (Catálogo MTA00, R&D Systems) e IL-10 (Catálogo DY417, R&D Systems). Foram dosadas por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), (Quantikine ® ELISA, R&D systems, Abinagdon, Reino Unido), seguindo a orientação do fabricante.

3.14 Determinação da concentração da Proteína NFκB e STAT 3

A expressão do NFκB total e fosforilada, STAT3 total e fosforilada em células peritoneais, mantidas em cultura, como descrito no item 3.12, foram realizadas pela técnica de Western Blotting.

3.14.1 SDS-PAGE e “WESTERN BLOTTING”

3.14.2 Preparo do gel de poliacrilamida

Procedeu-se conforme protocolo de Sambrook et al., (1989) e de Harlow e Lane (1999), descrito sucintamente a seguir. Foram preparados géis em bicamada, sendo a camada superior (gel de empacotamento) constituída de acrilamida a 5%, 125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfatode amônio e 0,1 % TEMED. O gel inferior (resolutivo) foi preparado com 12 % de poliacrilamida, 380 mM Tris.HCl, pH 8,8, 0,1 % persulfato de amônio e 0,077 % TEMED.

3.14.3 Preparo de lisado de proteínas para sds-page e “western blotting”

Os lisados foram preparados a partir de $1x10^6$ células em tampão RIPA (SDS 0,1 %, Igepal CA-630 1 %, deoxicolato de sódio 1 %, Tris.HCL 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, aprotinina 2 µg/mL, leupeptina 1 µg/mL, PMSF 100 µg/mL, EDTA 0,5 mM). O material foi sonicado (30 segundos), centrifugado por 15 minutos, a 14.000 rpm e a 4°C. O sobrenadante foi quantificado em um volume correspondente a 10µg (em 100µL). Foi adicionado ao tampão de amostra (5 x concentrado, Tris.HCL 100 mM, pH 6,8, 2- mercaptoetanol (v/v) 5 %, SDS 2 %, glicerol 20 %, azul de bromofenol 0,01%), fervido por 10 minutos e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida. Como padrão, foi utilizada a mistura pré-corada BenchMark (GIBCO BRL, MD, EUA).

3.14.4 Transferência de proteínas do gel para membrana (nitrocelulose)

O gel contendo as proteínas fracionadas por eletroforese foi incubado por 10 min em tampão de transferência (3 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037 % SDS, 20 % metanol, pH 8,3). Paralelamente, a membrana de nitrocelulose foi hidratada e incubada em tampão de transferência. Um "sanduíche" foi montado na seguinte

ordem: esponja, duas a três folhas de papel 3MM, gel, membrana, duas a três folhas de 3 MM (Whatman), esponja.

Procedeu-se a transferência em cuba de eletroforese, na presença de tampão de transferência, sob corrente de 200-400 mA, por 30 a 90 min. A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana por 5 a10 min, com corante Ponceau (Ponceau 1%, ácido acético 1 %), seguida de lavagem com água destilada ou TBS (Tris, pH 7,5, 20 mM, NaCl 0,9 %).

3.14.5 Sondagens das proteínas com anticorpos

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com ECL Advance blocking agent a 5% (LCPK1075/AC), em tampão TBS, por 90 a 120 min, sob agitação. O anticorpo específico foi diluído NFκB total (SC-372, diluição 1/1000, Santa Cruz), NFκB fosforilado (SC-33039, diluição 1/1000, Santa Cruz), STAT3 total (SC-482, diluição 1/1000, Santa Cruz) e STAT3 fosforilado (SC-8001-R, diluição 1/1000, Santa Cruz) em TBS com Tween 20 à 0,05% (TBST), utilizado para a incubação com as membranas, por 2-14 horas, com agitação, à temperatura ambiente.

A membrana foi então lavada três vezes, por 10 min, com TBST. As proteínas foram, então, sondadas com anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:10.000 em TBST, por duas horas, com agitação. A membrana foi lavada três vezes, por 10 min, com agitação. E, por último, a membrana foi lavada três vezes, por 10 min, com TBST. As proteínas foram então sondadas com anticorpo anti-beta-actina (Catálogo A3854, diluição 1:25,000–1:50,000, Sigma) por 35 min, com agitação. A membrana foi lavada três vezes, por 10 min, com TBST sobe agitação.

3.14.6 Revelação com sistema quimioluminescente

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

3.15 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados, passando primeiramente por teste de normalidade. Em seguida, analisados pela análise de variação (ANOVA de duas vias), pós hoc teste de Tukey. Os dados são representados com média ± desvio padrão (DP). O nível de significância adotado foi de 95% ($p<0,05$) e o *n*° representa o número de camundongos utilizados em cada experimento analisado, conforme descrito nas legendas das figuras, tabelas e gráficos. As análises estatísticas foram realizadas com o GraphPad Prisma® (GraphPad Softwar Inc., La Jolla, EUA). *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$, ****$p<0,0001$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do estado nutricional

4.1.1 Avaliação do peso corporal

Após um período de sete a 14 dias de adaptação, os animais foram separados em grupo controle e desnutrido, tanto os animais jovens quanto os idosos, sendo que a média de peso corporal foi estatisticamente similar. Ao final das cinco semanas, os animais do grupo controle jovem obtiveram ganho de peso, bem como os animais do grupo controle idoso, porém, animais desnutridos perderam peso em relação aos respectivos controles (Gráfico 1).

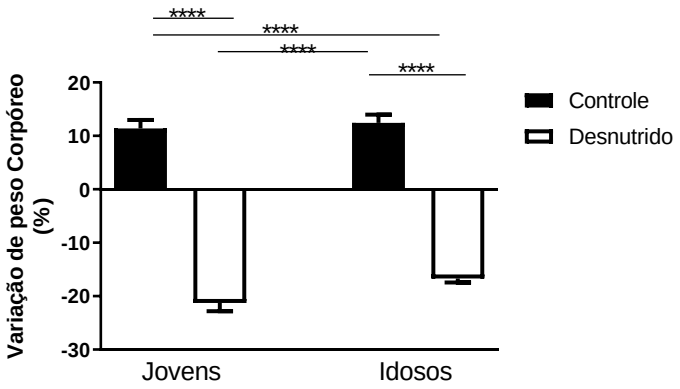

Gráfico 1: Resultados representam a variação final do peso corpóreo dos grupos controle e desnutrido jovens (n=12), grupo controle e desnutrido idoso (n=12). Resultados expressos em média ± desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos jovens e grupos idosos (****p≤0.0001), diferença entre idade e nutrição (****p≤0.0001).

4.1.2 Análise do consumo de ração e proteína

O consumo de ração foi semelhante entre os grupos jovem e idoso, tanto controle quanto desnutrido (Gráfico 2 A). A ingestão de proteína foi significativamente reduzida nos grupos desnutridos (Gráfico 2 B).

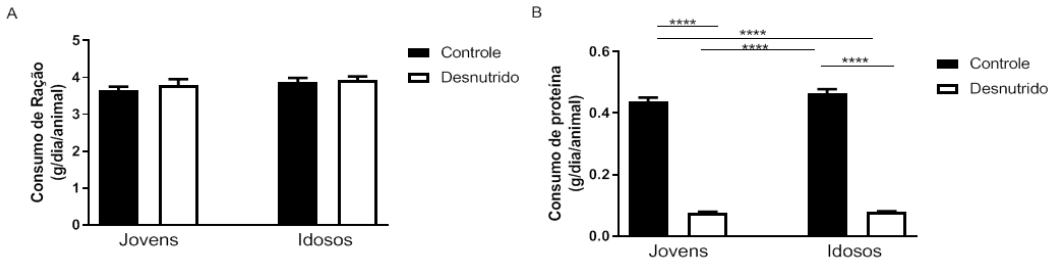

Gráfico 2: (A) Resultados representam a média do consumo de ração em gramas por dia e por animal dos grupos controle e desnutrido jovens, grupos controle e desnutrido idosos. (B) Resultado representa a média do consumo diário de proteína em gramas por dia e por animal dos grupos controle e desnutridos jovens e idosos. Resultados obtidos em um (n=12) tanto para os grupos jovens quanto idosos, e os resultados foram expressos em média ±desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos jovens e grupos idosos (****p≤0.0001), diferença entre idade e nutrição (****p≤0.0001).

4.1.3 Avaliação radiográfica da composição corpórea

Efetuamos as tomografias nos animais dos grupos controle e desnutrido, tanto nos jovens como nos idosos. Os resultados obtidos foram condizentes com o que foi percebido em relação à variação de peso, observada nos animais dos grupos experimentais (Figura 1). Desta forma, constatamos que dentre os animais, após as cinco semanas de realização do protocolo nutricional, os animais controle e idosos apresentaram ganho de peso relativo, enquanto os desnutridos e idosos apresentaram perda de peso, porém, menos intensa quando comparada com animais desnutridos jovens.

Igualmente, os resultados da composição da massa gorda dos animais corroboram com a variação de peso encontrada e também com relação de peso do músculo gastrocnemius. Assim, observamos que, conforme ocorre o avanço da idade, a perda muscular é evidente, embora animais desnutridos, independentemente da idade, também apresentem acentuada perda muscular (Gráfico 3 A e B).

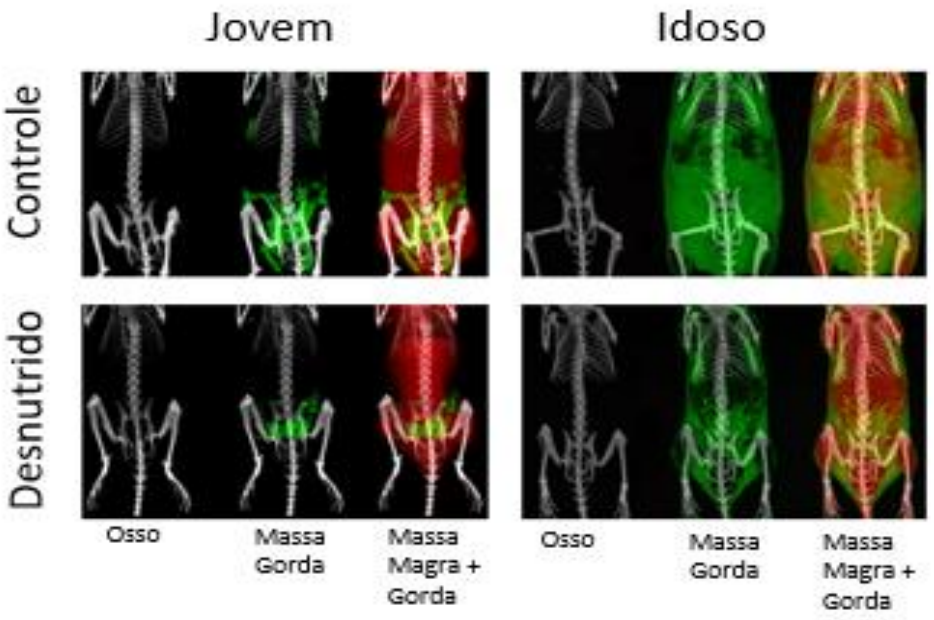

Figura 1: Imagem obtida tanto dos animais do grupo controle quando desnutrido jovem e idoso. Foi capturada a imagem pelo equipamento Albiro micro-PET-SPECT-CT, e utilizado o FBP para reconstituir as imagens tomográficas, com voxel isotrópico de 0,125mm. E foi editado em image J (versão 1.53), para chegar ao resultado apresentado.

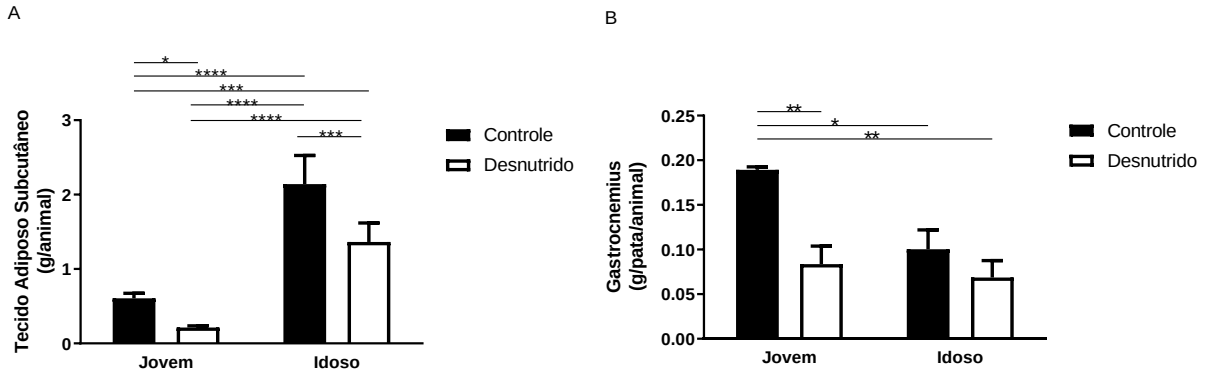

Gráfico 3: (A) Resultados representam a média do tecido adiposo subcutâneo em grama por animal; dentre os grupos controle e desnutrido jovem e idoso, resultados obtidos em (N=6); (B) Resultados representam a média da gastrocnemius em gramas, pata por animal dos grupos controle e desnutridos jovens e idosos, resultados obtidos em (N=3). Resultados expressos em média ± DPM. Diferença significativa (*p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001; ****p≤0.0001).

4.1.4 Avaliação da concentração sérica de proteína total, albumina, perfil renal, hepático e lipídico

Com relação à dosagem de proteína e albumina, notou-se que os animais dos grupos desnutridos (Gráfico 4 A e B) apresentaram redução significativa na

concentração de proteína e albumina, quando comparados aos grupos controles, caracterizando um quadro de carência proteica.

Foi realizado em conjunto, a dosagem de ureia, creatinina, AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), colesterol e o triglicerídeo dos animais controles e desnutridos, dos grupos jovens e idosos. Notou-se redução significativa nos grupos desnutridos (Gráfico 4 C e D).

Com relação aos parâmetros hepáticos, como AST e ALT, notou-se que houve aumento nos animais desnutridos, do grupo jovem, e aumento no grupo idoso, principalmente, nos animais desnutridos (Gráfico 5 A e B). No perfil lipídico desses animais (Gráfico 5 C e D), houve redução significante nos animais desnutridos, tanto do grupo jovem quanto dos idosos.

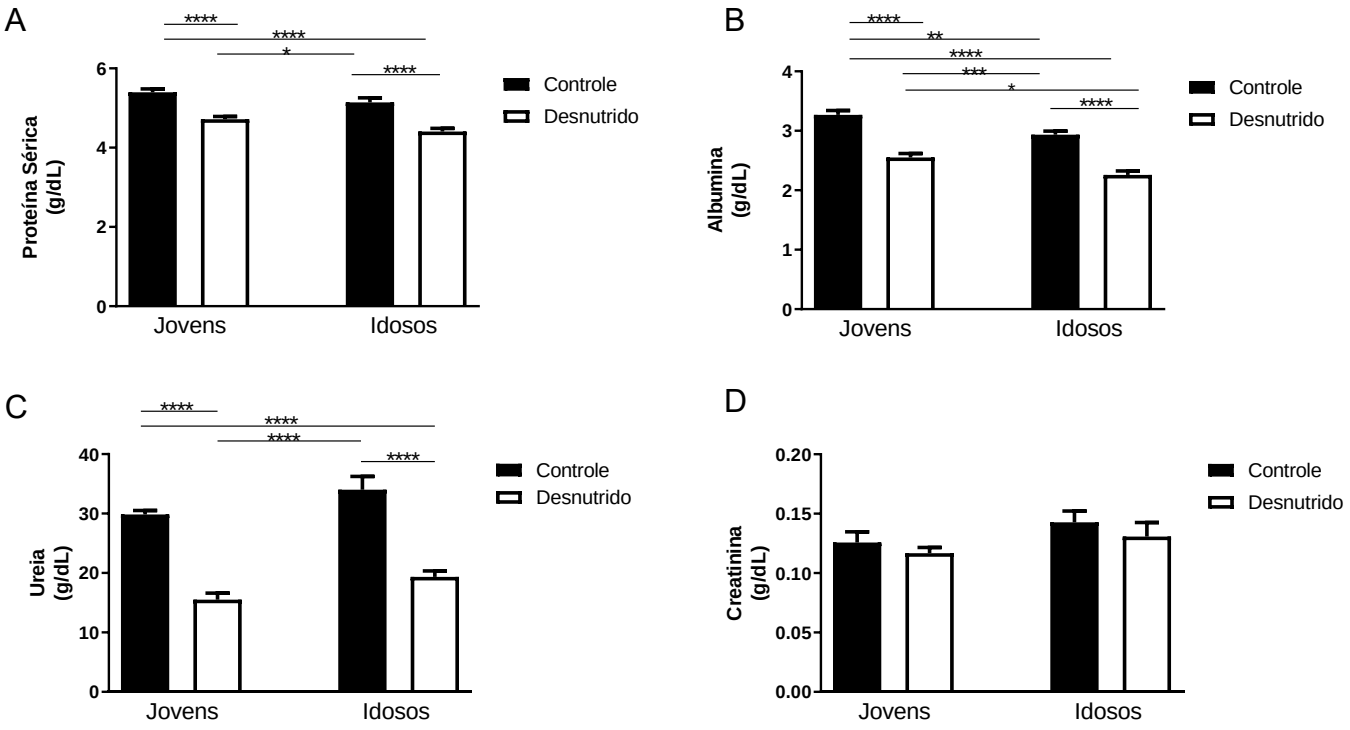

Gráfico 4: (A) Concentração sérica de proteínas totais; (B) Concentração de albumina; (C) Concentração de ureia; (D) Concentração de creatinina. Foi utilizado (n=12) tanto no grupo dos animais jovem quanto nos dos idosos. Resultados expressos em média ± desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos (* p≤ 0,05); (**p≤0.01); (***p≤0.001); (****p≤0.0001).

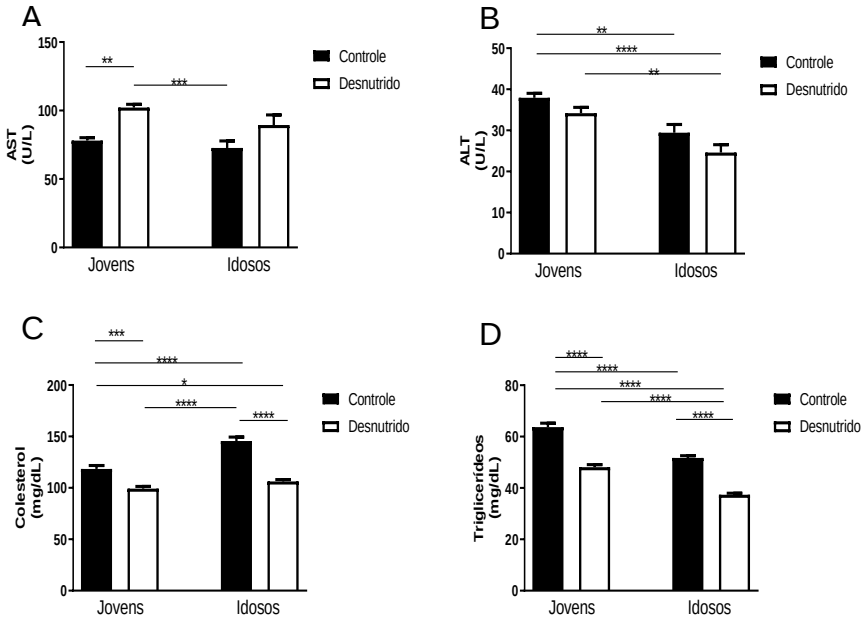

Gráfico 5: (A) Concentração AST (B) Concentração de ALT; (C) Concentração de colesterol; (D) Concentração de Triglicerídeos. Foi utilizado (n=12) tanto no grupo dos animais jovem quanto nos dos idosos. Resultados expressos em média ± desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos (* p≤ 0,05); (**p≤0.01); (***p≤0.001); (****p≤0.0001).

4.1.5 Avaliação hematológica

Além da avaliação bioquímica, foi realizada a avaliação hematológica desses animais. Como podemos avaliar (ver Tabela 5, na página seguinte), a carência proteica provocou nesses animais uma alteração significativa no eritrograma e leucograma, havendo diferença entre as idades avaliadas, entre os grupos controle e desnutrido. Nota-se uma redução de celularidade, praticamente de todas as séries analisadas, nos animais submetidos à dieta com restrição proteica, tanto dos animais jovens quanto dos idosos estudados, quando comparada aos respectivos grupos controles.

Tabela 5: Parâmetros hematológicos

Parâmetros Hematológicos	Controle Jovem (N=12)	Desnutrido Jovem (N=12)	Controle Idoso (N=12)	Desnutrido Idoso (N=12)
Hemácias ($x10^6/mm^3$)	6.032 ±0.41	4.784 ± 0.36*	5.628 ± 0.24	4.423 ± 0.16a / dd
Hemoglobina (g/dL)	8.667 ± 0.58	6.642 ± 0.49*	7.992 ± 0.42	6.342 ± 0.42a/ dd
Hematócrito (%)	26.28 ± 1.78	20.93 ± 1.38*	24.50 ± 0.59	19.95 ± 0.82a/ dd
Leucócitos ($/mm^3$)	1.648 ± 0.12	0.715 ± 0.04****	1.478 ± 0.12eeee	0.759 ± 0.08aaaa / dddd
Neutrófilos ($/mm^3$)	372.3 ± 69.4	160.2 ± 18.41*	374.4 ± 51.61e	169.1 ± 27.38a/ d
Linfócitos ($/mm^3$)	1220 ± 110.5	534.4 ± 45.00***	1050 ± 131.2ee	588.3 ± 77.74a/ ddd
Monócitos ($/mm^3$)	44.83 ± 8.34	12.75 ± 6.81**	33.58 ± 11.03	2.250 ± 1.23aa/ ddd

Tabela 5: Parâmetros hematológicos dos grupos controle jovem (CJ); desnutrido jovem (DJ); controle idoso (CI); desnutrido idoso (DI). Número de animais utilizados (12). (*) CJ x DJ, (a) CI x DI, (b) CJ x CI, (c) DJ x DI, (d) CJ x DI, (e) DJ x CI. Resultados expressos em média ± desvio padrão da média (DPM).

4.2 Avaliação da celularidade da cavidade peritoneal

A avaliação das células do lavado peritoneal (Gráfico 6 A), apresentou redução da celularidade nos animais desnutridos, tanto jovem como nos idosos. Ainda, observamos aumento no número de células totais peritoneais dos animais do grupo controle idoso. Com relação à análise da morfologia solicitada da população, observamos redução do número de células mononucleares nos animais desnutridos, de ambos os grupos, em comparação com os respectivos controles (Gráfico 6 B). Em relação à contagem de mastócitos e polimorfonucleares, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Gráfico 6 C e D).

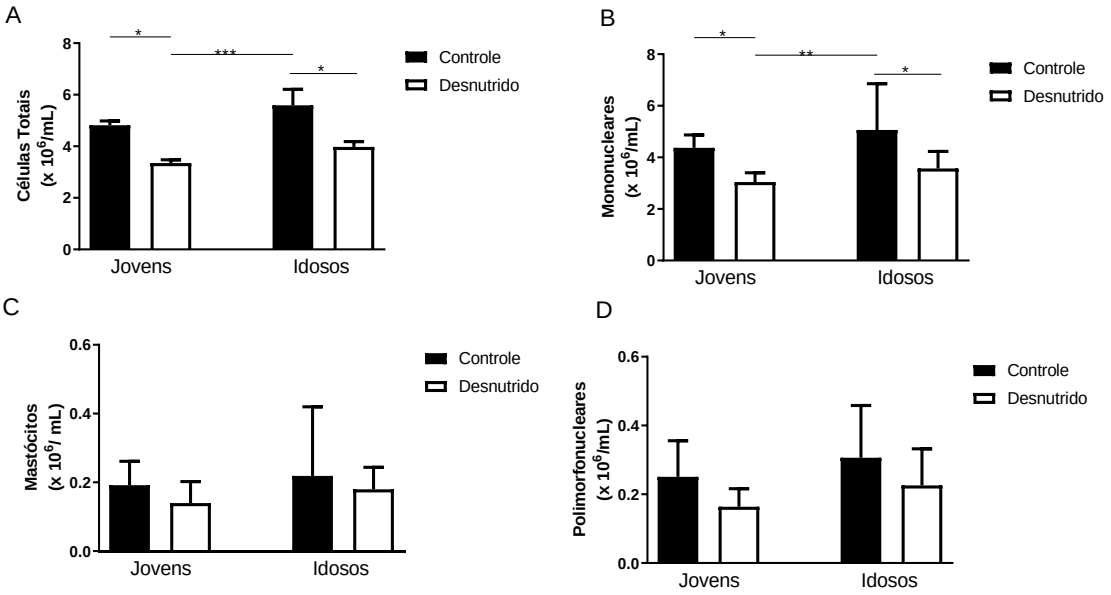

Gráfico 6 (A) resultado representam a contagem global de células peritoneais; (B) resultados representam do diferencial de células peritoneais mononucleares; (C) resultados representam o diferencial de células peritoneais (mastócitos); (D) resultados representam o diferencial das células peritoneais (polimorfonucleares). Foi utilizado (n=10) tanto no grupo dos animais jovem quanto nos dos idosos. Resultados expressos em média ± desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos (* p≤ 0,05); (**p≤0.01); (***p≤0.001).

Função dos Macrófagos

4.2.1 Citometria de fluxo

Imunofenotipagem das células da cavidade peritoneal *(ex vivo)*

Com a finalidade de caracterizar as células presentes na cavidade peritoneal, dos quatro grupos estudados, foram selecionados os seguintes marcadores: CD19 (PE), CD5 (APC), para marcar células B, e a B-1a juntamente com o CD11b (FITC). Adicionalmente, o marcador CD11b (FITC), em conjunto com o marcador F4/80 (APC) foi utilizado para caracterização de macrófagos, bem como a marcação TLR-4 (PE), CD86 (PE), CD18 (APC) e CD11b para avaliarmos marcadores relacionados a função dos macrófagos selecionados. A estratégia de análise utilizada pode ser verificada na Figura 2.

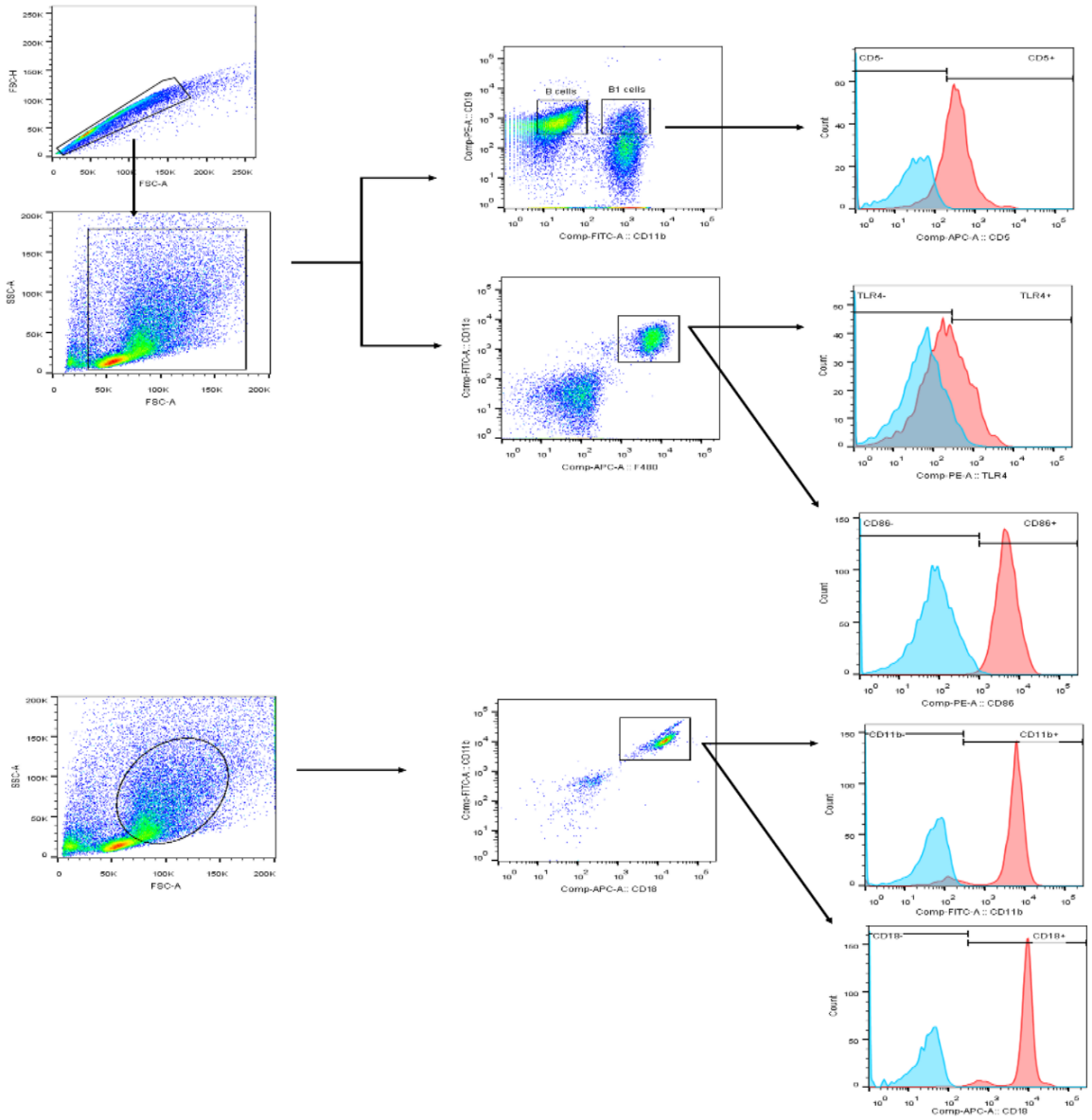

Figura 2: Imunofenotipagem das células da cavidade peritoneal. Histogramas obtidos por meio da citometria de fluxo (FASCcan®, BECTON DICKSON, San Jose, CA) resultantes da imunofenotipagem da população total dos quatros grupos estudados. Estrategeia de análise.

Com relação aos marcadores utilizados na detecção de células B, observarmos (Gráfico 7) diferença significativa na população de células B-1, onde a porcentagem de células $CD19^{+}/CD11b^{+}$ apresentou maior porcentagem nos animais idosos, independentemente do estado nutricional. Ao analisar o marcador isolado CD19, observamos o mesmo padrão para células B-1, porém, ao estudar as células

CD5$^+$, que caracterizam as células B1a, não observamos diferenças entre os grupos, apesar da tendência de aumento dessas células nos animais idosos.

Em relação às células duplamente marcadas para CD11b e F4/80, observamos diferença significativa, quando comparada à animais jovens e idosos, sendo que animais desnutridos jovens apresentaram menor porcentagem dessas células, quando comparadas com animais controles jovens (Gráfico 8). Ao avaliar o marcador de TLR-4, tanto em (%) quanto na média de intensidade de fluorescência (MIF), nas células CD11b$^+$/F4/80$^+$ (Gráfico 9 A e B,) observamos que animais desnutridos apresentam menor expressão. Quando avaliada a expressão de CD86 (Gráfico 10 A e B), observamos que essa redução acontece de forma muito mais acentuada nos animais idosos, independentemente do estado nutricional.

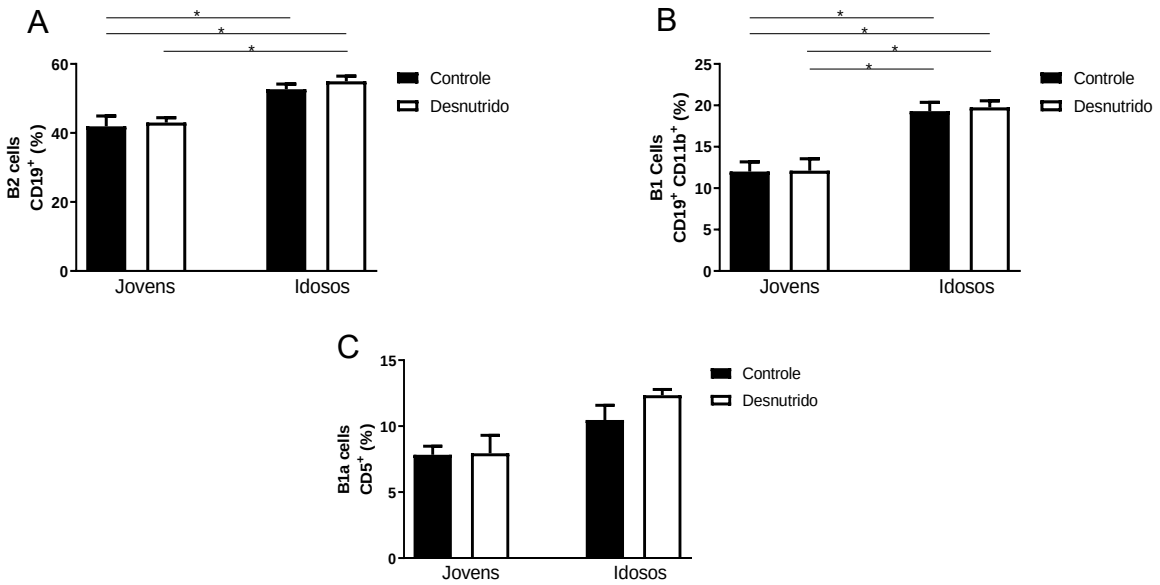

Gráfico 7**:** (A) Valores referente a porcentagem da marcação fenotípica (CD19) (B) Valores referentes a porcentagem da marcação fenotípica (CD19 e CD11b); (C) Valores referentes a porcentagem da marcação fenotípica (CD5). Foram utilizados n=3 dos grupos controle jovem (CJ); desnutrido jovem (DJ), controle idoso (CI) e desnutrido idoso (DI); Resultados expressos em média ± desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos (* p≤ 0,05); (**p≤0.01); (***p≤0.001).

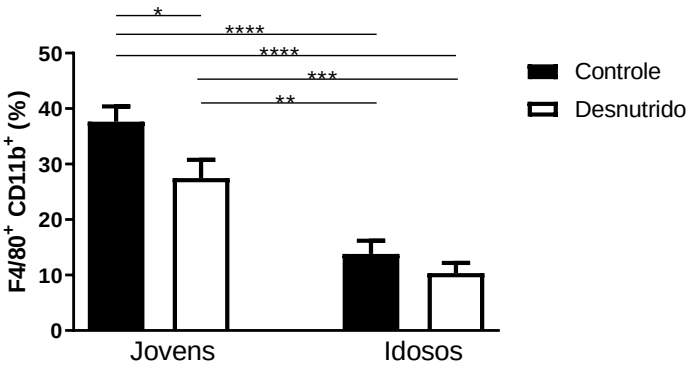

Gráfico 8: Valores referente a porcentagem da marcação fenotípica dos grupos controle jovem (CJ); desnutrido jovem (DJ), controle idoso (CI) e desnutrido idoso (DI); n=10 (Número de animais). Resultados expressos em média ± desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos (* p≤ 0,05); (**p≤0.01); (***p≤0.001); (****p≤0.0001).

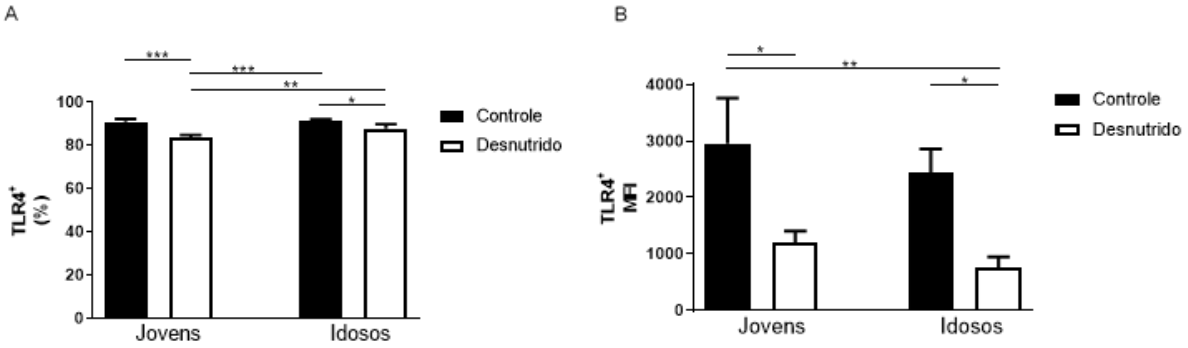

Gráfico 9: (A) Valores referente a porcentagem da marcação fenotípica (TLR-4) dos grupos controle jovem (CJ); desnutrido jovem (DJ), controle idoso (CI) e desnutrido idoso (DI); n=3 (Número de animais). (B) Valores referente média de intensidade de fluorescência (MIF) (TLR-4) dos grupos controle jovem (CJ); desnutrido jovem (DJ), controle idoso (CI) e desnutrido idoso (DI); n=10 (Número de animais). Resultados expressos em média ± desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos (* p≤ 0,05); (**p≤0.01); (***p≤0.001).

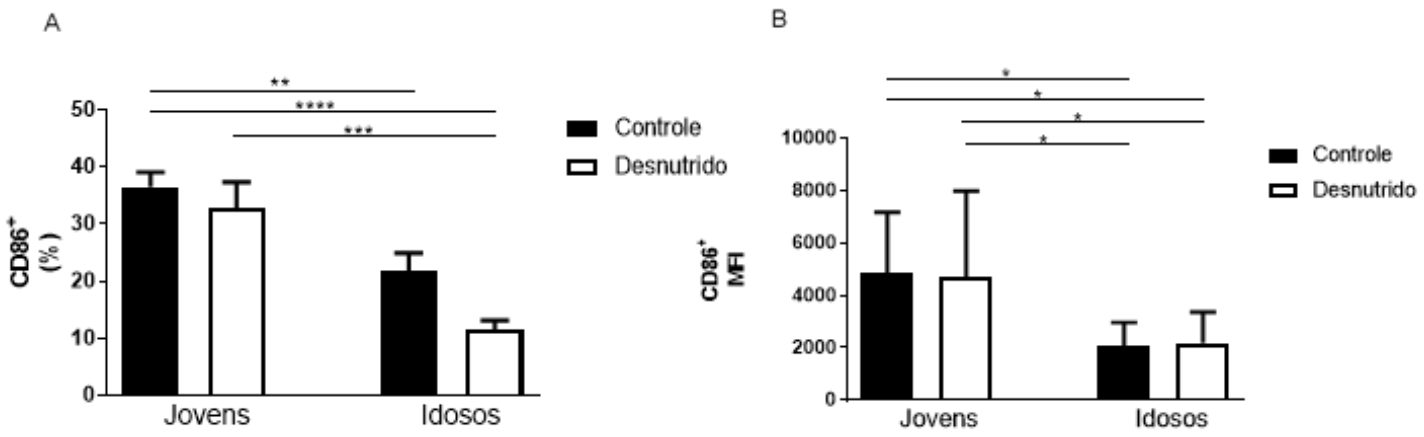

Gráfico 10: (A) Valores referente a porcentagem da marcação fenotípica (CD86) dos grupos controle jovem (CJ); desnutrido jovem (DJ), controle idoso (CI) e desnutrido idoso (DI); (B) Valores referente média de intensidade de fluorescência (MIF) (CD86). Foi utilizado em ambos n=10 (Número de animais). Resultados expressos em média ± desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos (* p≤ 0,05); (**p≤0.01); (***p≤0.001); (****p≤0.0001).

Adicionalmente, avaliamos a MFI dos marcadores CD11b e CD18, ambos importantes para o processo de migração celular. Nessa análise, observamos que células de animais desnutridos, independente do estado nutricional, apresentaram menor MFI, quando comparados aos respectivos controles (Gráfico 11 A e B).

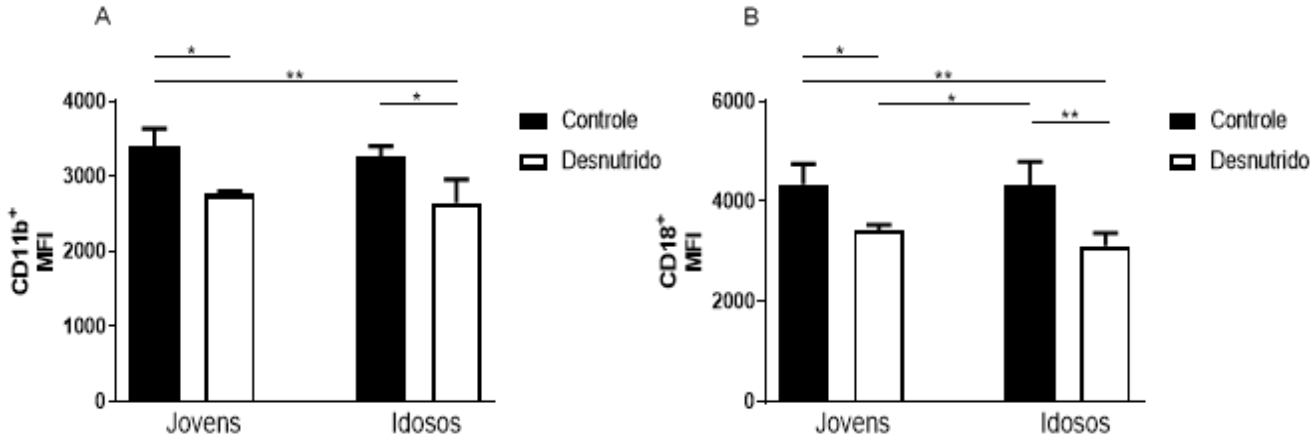

Gráfico 11: (A) Valores referente a média de intensidade de fluorescência (MFI) (CD11b) dos grupos controle jovem (CJ); desnutrido jovem (DJ), controle idoso (CI) e desnutrido idoso (DI). (B) Valores referente média de intensidade de fluorescência (MIF) (CD18) dos grupos controle jovem (CJ); desnutrido jovem (DJ), controle idoso (CI) e desnutrido idoso (DI). Número de animais utilizado nesse experimento (N=3). Resultados expressos em média ± desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos (* p≤ 0,05); (**p≤0.01); (***p≤0.001).

4.3 Função dos macrófagos

4.3.1 Teste de espraiamento de macrófagos peritoneais

Os macrófagos peritoneais do grupo jovem desnutrido apresentaram menor quantidade de células espraiadas, com relação as células dos animais do grupo jovem controle. Nota-se que as células do grupo idoso controle obteve menor capacidade de espraiamento, quando comparadas às células do grupo jovem controle (Gráfico 12).

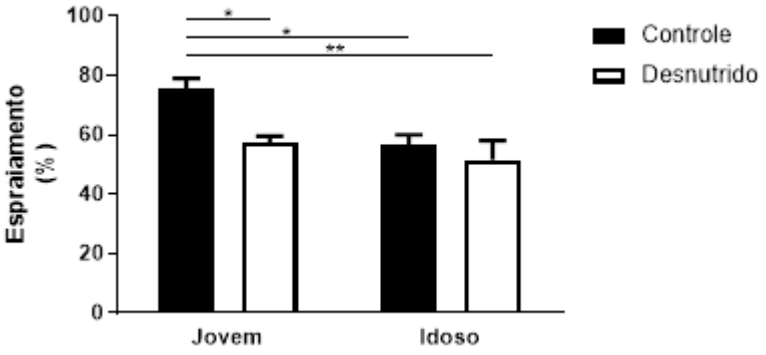

Gráfico 12: Resultados da porcentagem de células peritoneais espraiadas após 48h com o estímulo de LPS. Grupos controles e desnutridos jovem e idosos (n=6). Resultados expressos em média ± desvio padrão da média (DPM). * Diferença significante entre os grupos controle e desnutridos (*p≤0.05); diferença significante entre controles jovens e idosos (*p≤0.05); diferença significante entre controle jovem e desnutrido idoso (**p≤0.01).

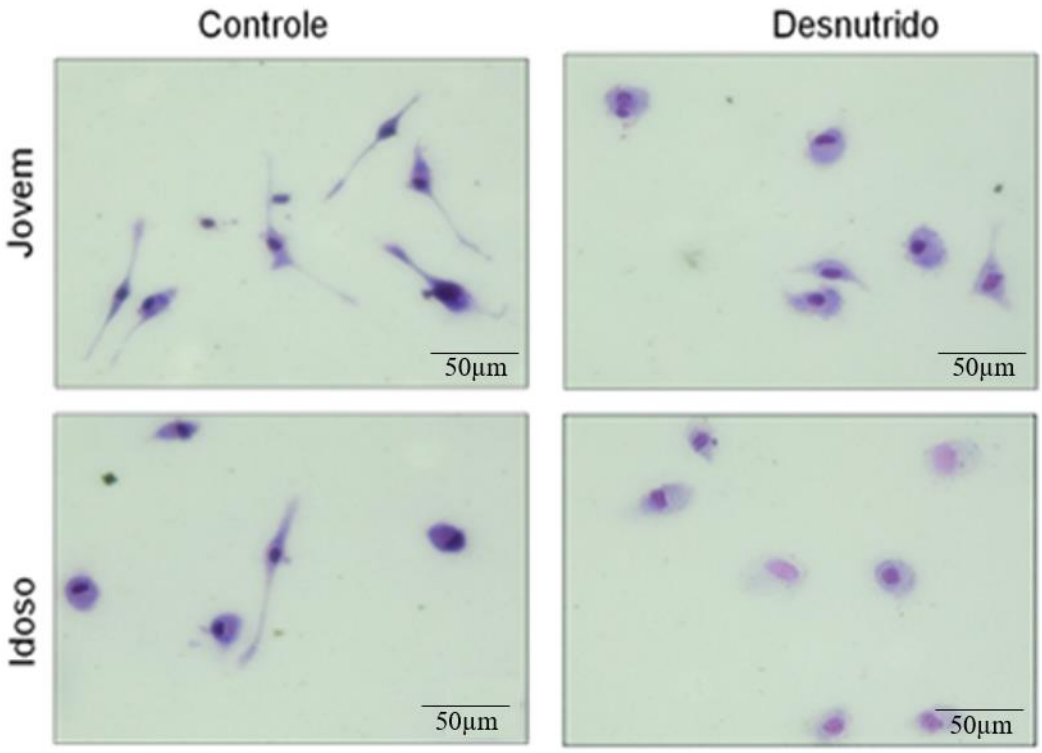

Figura 3: Fotomicrografia representativa de macrófagos residentes ativos. Mostrando o espraiamento em animais controle jovem e idoso e desnutrido jovem e idoso (Aumento x200).

4.3.2 Avaliação da fagocitose e atividade fungicida

Analisando o Gráfico 13, verificamos que as células peritoneais dos animais do grupo jovem desnutrido apresentaram valores menores que o grupo jovem controle, e os animais do grupo idoso controle obteve valores menores que o grupo jovem controle. Adicionalmente à atividade fungicida, observamos que células de animais idosos, independentemente do estado nutricional, ou mesmo células de animais jovens desnutridos, apresentaram menor capacidade fungicida em relação a animais controles jovens (Gráfico 13 B).

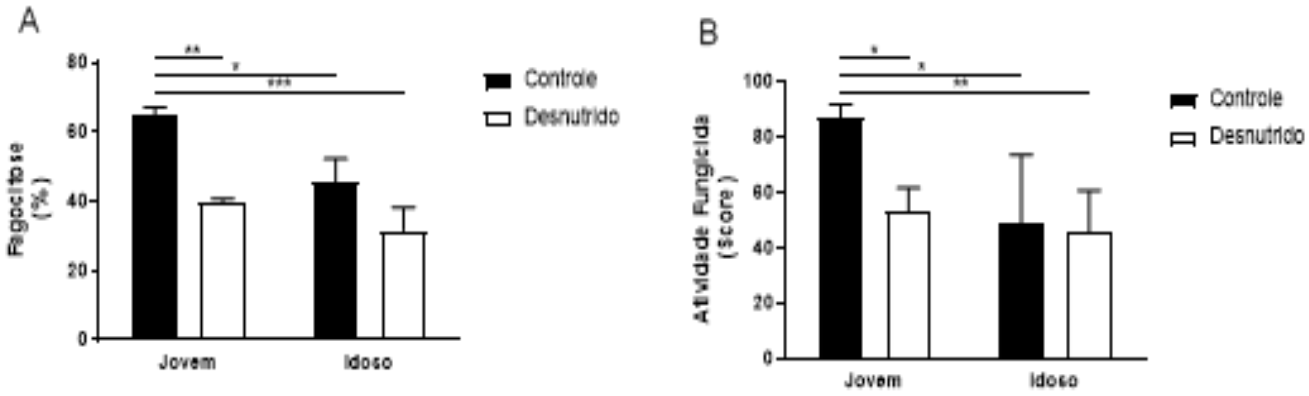

Gráfico 13: Resultados representam a média ± desvio padrão da média (DPM). Grupo controle e desnutrido jovem e idoso (n=6). (A) resultados percentuais da fagocitose em 90 mim; (B) resultados percentuais da atividade fungicida (score) 90 mim. * Diferença significativa entre os grupos controle e desnutrido (*p≤0.05); diferença significativa entre o controle jovem e controle idoso (*p≤0.05); diferença significativa entre controle jovem e desnutrido idoso (**p≤0.01; ***p≤0.001).

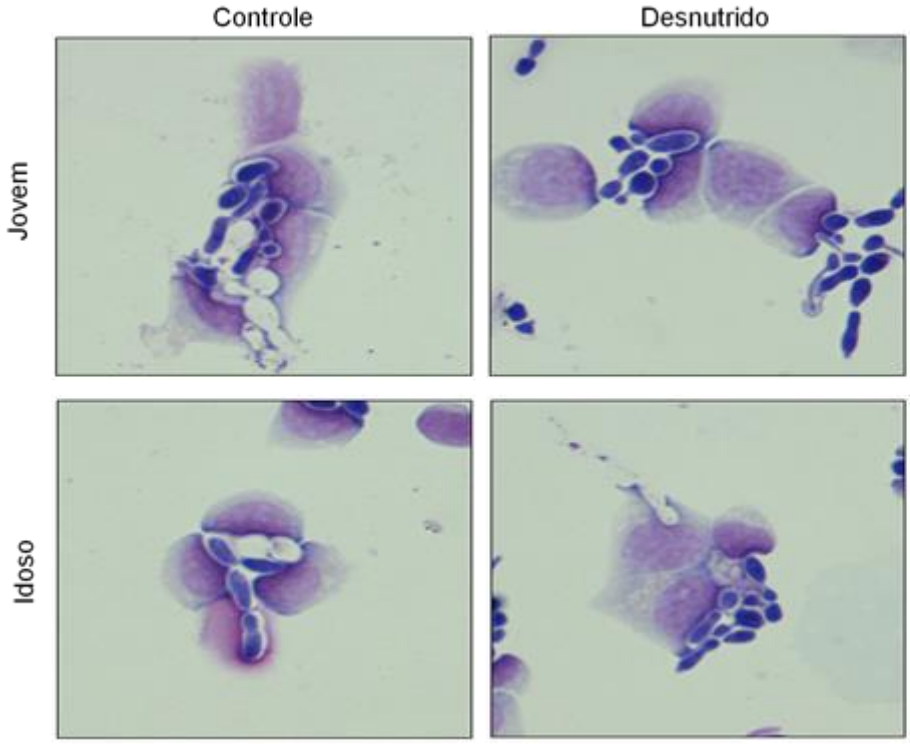

Figura 4: Fotomicrografia representativa mostrando a fagocitose de fungo *C.albicans* por macrófagos peritoneais. Nas imagens podemos ver a presença de fungos viáveis corados na tonalidade basofilíca, e os macrófagos não corados no qual estão mortos. (Aumento x1000).

4.3.3 Produção de citocinas em sobrenadante de cultura de células peritoneais

Com o objetivo de avaliar, em células peritoneais, a influência da idade, associada à carência proteica, na capacidade de produção de citocinas, observamos que a produção de IL-1α foi significativamente afetada em células de animais

desnutridos, independentemente da idade (Gráfico 14 A). Diferente em relação à produção de IL-6, observamos que o componente idade teve maior impacto no comprometimento da produção dessa citocina (Gráfico 14 B). Em relação à produção de TNF-α, observamos que tanto o fator idade como a carência proteica influenciaram a produção (Gráfico 14 C). Ao analisar a produção de IL-10 (Gráfico 14 D), observamos perfil oposto ao observado nas citocinas IL-1α, IL-6 e TNF-α, onde células de animais desnutridos jovem, bem como denutridos idosos, produziram mais IL-10, em comparação a seus respectivos controles. Quanto à produção de IL-10, por células de animais desnutridos idosos e por células de animais desnutridos jovens, observamos que as células dos animais desnutridos idosos produzem maior quantidade de IL-10 que as células de animais desnutridos jovens (Gráfico 14 D).

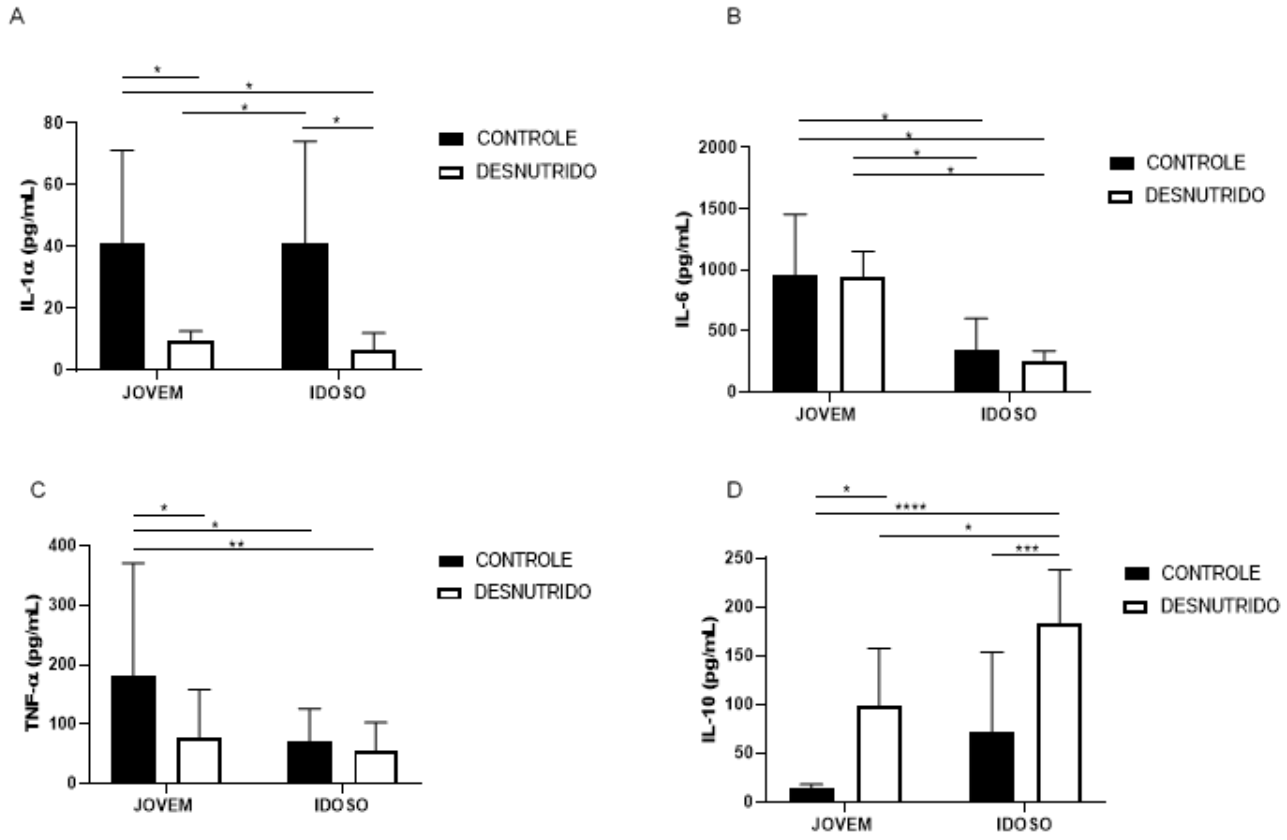

Gráfico 14: Resultados da produção de (A) IL-1α (N=10); (B) IL-6 (N=7); (C) TNF-α (N=11) e (D) IL-10 (N=10), tanto nos grupos controle jovem e idoso quanto no grupo desnutrido jovem e idoso. As citocinas produzidas por células peritoneais e estimuladas in vitro com LPS. Resultados expressos em média ± desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa (*p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001; ****p≤0.0001.

4.3.4 Concentração proteica NFκB e STAT 3 por Western blot

Para quantificação da expressão de NFκB e STAT 3 por Western blot, as bandas foram quantificadas e, consequentemente, foram determinadas as relações entre as porções fosforilada e total tanto no NFκB (pNFκB / NFκB) e STAT 3 (pSTAT-3 / STAT-3).

De acordo com os resultados da razão pNFκB / NFκB, observamos que células de animais do grupo desnutrido apresentaram menor expressão em relação aos seus respectivos controles, porém, não observamos alteração na expressão advindas do fator idade (Gráfico 15). Com relação à concentração entre a razão pSTAT-3 / STAT-3, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos (Gráfico 16).

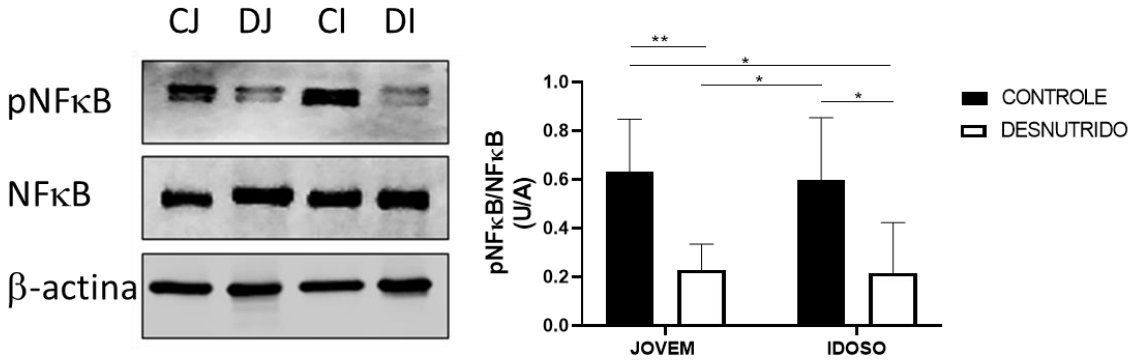

Gráfico 15: A concentração proteica pNFκB / NFκB em relação ao meio sobre o estímulo de LPS. Resultados expressos em média ± desvio padrão da média (DPM) entre a porção fosforilada e total. Número de animal utilizados (n=5). Diferença significativa (*p≤0.05; **p≤0.01).

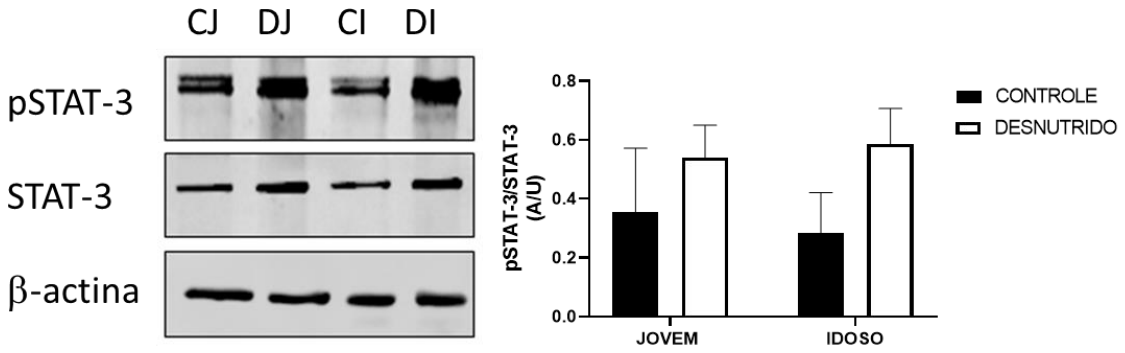

Gráfico 16 A concentração proteica p-STAT-3 / STAT-3 em relação ao meio sobre o estímulo de LPS. Resultados expressos em média ± desvio padrão da média (DPM) entre a porção fosforilada e total. Controle jovem, desnutrido jovem, controle idoso e desnutrido idoso o número de animais usados nesses grupos foi (n=6). Diferença significativa (*p≤0.05; **p≤0.01).

5 DISCUSSÃO

O envelhecimento acarreta diversas complicações, como exemplo, maior susceptibilidade às infecções e redução na funcionalidade do sistema imunológico (WEISKOPF; WEINBERGER; GRUBECK-LOEBENSTEIN, 2009). Essas complicações podem ser observadas tanto no ser humano, como em camundongos (LINEHAN; FITZGERALD, 2015). A carência nutricional (proteína) pode acarretar um indivíduo fragilizado, facilitando as infecções, pois o organismo dos mamíferos necessita tanto de macro como de micronutrientes, em sua dieta, para exercer corretamente suas funções fisiológicas, como desenvolvimento e crescimento celular e, consequentemente, o adequado desenvolvimento da resposta imunológica (SIDDIQUE et al.,2017; WELLS et al.,2020; BORELLI et al., 2004).

Observa-se que indivíduos idosos também apresentam comprometimento do sistema imunológico. As alterações mais evidentes são em relação ao sistema imune adaptativo, porém, estudos também demonstram alterações no sistema imune inato (WEISKOPF; WEINBERGER; GRUBECK-LOEBENSTEIN, 2009; SHAW et al., 2010; CASTELO-BRANCO; SOVERAL, 2014; VAN DUIN; SHAW, 2017).

Quando abordada a carência proteica e o envelhecimento frente a uma resposta imune inata, a literatura é escassa, com poucos estudos conclusivos, visto que normalmente observam-se carências multifatoriais e não associadas à quadros infecciosos e/ou inflamatórios crônicos (LESOURD, 1997; KABURAGI et al., 2007; SHLISKY et al., 2017).

Diante do exposto, este trabalho teve o intuito de avaliar aspectos da resposta imune em um modelo de envelhecimento, em associação com um quadro de carência proteica. É de conhecimento que os idosos tendem a consumir menor quantidade de proteína do que as necessidades diárias necessárias, sendo sua causa as mais variadas, dentre elas, questões sociais, sedentarismo, dificuldade de deglutição e mastigação e doenças pré-existentes (WYSOKIŃSKI et al., 2015; SHLISKY et al., 2017).

Ainda, a queda na absorção de nutriente leva à instalação de um quadro carencial, que afeta diversas funções, principalmente, as que possuem um “turnover” proteico alto, como o sistema hematopoiético e, com isso, afetando o sistema imunológico como um todo (AMARYA et.al., 2015; PINTI et.al., 2016).

Dessa forma, neste estudo, induzimos um modelo de carência proteica em camundongos, jovens e idosos C57BL/6, machos. A linhagem foi escolhida devido à característica isogênica. Assim, quaisquer alterações poderiam ser evitadas. A idade mínima escolhida para os camundongos jovens foi de três meses, devido à maturidade hematopoiética, sendo utilizados animais até no máximo seis meses, ainda considerados adultos jovens (GARCIA; DE LA FUENTE, 2000; FOCK, 2005). Em relação aos animais idosos, foram utilizadas idades compreendidas entre 18 e 19 meses (GARCIA; DE LA FUENTE, 2000; FOCK, 2005; BANNERMAN, 2007; GROARKE; YOUNG, 2019).

Dados anteriores do grupo possibilitaram a padronização do modelo murínico experimental de desnutrição em animais jovens. Como consequência, foi visto que o mesmo modelo proposto serviu para os animais idosos. Foram realizados ensaios que nos possibilitou avaliar a variância de peso por camundongo, até a desnutrição ser constatada, aproximadamente, cinco semanas do início da desnutrição (HASTREITER, 2014). Com esses dados, foi possível selecionar e padronizar o mesmo período de carência proteica nos animais idosos.

De acordo com a literatura, ao longo do processo do envelhecimento, a falta de apetite pode ser um fator que auxilia a instalação de quadros carenciais (WYSOKIŃSKI et al., 2015). O envelhecimento, por si só, acomete alterações no gasto de energia para tentar manter o equilíbrio (COURTNEY-MARTIN et al., 2016).

Os trabalhos de Nakajima et al (2014) e Speakman, Mitchell e Mazidi (2016) demonstram que pode haver aumento no consumo de ração em alguns animais, caso estejam sentindo ausência ou redução da quantidade ideal de nutriente. Porém, de acordo com os relatos de Beck et al. (1989), o consumo de alimento pode decair e, com isso, contribuir para o desenvolvimento de anorexia nos animais com carência proteica. A literatura aborda as duas características, tanto nos idosos quanto nos jovens, com relação ao consumo alimentar.

Ao final de cinco semanas, usadas para a indução à desnutrição, foi possível avaliar que ambos os grupos desnutridos apresentaram perda de peso de cerca de 21%, nos animais jovens, e em torno de 16% nos animais idosos, em relação ao primeiro dia de dieta. Conforme descrito na literatura, a carência proteica é considerada quando a perda de peso é maior que 10% do peso corporal normal (COLLINS, 2003). Não houve comprometimento nutricional com relação aos

micronutrientes da dieta, bem como da parte energética, devido às formulações das rações, uma vez que animais de todos os grupos estudados apresentaram o mesmo consumo diário de rações.

A ingestão de proteína se mostrou reduzida nos grupos que receberam a ração hipoproteica, como esperado. Com isso, a perda de peso ocasionada nos animais dos grupos desnutridos foi evidenciada. Essa perda de peso pode estar correlacionada não somente a baixa ingestão de proteína, mas também, devido à perda de massa muscular (MORLEY, 2018; DEUTZ et al., 2019; LANDI et al., 2019), como observado em nossos resultados.

Assim, a perda de massa muscular foi mais intensa em animais idosos, principalmente, os desnutridos. Nota-se que o envelhecimento gera um impacto importante na perda de massa muscular e a carência proteica auxilia no agravamento da perda muscular, em especial, nos animais idosos (VAN DIJJK et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019). Além da redução na ingestão de proteína influenciar essa perda muscular, a idade tem importante participação como demostrado em outros estudos (CORSETTI et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019; ALVES et al., 2008; MALAFAIA et al., 2010).

Em relação ao tecido adiposo, a literatura relata, em camundongos envelhecidos, o aumento da massa adiposa. Entretanto, quando associada à restrição calórica, observa-se redução acentuada do tecido adiposo (MILLER et al., 2017). Esses resultados corroboram com os nossos achados. Contudo, nosso modelo tratou da restrição proteica, e não calórica.

Ainda, analisamos o perfil bioquímico dos animais. A dosagem de proteína total e albumina sérica são importantes parâmetros laboratoriais, utilizados para a avaliação de quadros carenciais. Assim, a dosagem, tanto de proteínas totais e albuminas, demonstrou a presença de um quadro carencial. Conforme descrito na literatura, a redução na concentração de proteína pode estar relacionada à queda na ingestão proteica, fazendo com que ocorra redução da síntese hepática (CUPPARI, 2009).

De acordo com Silva et al., (2015), a hipoalbuninemia nos animais com carência proteica é esperada e se aplica para animais idosos. A albumina é uma das principais proteínas e sua redução pode estar ligada à processos inflamatórios, e

redução da biossíntese hepática, como consequência da redução do substrato proteico (HARIRI; THIBAULT, 2010).

Também foi realizado avaliação do perfil renal, hepático e lipídico desses animais. Animais de todos os grupos estudados não apresentaram variações séricas na concentração sérica de creatinina. Entretanto, animais desnutridos apresentaram redução na concentração sérica de ureia. Conforme abordado em alguns trabalhos, a redução na produção de ureia está sendo influenciada pelo teor de proteína na dieta, não só de animais como de humanos (KLAHR; TRIPATHY, 1966). Pacientes em estado de carência proteica apresentam maior queda na produção de ureia plasmática que pacientes saudáveis, mesmo que a filtração glomerular se encontre reduzida (KLAHR; ALLEYNE, 1973). Outra questão que influencia na dosagem de ureia é a redução de sua taxa de renovação, bem como o metabolismo de proteína. Os dois fatores estão interligados e influenciam a taxa de ureia nos animais submetidos a carência proteica (BANCHAABOUCHI et al., 2001).

Em relação à dosagem de ALT e AST, para avaliação de parâmetros hepáticos, o grupo desnutrido, tanto o grupo jovem quanto o idoso, apresentou aumento na contração de AST, em comparação ao respectivo controle. Já a concentração de ALT mostrou-se reduzida nos grupos desnutridos, sendo mais evidente nos desnutridos idosos. Segundo Couto et al. (2008), a concentração de ALT é um indicador melhor para avaliar o funcionamento hepático do que a AST. Outros estudos, realizados com camundongos jovem e idosos, obtiveram os mesmos resultados frente à ALT (NUNES-SOUZA et al., 2016).

A dosagem de colesterol sérico apresentou concentrações séricas reduzidas nos animais dos grupos desnutridos. Isso se deve ao próprio quadro de carência proteica, onde há redução na síntese de lipoproteínas nessas situações. Entretanto, nos idosos, o colesterol tende a se apresentar elevado, conforme evidenciado na literatura (OMRAN; MERLEY, 2000; ROCHA et al., 2011).

De acordo com estudos recentes, a concentração sérica de colesterol vem sendo utilizada como marcador de desnutrição onde se encontra reduzida. Também é comum observar redução na concentração sérica de triglicerídeos (OMRAN; MORLEY, 2000; ZHANG et al., 2017). Com relação à concentração de colesterol, houve aumento nos grupos controles e redução nos grupos desnutridos. Houve diferença quando vista a idade, pois, tanto o controle como o desnutrido idoso

apresentaram elevação na concentração de colesterol, comparados com o grupo jovem.

A taxa de triglicérides seguiu o padrão da elevação na concentração nos grupos controles, comparada aos desnutridos, porém, nesse ocorre o oposto do colesterol, tendo o grupo jovem apresentado aumento de triglicérides. Comparado ao grupo idoso, os valores obtidos nos animais jovens controle estão dentro da faixa esperada, de acordo com alguns estudos básicos (SANTOS et al.,2016; SPINELLI et al., 2012; ZHOU, X; HANSSON, G.K, 2004).

Com relação ao grupo dos animais idosos controle, um estudo italiano avaliou diferentes idades, não só no C57BL / 6, mas em outros modelos. Os dados obtidos por esse estudo mostraram ser semelhantes ao encontrado pelo nosso grupo, até o momento, com os animais idosos controles (MAZZACCARA et al., 2008).

Em relação à avaliação hematológica, foi realizado hemograma, onde observamos, em ambos os grupos de animais desnutridos, diminuição significativa no eritrograma (hemácias, hemoglobina e hematócrito) e no leucograma (leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos). Com isso, configurou-se um quadro anêmico e leucopênico, quando comparado a seus respectivos controles. O quadro de leucopenia leva ao comprometimento da capacidade da resposta imune inata e adaptativa, conforme descrito por trabalhos anteriores do grupo e em outros trabalhos, mostrando quadro leucopênico em animais idosos com redução na função imunológica (GOMEZ, 2005; FOCK, 2007, 2010; LIMA, 2013; GROARKE; YOUNG, 2019).

Como no presente estudo utilizamos células da cavidade peritoneal, para avaliar o funcionamento da resposta imune inata, observamos que, em relação a desnutrição, nossos animais apresentaram redução de celularidade. Já os animais idosos apresentaram aumento na celularidade peritoneal, conforme também evidenciado por Muriano et al. (2008), o qual trabalhou com camundongos jovens e idosos saudáveis, relatando aumento de células peritoneais em animais idosos.

Outros trabalhos realizados também relatam o aumento da celularidade em animais idosos saudáveis (CECILIO et al., 2011; PERKINS; MASSUCCI; GLOVER, 1982). Contudo, a razão para esse aumento não é muito discutida. Existem algumas hipóteses, por exemplo, a qual cita a decorrência do aumento na atividade

inflamatória; como também, a hipótese inflamm-aging, relacionada à diversas doenças crônicas nessa idade (DE MARTINIS et al., 2005).

Também avaliamos, por imunofenotipagem, a população de células peritoneais. Conforme abordado, observamos a presença das células B no peritônio e, com isso, suas subdivisões, sendo elas célula B-1 e célula B- 2, sabendo que, dentro das B-1, há as denominadas células B-1a ($CD5^+$) e a células B-1b ($CD5^-$), sendo o CD5 o único marcador, até o momento, usado para distingui-las (MANTECINO-RODRIGUEZ; HYOSUK; DORSHKIND, 2006; POPI et al., 2008).

A porcentagem de células B-1, no peritônio, compreende valores entre 10 a 15% (POPI et al., 2008), sendo que a literatura já reportou valores próximos dos 40% (SUTAVANI et al., 2017). Nossos resultados demonstraram aumento na expressão dos marcadores para células B, nos animais idosos, quando comparados aos animais jovens, não sendo observadas diferenças na expressão de células B-1a. Esses resultados estão de acordo com os dados relatados por Linehan et al., (2014), os quais demonstraram aumento dessas células, principalmente, de células B-2 em animais idosos, concluindo que esse acréscimo pode ser devido ao aumento de fatores solúveis e, consequentemente, o recrutamento e expansão das mesmas no peritônio.

O presente estudo avaliou a expressão de F4/80 nas células peritoneais, por ser um marcador específico para macrófagos (AUSTYN; GORDON, 1981) e estar presente em aproximadamente 90% das células peritoneais (CASSADO; LIMA; BARTOLUCI, 2015). Os resultados observados nesse trabalho, em relação população de macrófagos F4/80, estão de acordo com relatos da literatura, onde animais desnutridos, bem como idosos, apresentaram redução dessa marcação (FOCK et al., 2007; LISCOVSKY et al., 2011; PATTABIRAMAN; PALASIEWICZ; UCKER, 2016). Porém, vale ressaltar que, quando associada ao quadro de desnutrição em animais idosos, essa queda foi mais acentuada.

Para o desenvolvimento do processo inflamatório, além do agente infeccioso é necessário a participação de receptores imunes, como os TLRs (GRUBER; LEIFER, 2020), sendo o TLR-4 um dos receptores mais estudados: após reconhecer um estímulo como o LPS, ele irá desencadear várias ações, dentre elas, a secreção de citocinas. Contudo, o estímulo depende da força com a qual esse receptor irá desempenhar na secreção dessas citocinas, como a IL-1 e TNF (RENSHW et al.,

2002; MAA; LEU, 2016; GRUBER; LEIFER, 2020). Portanto, não é somente a quantidade de receptores, presentes na membrana, que irá influenciar na ativação da resposta mas, também, a força desse receptor (GRUBER; LEIFER, 2020).

Em nosso trabalho, o TLR-4 se mostrou afetado pela carência proteica, tanto na porcentagem quanto no MFI, sendo que tanto a idade, como o estado nutricional, afetou a expressão desse marcador. De acordo com a literatura, a expressão de TLR-4 em macrófagos peritoneais tende a se apresentar reduzida, quando comparada aos animais jovens (RENSHW et al., 2002; YAMADA et al., 2019). Porém, autores relatam que animais idosos não possuem alterada a expressão de TLR-4 em macrófagos (BOEHMER ET AL., 2004; PATTABIRAMAN; PALASIEWICZ; UCKER, 2016). Entretanto, quanto à expressão de TLR-4 em animais desnutridos, a literatura reporta diminuição dessa expressão (FOCK et al., 2007). Igualmente, foi demonstrado que a deficiência no TLR-4, ocasiona redução na expressão de citocinas como IL-6 e IL-1 (CHEN; DIPIETRO, 2017).

Alterações na membrana celular podem vir a influenciar na ativação do LPS via TLR-4. Como mostrado em um estudo, distúrbios na endocitose, alteração no maquinário endossomal e lissosomal levam a uma resposta alterada, via TLR-4, frente ao estímulo de LPS (CIESIELSK; MATYJEK; KWIATKOWSKA, 2020). Com isso, podemos ver que não depende somente da quantidade e da qualidade dos receptores de membrana, e sim, de um conjunto para que haja resposta eficiente frente a um estímulo inflamatório.

A literatura mostrou que o TLR-4 tende a induzir uma superregulação de moléculas co-estimulatórias, como o CD86, e que se faz necessária para que ocorra apresentação de antígeno para o linfócito T, sendo uma molécula importante para que ocorra tanto a interação entre a resposta imune inata com as células da resposta adaptativa, como o fortalecimento da interação entre o macrófago e o linfócito T na formação de antígenos, além de auxiliar o desenvolvimento de células dendríticas (RUGTVEI; BAKKA; BRANDTZAEG, 1997; WANG et al., 2013; GOMAA; EL-AZIZ, 2017; CIESIELSK; MATYJEK; KWIATKOWSKA, 2020).

Nossos resultados demonstram que a idade tem mais influência sobre a expressão desse marcador do que a carência proteica isolada. A literatura (MIRZA et al., 2010) demonstra resultados semelhantes, onde a idade é um fator determinante na redução da expressão de células $CD86^{+}$. Outro estudo, realizado

com macrófagos do baço, revelou que animais idosos expressam menos CD86 que animais jovens, influenciando a resposta adaptativa, devido à redução no recrutamento das células T e, com isso, diminui-se a apresentação de antígeno (CHELVARJAN et al., 2005). Porém, de acordo com o estudo de LISCOVSKY et al. (2011), camundongos idosos não apresentaram diferença com relação à marcação de CD86, quando comparados com animais jovens.

O CD86 (B7.2) é uma molécula co-estimuladora importante para que ocorra a interação entre as células da resposta imune inata, com as células da resposta adaptativa, fortalecendo a interação de célula T na formação de antígenos, além de auxiliar o desenvolvimento de células dentríticas (RUGTVEI; BAKKA; BRANDTZAEG, 1997; WANG et al., 2013; GOMAA; EL-AZIZ, 2017).

Nossos resultados demonstram que a idade tem mais influência sobre a expressão desse marcador do que a carência proteica isolada. Mirza et al. (2010) demonstram resultados semelhantes, nos quais a idade é um fator determinante na redução da expressão de células $CD86^{+}$. Outro estudo, realizado com macrófagos do baço revelou que animais idosos expressam menos CD86 que animais jovens, influenciando a resposta adaptativa, devido à redução no recrutamento das células T. Com isso, há menor apresentação de antígeno (CHELVARJAN et al., 2005). Porém, o estudo de Liscovsky et al. (2011) demonstrou que camundongos idosos não apresentaram diferença com relação à marcação de CD86, quando comparados aos animais jovens.

O CD11b/CD18 é um complexo de receptores envolvido diretamente nos processos de adesão celular. Está presente em diferentes células e auxilia na migração e adesão celular e fagocitose (ZHOU et al., 2012; FARIDI et al., 2013). Nossos resultados demonstram que o fator idade gera maior comprometimento na expressão desses receptores do que o impacto direto da desnutrição. Em um estudo que utilizou uma dieta restrita em calorias foi observada redução no marcador CD18, em células leucocitárias circulantes, e redução nas mesmas células duplo marcado para CD11b/CD18 (IKEDA et al, 2001), sendo também demonstrado aumento na expressão de CD11b, em camundongos idosos, o que pode estar relacionado `a patologias ou à capacidade do macrófago peritoneal de migrar para órgãos linfoides (LISCOVSKY et al., 2011). Entretanto, outro estudo não evidenciou alteração em

relação à expressão de CD11b/CD18 em macrófagos de camundongos idosos (Liang et al., 2009).

Com relação à funcionalidade das células, observamos comprometimento na capacidade de espraiamento e atividade fungicida em células de animais idosos ou desnutridos. Também foi evidente o comprometimento em células de animais desnutridos idosos. Estudos realizados em camundongos, de diferentes linhagens, mostraram redução no espraiamento, sem o estímulo de LPS, quando comparado à camundongos jovens. Uma hipótese levantada por esse trabalho é a de que a redução no espraiamento de células peritoneais estaria relacionada à alteração em diferentes fatores, que regulam a funcionalidade da célula, juntamente com o decaimento do funcionamento do sistema imunológico. Com isso, a redução na produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, que auxilia no estímulo e ativação dos macrófagos, estaria influenciando o processo de espraiamento dessas células (JONHSON et al., 1978; SANTOS et al., 2016). Igualmente, Murciano et al. (2008) demonstraram redução no processo de fagocitose em animais idosos, quando comparado a animais jovens.

Em relação à capacidade de produção de citocinas, observamos menor capacidade de células peritoneais dos grupos desnutridos jovens e idosos em sintetizar IL-1α, IL-6 e TNF-α. Contudo, observamos resultados inversos em relação à produção de IL-10.

O TNF- α e a IL-1 α são citocinas pró-inflamatórias, conhecidas por estimular células do sistema imunológico na fase aguda do processo inflamatório. Com relação à produção de TNF- α e a IL-1 α nos animais idosos, acreditava-se, no início, que haveria a tendência dessas citocinas se encontrarem aumentadas, devido ao estado inflamatório crônico (TONET; NÓBREGA, 2008; SEDGER; MCDEMOTT, 2014). Segundo Bruley-Rosset e Vergnon (1984), Renshw et al. (2002) e Fuentes et al. (2017), macrófagos peritoneais de animais idosos apresentam redução na secreção de TNF- α, IL-6 e IL-1 α, após o estímulo de LPS. Dados obtidos nesses trabalhos corroboraram com nossos experimentos.

A IL-6, além de aturar na imunidade inata, atua também na imunidade adaptativa, sendo uma citocina multifuncional, desempenhando papel na resposta imunológica na fase aguda, juntamente com o TNF- α e a IL-1 α (WANG et al., 2018). Na hematopoese, são considerados níveis aumentados de IL-6, normalmente

ao longo do envelhecimento, porém, estudos vêm mostrando que esse aumento de IL-6 não é um achado contínuo em todos os trabalhos, havendo divergência apontando que os níveis dessa citocina se mantêm ao longo da vida em níveis normais (BEHARK et al., 2001; BOEHMER et al., 2004; WANG et al., 2018).

A IL-10 é uma citocina conhecida por ser anti-inflamatória e secretada por diferentes tipos celulares, dentre eles o macrófago. Conhecida por inibir a síntese de algumas citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, TNF- α e IL-1 α, após o estímulo de LPS (FIORENTE et al., 1991; CRISMA, 2010; FIORENTE et al., 2016). A produção aumentada de IL-10 pode estar relacionada às doenças inflamatórias e autoimunes (HU et al., 2016). Com isso, células que agem no desenvolvimento dessas patológicas, como os macrófagos, as células dendríticas e as células B podem influenciar na produção da IL-10. Contudo, muitos trabalhos ainda trazem o macrófago como o produtor de IL-10, após o estímulo de LPS, porém, tardiamente, em camundongos idosos (BOEHMER et al., 2005).

Chelvarajan et al. (2006) obtiveram resultados semelhantes ao nosso trabalho, em relação a produção de IL-10 em macrófagos esplênicos, após o estímulo de LPS. Todas as citocinas necessitam estar balanceadas. A literatura aborda que o TNF-α e a IL-10 estão, cuidadosamente, em constante harmonia pois, o aumento do TNF-α favorece processos pró-inflamatórios. Contudo, quando há o aumento da IL-10, existe um efeito protetor (SHMARINO et al., 2001). Entretanto, em casos em que a IL-10 é secretada acima do ideal, é comum a associação com o desenvolvimento de um quadro de imunossupressão (SANTOS et al., 2016; SHMARINO et al., 2001).

Dessa forma, é reportado que o envelhecimento, bem como a carência proteica, possui capacidade de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e de aumentar a produção de IL-10, o que gera um mecanismo capaz de inibir a ativação do NFkB (MOORE et al., 2001; FOCK et al., 2010). Assim, sabendo-se que o aumento da produção de IL-10 é capaz de modular a ativação de outra via importante, ativando o fator de transcrição STAT-3 (RILEY et al., 1999; LEVY; LEE, 2002), avaliamos a expressão desse fator. Porém, não observamos diferenças entre os grupos estudados. Contudo, existem trabalhos relatando que em macrófagos esplênicos, de camundongo desnutridos, há o aumento da concentração da STAT 3, diretamente relacionado ao aumento da IL-10 (FULOP et al., 2006).

O fator de transcrição NFκB possui papel importante na resposta inflamatória (CRUZ-MACHADO, 2010; BELLET; ZACCHI. SASSONE-CORSI, 2012), e sua ativação e resposta tendem a ser rápida após estímulo inflamatório (PANNAPPON, 1998). Após a ativação da via, o NFκB que estava inativo no citoplasma celular, acoplado a sua proteína inibitória, conhecida como IκB, vai se dissociar da mesma, sendo capaz de migrar para o núcleo na forma ativa, desencadeando a expressão de genes relacionados à inflamação, como é o caso de citocinas inflamatórias (KAWAI; AKIRA, 2006; WIGGINS et al., 2010).

Nossos resultados não demonstraram que a idade influencia na expressão do NFkB, mas sim, o estado nutricional é determinante para sua expressão. De acordo com a literatura, animais desnutridos apresentam menor concentração de NFκB em células após o estímulo com LPS. Igualmente, são demonstrados resultados divergentes quando analisada a influência da idade na ativação do NFkB. Conforme resultados obtidos por Boehmer et al. (2005), o avançar da idade leva à redução na ativação do NFkB, em macrófagos de camundongos, idosos após o estímulo de LPS. Acredita-se que um dos motivos possa ser a redução da funcionalidade do receptor de TLR. Segundo Chung et al. (2000), a atividade de ligação do DNA nuclear ao NFκB se encontra elevada durante o envelhecimento, em diversos tecidos de camundongos e ratos idosos. Assim, uma das razões para o aumento da concentração de NFκB, no processo inflamatório do envelhecimento, é devido à redução de IκBα.

CONCLUSÃO

O envelhecimento e a carência proteica causaram danos hematológicos e bioquímicos. Assim, os macrófagos apresentaram capacidade reduzida de espraiamento e fagocitose. A secreção de citocinas, pró e anti-inflamatórias, foi alterada, bem como o fator de transcrição NFkB.

Dessa forma, o envelhecimento e a carência proteica são fatores que, separados ou em conjunto, afetam o perfil responsivo de macrófagos, influenciando a capacidade de resposta imunológica.

REFERÊNCIAS

ABBAS A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. **Cellular and molecular imunology**. Philadelphia: Sauders. p. 239-60, 2003.

AK,S & TAKEDA,K. Toll like receptor signalling. **Nature reviews immunology**. v.4, p.499-511, 2004

AK,S; MISAWA, T; SAITOH,T. Macrophages control innate inflammation. **Diabetes Obes Metab**. v.3, p.10-8, 2013.

ALVES, A.P; DAMASO, A.R; Dal Pai, A.R.V. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rat. **Jornal de pediatria**. 84 (3), 2008.

AMARYA, S., SINGH, K., SABHARWAL, M. Changes during aging and their association with malnutrition. **Journal Of Clinical Gerontology And Geriatrics**. v. 6, n. 3, p.78-84, 2015.

Anstead GM, Chandrasekar B, Zhang Q, Melby PC. Multinutrient undernutrition dysregulates the resident macrophage proinflammatory cytokine network, nuclear factor-kappaB activation, and nitric oxide production. **J Leukoc Biol**. v. 74, n. 6, p. 982-91, 2003.

Artyomov, M. N., Sergushichev, A and Schilling, J. D. Integrating Immunometabolism and Macrophage Diversity. **Seminars in Immunology**. p. 417–424, 2016.

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

AUSTYN, J.M; GORDON, S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. **Eur. J. Immunol**. v. 11, p. 805-815, 1981.

AZIZ, M.; HOLODICK, N.E.; ROTHSTEIN, T.L, Wang P. B-1a Cells Protect Mice from Sepsis: Critical Role of CREB. **J Immunol**. v. 199, n. 2, p. 750-760, 2017.

BAEUERLE, P.A, BALTIMORE, D. NF-kB: Ten years after. **Cel**l. v.87, p.13-20, 1996.

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

BARROS, M. B de A; GOLDBAUM, M. Challenges of aging in the context of social inequalities. **Rev. Saúde Pública**, v. 52, supl. 2, 1s, 2018.

BASHIR, S., SHARMA, Y., ELAHI, A., KHAN, F. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. **Inflammation Research**. v. 65, n. 1, p.1-11, 2015.

Batool R, Butt MS, Sultan MT, Saeed F, Naz R. Protein-energy malnutrition: a risk factor for various ailments. **Crit Rev Food Sci Nutr**. v. 55, n. 2, p. 242-53, 2015.

BECK,B., DOLLET, J. M., MAX, J.P. Refeeding afert various times of ingestion of low protein diet effects on food intake and body weight rats. **Physiol Behav**. v. 45, n.4, p.761-5, 1989.

BEHARKA, A.A., MEYDANI, M.M., WU, D., LEKA, L.S., MEYDANI, A., MEYDANI, S.N. Interleukin-6 Production Does Not Increase With Age. **Journal of Gerontology: Biological Sciences**. v.56A, n.2, p.B81-B88, 2001.
.
Bellet MM, Zocchi L, Sassone-Corsi P. The RelB subunit of NFκB acts as a negative regulator of circadian gene expression. **Cell Cycle**. v. 11, n. 17, p. 3304-11, 2012.

BOCHUD PY, CALANDRA T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. **BMJ**. v.326, p.262-6, 2003.

BODE, J.G., EHLTING, C., HÄUSSINGER, D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38MAPK–STAT3 axis. **Cellular Signalling**. v. 24, n. 6, p.1185-1194, 2012.

BOEHMAR,E.D., GORAL,J., FAUNCE,D.E., KOVACS,E.J. Age-dependent decrease in toll-like receptor 4- mediated proinflamamtory cutokine production and mitogenactivanted protein kinase expression. **Journal of Leukocyte Biology**. v.75, p.342- 349, 2004.

BOEHMER ED, MEEHAN MJ, CUTRO BT, KOVACS EJ. Aging negatively skews macrophage TLR2- and TLR4-mediated pro-inflammatory responses without affecting the IL-2-stimulated pathway. **Mech Ageing Dev**. v.126, n. 12, p. 1305-13, 2005.

BONNARDEL, J., GUILLIAMS, M. Developmental control of macrophage function. **Current Opinion In Immunology**.v. 50, p.64-74, 2018.

BORELLI, P., BARROS, F. E.V., NAKAJIMA, K., BLATT, S.L., BEUTLER, B., PERE,J., TSUJITA, M., FAVERO, G.M., FOCK,R.A. Protein-energy malnutricion halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.42, n.6, p.523-530, 2009.

BORELLI, P., BLATT, S.L., ROGERO, M.M., FOCK, R.A. Haematological alterations in protein malnutrition. **Rev. Bras. Hematol.hemoter**. v.26, n.1, p.49-56, 2004.

BOURKE, C.D.; BERKLEY, J.A; PRENDERGAST, A.J. Immune Dysfunction as a Cause and Consequence of Malnutrition. **Trends Immunol**. v. 37, n. 6, p. 386-398, 2016.

BRULEY-ROSSET,M., VERGNON,L. Interleukina-1 synthesis and activity in aged mice. **Mechanisms of Ageing na Development**. v.24, p.247-264,1984.

CAIN, D.W. et al. Identification of a tissue-specific, C/EBPβ-dependent pathway of differentiation for murine peritoneal macrophages. **J Immunol**. v. 191, n. 9, p. 4665-75, 2013.

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

CASSADO, A. A.; D'IMPÉRIO LIMA, M.R.; BORTOLUCI, K.R. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. **Front. Immunol**. v. 6, p. 225, 2015.

CASTRO, R.D., LIMA, E.O. Anti-Candida Activity and Chemical Composition of Cinnamomum zeylanicum Blume Essential Oil. Braz. Arch. **Biol. Technol**. v.56 n.5: p. 749-755, 2013.

CECÍLIO, C.A. et al. Aging alters the production of iNOS, arginase and cytokines in murine macrophages. **Braz J Med Biol Res.** v. 44, n. 7, p. 671-681, 2011.

CHELVARAJAN, R. L. Molecular basis of age-associated cytokine dysregulation in LPS-stimulated macrophages. **Journal Of Leukocyte Biology**. v. 79, n. 6, p. 1314-1327, 2006.

CHELVARAJAN, R.L, COLLINS, S.M, VAN WILLIGEN, J.M, BONDADA. S. The unresponsiveness of aged mice to polysaccharide antigens is a result of a defect in macrophage function. **J Leukoc Biol**. v. 77, n.4, p.503-12, 2005.

CHUNG, H. Y; KIM, H. J; JUNG, K J; YOON, J. S; YOO, M. A; KIM, K. W; YU, B. P. The inflammatory process in aging. **Reviews in Clinical Gerontology**. v. 10, n. 3, p. 207-222, 2000.

COCHET, F.; PERI, F. The Role of Carbohydrates in the Lipopolysaccharide (LPS)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signalling. **Int**. **J. Mol. Sci**. v. 18, p. 2318, 2017.

CORAZZINE, R. 1993. 156f. Avaliação morfo-fisiológica de macrófagos peritoneais de camundongos submetidos ao choque térmico. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo: São Paulo, 1993.

CORCORAN, C; MURPHY, C; CULLIGAN, E. P; WALTON, J; SLEATOR, R. D. Malnutrition in the elderly. **Science Progress**. v. 102, n. 2, p. 171-180, 2019.

CORLISS, B. A.; AZIMI, M. S.; MUNSON, J. M.; PEIRCE, S. M.; MURFEE, W. L. Macrophages: an inflammatory link between angiogenesis and lymphangiogenesis. **Microcirculation**. v. 23, n. 2, p. 95-121, 2016.

CORSETTI, G.; Body Weight Loss and Tissue Wasting in Late Middle-Aged Mice on Slightly Imbalanced Essential/Non-essential Amino Acids Diet. **Front Med**. v.17; p.5-136, 2018.

COURTNEY-MARTIN, G. et al.. Protein Requirements during Aging. **Nutrients**. v. 8, n. 8, 2016.

COUTO, J.L.A., VIE, R. C.S., BARBOSA, J.M., MACHADO, S.S., FERRE, H.S. Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo Schistossoma manson. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41, n.4, p.390-393, 2008.

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

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**. v.50, n.4, p.434-461, 2010.

CRUZ-MACHADO, S.S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulado da transcrição gênica via fator de transcrição NF-κB. **Revista do Biologo**. v.4, 2010.

CUPPARI, L. **Nutrição: nas doenças crônicas não transmissíveis**. Barueri: Manolo, 2009.

DAKSHINAMURTI, K.; ZEMPLENI, J. **Nutrients and Cell Signaling**. Ed Taylor & Francis, 2005.

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

DE LA FUENTE, M.; MUÑOZ, M.L. Impairment of Phagocytic Process in Macrophages from Young and Old Mice by Protein Malnutrition. **Ann. Nutr. Metab**. v.36, p.41-47, 1992.

DE MARTINIS, M.; FRANCESCHI, C.; MONTI, D.; GINALDI, L. Inflamm-ageing and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. **FEBS Lett**. v. 579, n. 10, p. 2035-9, 2005.

DE OLIVE, D. The effects of protein malnutrition on the TNF-RI and NF-κB expression via the TNF-α signaling pathway. **Cytokine**. v. 69, n. 2, p.218-225, 2014.

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

DIXON, D.R.; DARVEAU, R.P. Heterogeneidade de lipopolissacarídeos: respostas inatas do hospedeiro à modificação bacteriana da estrutura lipídica A. **Journal of Dental Research**. v. 84, n. 7, p. 584–595, 2005.

DOBROVOLSKAIA, M.A; VOGEL, S.N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. **Microbes Infect**. v. 4, n. 9, p. 903-14, 2002.

DOS SANTOS, G.G. The influence of protein malnutrition on biological and immunomodulatory aspects of bone marrow mesenchymal stem cells. **Clin Nutr**. 36(4):1149-1157, 2017.

DUMAS, 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, 1971.

DUQUE, G. A., DESCOTEAUX, A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. **Frontiers In Immunology**. v. 5, p.1-12, 2014.

ENGELHEART, S.; BRUMMER, R. Assessment of nutritional status in the elderly: a proposed function-driven model. **Food Nutr Res**. v. 17, p. 62, 2018.

ESQUENAZI, D. A. Imunossenescência: as alterações do sistema imunológico provocadas pelo envelhecimento. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, Uerj, Rio de Janeiro**, v. 7, n. 1, p.38-45, 2008.

EWER, I., RIZZO, L. V., KALIL FILHO, J. **Imunologia e envelhecimento**. São Paulo: Einstein, v. 6, n. 1, p.13-20, 2008.

FAN, Y.; MAO, R.; YANG, J. NF-κB and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. **Protein Cell**. v.4, n. 3, p. 176-85, 2013.

FECHINE, B. R. A. O processo de envelhecimento: as principais alterações que acontecem com o idoso com o passar dos anos. **Inter Science Place**, v. 1, n. 20, p.106-132, 2012.

FOCK, R.A. et al.Effects of protein-energy malnutrition on NF-kappaB signalling in murine peritoneal macrophages. **Inflammation**, v.33, n.2, p.101-109, 2010.

FOCK, R.A; et al. Protein-energy Malnutrition Modifies the production of interleukin-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) in a murine model. **J Nutr Sci Vitaminol**. v. 54, n. 5, p. 371-377, 2008

_____. Avaliação de aspectos da resposta inflamatória desencadeada pelo lipopolissacarídeo (LPS) em desnutrição proteica experimental. Quantificação do receptor de LPS (CD14/TLR-4) e do fator de transcrição NFkB, São Paulo, 2005.
_____ et.al. Proteinenergy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD 14 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.

FRIES, A. T.; PERE, D. C. Teorias do Envelhecimento Humano. **Revista Contexto & Saúde**. v. 11, n. 20, p. 507-514, 2013.

FUENTES, E, FUENTES, M, ALARCÓN, M, & PALOMO, I. Immune System Dysfunction in the Elderly. **Anais da Academia Brasileira de Ciências.** v. 89, n. 1, p. 285-299, 2017.

FULOP, T. et al. Cytokine receptor signalling and aging. **Mech Ageing Dev**. v. 127, n. 6, p. 526-37, 2006.

GARCIA, E.O.J.J and De La FUENTE, M. Ageing modulate some aspects of the non-specific immune reponse of murine macrophages and lymphocytes. **Exp. Physiol**. v.85, n.5, p. 519-525, 2000.

GARDIZANI, T. Phagocytosis and nitric oxide production by peritoneal adherent cells in response to Candida albicans in aging: a collaboration to elucidate the pathogenesis of denture stomatitis. **J. Appl. Oral Sci**.v. 25, n. 3, p. 265-273, 2017.

GLEZER, I. et al. O fator de transcrição NF-kapaB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Revista Brasile de Psiquiatria**, v.22, p.26-30, 2000.

GOMEZ, C. R., BOEHMER, E. D., KOVACS, E. J. The aging innate immune system. **Curr Opin Immunol**. n. 17, p. 457-462, 2005.

GONZÁLEZ-MURILLO, Á. The NFKB Inducing Kinase Modulates Hematopoiesis During Stress. **Stem Cells**, v.33, p.2825-2837, 2015.
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, 1949.

GREENBERG, S., GRINSTEIN, S. Phagocytosis and innate immunity. **Current Opinion In Immunology**, v. 14, n. 1, p.136-145, 2002.

GROARKE, E.M.; YOUNG, N.S. Aging and Hematopoiesis**. Clin Geriatr Med**. v. 35, n. 3, p. 285-293, 2019.

HAGOPIAN, K; RAMSEY, J.J.; WEINDRUCH, R. Caloric restriction increases gluconeogenic and transaminase enzyme activities in mouse liver. **Exp Gerontol**. v. 38, n. 3, p. 267-78, 2003.

HARLOW, E.; LANE, D. **Using Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor.** NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

HARIRI, N.; THIBAULT, L. High- fat diet-induced obsesity in animal models. **Nutr. Research Reviews**. 23: 270-99, 2010.

HASTREITER, A. A. et. Al. Protein malnutrition impairs bone marrow endothelial cells affecting hematopoiesis. **Clinical Nutrition**. v. 39, n. 5, p. 1551–1559, 2020.

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

HE, W. et al. Immune Cell Number, Phenotype, and Function in the Elderly with Sepsis. **Aging and Disease**. v. 12, n. 1, 2020.

HERSCOWITZ, H.B. et al. **Manual of macrophages methodology**. M. Dekker, 1981.

HILLION, S. et al.The Innate Part of the Adaptive Immune System. **Clinic Rev Allerg Immunol**. v. 58, p. 151–154, 2020.

HU, X. et al. Integrin CD11b attenuates colitis by strengthening Src-Akt pathway to polarize anti-inflammatory IL-10 expression. **Sci Rep**. v. 6, p. 26252, 2016.

IBGE, Idosos indicam caminhos para uma melhor idade, (censo 2020). Disponível em:https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/24036-idosos-indicam-caminhos-para-uma-melhor-idade. Acessado em 20 de março de 2020.

IKEDA, S. A. Dietary Restriction Impairs Neutrophil Exudation by Reducing CD11b/CD18 Expression and Chemokine Production. **Arch Surg**. v.136, n. 3, p. 297–304, 2001.

JOHNSON, D.R., FERNANDES, G., DOUGLAS, S.D. Age related decline in cytoplasmic spreading of mouse peritoneal macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**. v.2, p.347-354, 1978.

JOSEPHSON, A. M. et al. Age-related inflammation triggers skeletal stem/progenitor cell dysfunction. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**. v. 116, n. 14, p. 6995-7004, 2019.

KANDHAYA-PILLAI, R. et al. TNFα-senescence initiates a STAT-dependent positive feedback loop, leading to a sustained interferon signature, DNA damage, and cytokine secretion. **Aging** (Albany NY). v.9, p.2411-2426, 2017.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Cell Death Differ**. v.13, n. 5, p. 816-25, 2006.

KIM, D.; LIM, H. Association between combinations of nutritional status and quality of life and food purchasing motives among the elderly in South Korea. **Health Qual Life Outcomes**. v.18, p. 186, 2020.

KINDT, T. J.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNE, B. A. **Imunologia de Kuby**. 6ª ed. Porto Alegre: Armed, 2008.

LANDI, F. Protein Intake and Muscle Health in Old Age: **From Biological Plausibility to Clinical Evidence.Nutrients**. v. 8, n. 5, p.295- 295, 2016.

LANDI, F. et al. A. J. Muscle loss: The new malnutrition challenge in clinical practice. **Clinical Nutrition**. v. 38, n. 5, p. 2113–2120, 2019.

LAWRENCE,T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. v.1, n. 6, p. a001651, 2009.

LEDESMA-MARTINEZ, E. Caseins as Regulators of Hematopoiesis. **Breastfeeding and Formula Feeding Infants [Working Title],** p. 1-15, 2020.

LEVY, D.E.; LEE, C.K. What does Stat3 do? **J Clin Invest**. v.109, n. 9, p. 1143-8, 2002.

LI, Q.; VERMA, I.M. NF-kappaB regulation in the immune system. **Nat Rev Immunol**. v. 2, n. 10, p. 725-34, 2002.

LIANG, S. Age-related alterations in innate immune receptor expression and ability of macrophages to respond to pathogen challenge in vitro. **Mech Ageing Dev**. v. 130, n. 8, p. 538-46, 2009.

LIMA, Fabiana da Silva et al. 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**, 2012.

Lima-Costa MF, de Andrade FB, de Souza PRB Jr, Neri AL, Duarte YAO, Castro-Costa E, de Oliveira C. The Brazilian Longitudinal Study of Aging (ELSI-Brazil): Objectives and Design. **Am J Epidemiol**. v.187, n.7, p.1345-1353, 2018.

LINEHAN, E., FITZGERALD, D.C. Ageing and the immune system: focus on macrophages. **Eur J Microbiol Immunol**. v.5, n.1, p.14–24, 2015.
LINEHAN, E. et. al. Aging impairs peritoneal but not bone marrow-derived macrophage phagocytosis. **Aging Cell**. v. 13, n. 4, p. 699-708, 2014.

LU, Young-Chen; YEH, Wen-Chen.; OHASHI, P.S. LPS/TLR4 Signal transduction pathway. **Cytokine**. v.42, p.145-151, 2008.

MALDONADO, R.F.; SÁ-CORREIA, I.; VALVANO, M.A. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. **FEM Microbiology Reviews**. v.40, n.4, p.480-493, 2016.

MALGORZATA-MILLER, G. Bartonella quintana lipopolysaccharide (LPS): structure and characteristics of a potent TLR4 antagonist for in-vitro and in-vivo applications. **Sci Rep**. v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

MANKAN, A.K.. NF-κB regulation: the nuclear response. **J. Cell. Mol. Med**, v.13, n 4, p. 631-643, 2009.

MARSHALL, S. et al. A systematic review and meta-analysis of criterion validity of nutrition assessment tools for diagnosing protein-energy malnutrition in the older community setting (the MACRo stydy). **Clinical Nutrition**. v. 37, n. 6, p. 1902-1912, 2018.

MARTINEZI, F.O. ;GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Reports**. v.6, n.13, p.1-13, 2014.

MATSUKAWA, A. Aberrant Inflammation and Lethality to Septic Peritonitis in Mice Lacking STAT3 in Macrophages and Neutrophils. **The Journal Of Immunology**. v. 171, n. 11, p. 6198-6205, 2003.

MAZZACCARA, C. et al. Age-Related Reference Intervals of the Main Biochemical and Hematological Parameters in C57BL/6J, 129SV/EV and C3H/HeJ Mouse Strains. **PLoS ONE**, v.3, n.11, 2008.

MESQUITA, D.J.Sistema Imunitário- Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev.Bras.Reumatol**. v.50, n.5, p.552-80, 2010.

MILLER, K. N. et al. Aging and caloric restriction impact adipose tissue, adiponectin, and circulating lipids. **Aging Cell**. v. 16, n. 3, p. 497-507, 2017.

MIRZA, N. B7-H1 expression on old CD8+ T cells negatively regulates the activation of immune responses in aged animals. **J Immunol**. v.184, n.10, pp.5466-5474, 2010.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E; LEATHERS, H.; DORSHKIND, K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. **Nat Immunol**. 7(3):293-301, 2006.

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

MOORE, K.W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**. v. 19, p.683-765, 2001.

MURCIANO, C. et al. Influence of aging on murine neutrophil and macrophage function against Candida albicans. **Fems Immunology & Medical Microbiology**. v. 53, n. 2, p.214-221, 2008.

NAKAJIMA, K. et al. Malnutrition suppresses cell cycle progression of hematopoietic progenitor cells in mice via cyclin D1 down-regulation. **Nutrition**. v. 30, n.1, p.82-89, 2014.

NEGISHI, Y; TAKAHASHI, H; KUWABARA, Y; TAKESHITA, T. Innate immune cells in reproduction. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**. v. 44, n. 11, p. 2025-2036, 2018.

NETEA, M. G. et al. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. **Cell Host and Microbe**. v. 25, p. 13–26, 2019.

NEWTON S, DING Y, CHUNG CS, CHEN Y, LOMAS-NEIRA JL, AYALA A. Sepsis-induced changes in macrophage co-stimulatory molecule expression: CD86 as a regulator of anti-inflammatory IL-10 response. **Surg Infect (Larchmt**).5(4):375-83, 2004.

NUNES-SOUZA, V., CÉSAR- GOMES, C.J., Do FONSECA, L.J.S., GUEDES,G.D., SMANIOTTO, S., ROBELO, L.A. Aging increase suceptibility to high fat diet-induced metabolic syndrome in C57BL/6 mice: improvement in glycemic and lipid profile after anti oxidant therapy. **Oxidative Medicinne and Cellular Longevity**. p. 1-17, 2016.

OH, S.J; LEE, J.K; SHIN, O.S. Aging and the Immune System: the Impact of Immunosenescence on Viral Infection, Immunity and Vaccine Immunogenicity. **Immune Netw**. v.19, n. 6, p. e37, 2019.

OLIVA, L. et. al. The Food Energy/Protein Ratio Regulates the Rat Urea Cycle but Not Total Nitrogen Losses. **Nutrients**. v. 11, n. 2, p. 316, 2019.

OMRAN, M.L; MORLEY, J.E. Assessment of protein energy malnutrition in older persons, Part II: Laboratory evaluation. **Nutrition**. v. 16, n. 2, p. 131-40, 2000.

PATTABMAN, G., PALASIEWICZ, K., UCKER, D.S. Toll-like Receptor function of murine macrophages, probed by cytokine induction, is biphasic and is not impaired globally with age. **Mechanisms of Ageing and Development**. n.157, p.44-59,2016.

PENCE, B.D; YARBRO, J.R. Aging impairs mitochondrial respiratory capacity in classical monocytes. **Exp Gerontol**. v.108, p.112-117, 2018.

PERKINS, E.H; MASSUCCI, J.M; GLOVER, P.L. Antigen Presentation by Peritoneal Macrophages from Young Adult and Old Mice. **CELLULAR IMMUNOLOGY**.v. 70, p. l-10, 1982.

PINTI, M. Aging of the immune system: focus on inflammation and vaccination. **European Journal Of Immunology**. v. 46, n. 10, p. 2286-2301, 2016.

POPI, A. F. et al. Co-ordinated expression of lymphoid and myeloid specific transcription factors during B-1b cell differentiation into mononuclear phagocytesin vitro. **Immunology**. v. 126, n. 1, p. 114-122, 2009.

Potter, O. V. A. Young and aged TLR4 deficient mice show sex-dependent enhancements in spatial memory and alterations in interleukin-1 related genes. **Brain, Behavior, and Immunity**. v.76, p. 37–47, 2019.

RABINOVITCH, M.; DESSTEFANO, M.J. Macrophages spreading in vitro . Magnese and other metals as inducer or as co-factors for induced spreading. **Exper Cell Res**. v.79, p.432-30, 1973.

RAMALHO, R. et al. Immunometabolism: new insights and lessons from antigen-directed cellular immune responses. **Seminars in immunopathology**. v. 42, n. 3, p. 279–313, 2020.

REA, I. M; GIBSON, D. S.; MCGILLIGAN, V; MCNERLAN, S. E.; ALEXANDER, H. D; ROSS, O. A. Age and Age-Related Diseases: role of inflammation triggers and cytokines. **Frontiers In Immunology**. v. 9, p. 1-28, 2018.

REEVES, P.G., NIELSEN, F.H., FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final repport of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing. **J.Nutr**. n.1, p.1939-51, 1993.

RENSHAW, M.Cutting Edge: Impaired Toll-Like Receptor Expression and Function in Aging. **The Journal Of Immunology**. v. 169, n. 9, p.4697-4701, 2002.

RILEY, J.K; TAKEDA, K.; AKIRA S.; SCHREIBER, R.D. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. **J Biol Chem**. v. 274, n. 23, p. 16513-21, 1999.

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

RODKEY, F.L. Direct Spectrophotometric Determination of Albumin in human Serum. **Clin Chem**. v.11, p.478-87, 1965.

SALMON, A.B.; RICHARDSON, A.; PÉREZ, V.I. Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? **Free Radic Biol Med**. v. 48, n. 5, p. 642-55, 2010.

SANTOS, A.C. et al. Intravenous Glutamine Administration Modulates TNF-α/IL-10 Ratio and Attenuates NFkB Phosphorylation in a Protein Malnutrition Model. **Inflammation**. v. 39, n. 6, p.1883-1891, 2016.

SANTOS, E. et al. Hematological alterations in protein malnutrition. **Nutrition Reviews**. v. 75, n. 11, p. 909-919, 2017.

SANTOS, E.W.C.O. **Estudo da função de macrófagos peritoniais de camundongos submetidos à dieta hipo e dieta hiperlipídica.** 2013. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.

SANTOS, E.W. Hematological and biochemical reference valuer for C56BL/6, Swiss Webster and Balb/c mice. **Braz.J.Vet.Res.Anim.Sci**.v.53, n.2, p.138-145, 2016.

SCHAAN, Mariza D'agord; CRUZ, Ivana B. **Análise de parâmetros hematológicos e nutricionais em idosos aparentemente saudáveis**. 2003. 145 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina e Ciências da Saúde. Rio Grande do Sul: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2003.

SCHMITT, Roland.; ANETTE, Melk. Molecular Mechanisms of Renal Aging. **Kidney International**. p. 569–579, 2017.

SCOTT, K. A. et al. Revisiting Metchnikoff: Age-related alterations in microbiota-gut-brain axis in the mouse. **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 65, p. 20–32, 2017.

SEDGER, L. M., McDEMONTT, M.F. TNF and TNF- receptors: From mediators of cells death and inflammation to therapeutic giants-post, prentand future. **Cytokines & Growth Factors Reviews**. n.25, p.453-472, 2014.

SHLISKY, J. et al. Nutritional Considerations for Healthy Aging and Reduction in Age-Related Chronic Disease. **Adv Nutr**. v. 8, n. 1, p. 17-26, 2017.

SHMARINA, G.V. Tumor necrosis factor-a/interleukin-10 balance in normal and cystic fibrosis children. **Mediators of Inflammation**. v. 10, p. 191–197, 2001.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **Journal of Clinical Investigation**. v.122, n. 3, p.787-795, 2012.

SIDDIQUE, N. et al. Malnutrition in the elderly and its effects on bone health – A review. **Clinical Nutrition Espen**. v. 21, p.31–39, 2017.

SILVA, A.P.R., COSTA,V.L., FIGUE, M.S., ANDRADE,R.S., BEZERRA,R.G.S. Perfil nutricional e bioquímico de pacientes em uso de terapia nutricional enteral em um hospital particular em Belém-PA. **Rev.Bras.Nutr.Clin**. v.30, n.1, p.21-5, 2015.

SILVA, M., VIDE, P. A., SACKSTEIN, R. E-Selectin Ligands in the Human Mononuclear Phagocyte System: Implications for Infection, Inflammation, and Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**. v.8, p.1-17, 2018.

SPEAKMAN, J. R.; MITCHELL, S. E.; MAZIDI, M. Calories or Protein? The Effect of Dietary Restriction on Lifespan in Rodents Is Explained by Calories Alone. **Experimental Gerontology**, p.28–38, 2016.

SUTAVANI, R.V. Differential control of Toll-like receptor 4-induced interleukin-10 induction in macrophages and B cells reveals a role for p90 ribosomal S6 kinases. **J Biol Chem**. v. 293, n. 7, p. 2302-2317, 2018.

TAKEDA, K. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils**. Immunity**. 10(1):39-49, 1999.

_____. et al. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. **Proc Natl Acad Sci USA**.v.15, n.8, p.3801-4, 1997.

TAKELE, Y. et al. Malnutrition in Healthy Individuals Results in Increased Mixed Cytokine Profiles, Altered Neutrophil Subsets and Function. **PLoS One**. v. 11, n. 8, p. e0157919, 2016.

TOMÉ, D. et al. Protein status modulates the rewarding value of foods and meals to maintain an adequate protein intake. **Physiology & Behavior**. v. 206, p. 7-12, 2019.

TONET, A.C.; NÓBREGA, O.T. Immunossenecênce: a relação entre leucócitos, citocinas e doenças crônicas. **Rev.Bras.Geriatr.Gerantol**. v.21, n.2, p.259-273, 2008.

VALIATHAN, R. Ashman; ASTHANA, D. Effects of Ageing on the Immune System: Infants to Elderly. **Scand J Immunol**. v.83, n.4, p.255-66, 2016.

VAN DIJK, M. Sarcopenia in older mice is characterized by a decreased anabolic response to a protein meal. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 69, p. 134 –143, 2017.

VAN DUIN., SHAW, A.C. Toll-Like Receptors in Older Adults. **Journal of The American Geriatrics Society**. v. 55, n. 9, p.1438-1444, 2007.

VENTURA, M. T. Immunosenescence in aging: between immune cells depletion and cytokines upregulation. **Clinical And Molecular Allergy**. v. 15, n.1, p.1-8, 2017.

VENTURINI, C.D. et al. Consumo de nutrientes em idosos residentes em Porto Alegre (RS), Brasil: um estudo de base populacional. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 20, n. 12, p.3701-3711, 2015.

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

WELLS, J. C. A. The double burden of malnutrition: aetiological pathways and consequences for health. **The Lancet**. v. 395, p. 75–88, 2020.

WEYH, C.; KRÜGER, K.; STRASSER, B. Physical Activity and Diet Shape the Immune System during Aging**. Nutrients**. v. 12, n. 3, p. 622, 2020.

WIGGINS, J.E. NFkappaB promotes inflammation, coagulation, and fibrosis in the aging glomerulus. **J Am Soc Nephrol**. v. 21, n. 4, p. 587-97, 2010.

WYSOKIŃSKi, A; SOBÓW, T; KŁOSZEWSKA, I.; KOSTKA, T. Mechanisms of the anorexia of aging-a review. **Age (Dordr).** v.37, n. 4, p. 9821, 2015.

YAMADA, C. et al. Age-dependent effect between MARCO and TLR4 on PMMA particle phagocytosis by macrophages. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**. v. 23, n. 8, p. 5827-5831, 2019.

ZAGO, Marco Antonio; FALCÃO, Roberto Pasetto; PASQUINI, Ricardo. **Hematologia Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004.

ZHANG, Z.; PEREIRA, S.L.; LUO, M.; MATHESON, E.M. Evaluation of Blood Biomarkers Associated with Risk of Malnutrition in Older Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Nutrients**. v. 9, p. 829, 2017.

ZHOW, X; HANSSON, G.K. Effect of sex and age on sérum biochemichal reference range in C57BL/6J mice. **Comporative medicine**.v.54, n.2, p.176-178, 2012.

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF 085.**2018-P544**

São Paulo, 04 de setembro de 2018.

Prezada Senhora,

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 04 de setembro de 2018, **aprovou** as alterações propostas para o projeto de pesquisa "**O Papel da Disfunção Endotelial Associada ao Envelhecimento na Hematopoiese**" (Protocolo CEUA nº 544), conforme constante nos documentos apresentados:

a. Inclusão das alunas como colaboradoras, Renaira Oliveira da Silva e Gabriela Kodja Vivian.

b. O desligamento da aluna Carolina Carvalho Dias.

Cordialmente,

Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
Coordenadora CEUA/FCF/USP

Ilma. Sra.
Pesquisadora: Araceli Aparecida Hastreiter
Orientador: 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 B

Histórico Escolar

Ficha do Aluno

Curso	Área	Nº Sequencial	Situação	Visualizar
➔ Mestrado	Fisiopatologia (9142)	1	Matrícula de Acompanhamento	

Preparar para imprimir

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9142 - 10929731/1 - Gabriela Kodja Vivian

Email:	gabrielakodja@usp.br
Data de Nascimento:	24/10/1996
Cédula de Identidade:	RG - 52709102-9 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharela em Biomedicina - Fundação Lusíada - Unilus Centro Universitário Lusíada - São Paulo - Brasil - 2018

Curso:	Mestrado
Programa:	Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área:	Fisiopatologia
Data de Matrícula:	11/07/2018
Início da Contagem de Prazo:	11/07/2018
Data Limite para o Depósito:	11/01/2021
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Ricardo Ambrosio Fock - 11/07/2018 até o presente. Email: hemato@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 11/07/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 06/08/2019
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 11/07/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 27/07/2020
Impresso em: 16/10/2020 13:15:26

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9142 - 10929731/1 - Gabriela Kodja Vivian

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5757-8/2	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	02/08/2018	14/11/2018	15	1	100	A	N	Concluída
QBQ5747-11/4	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	27/08/2018	02/09/2018	15	1	100	A	N	Concluída
ICB5752-1/5	Como Comunicar Sua Ciência: Melhorando a Oratória e a Empatia com o Público (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	27/08/2018	10/09/2018	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5709-7/1	Biologia Molecular em Análises Clínicas	12/09/2018	10/10/2018	60	4	100	A	N	Concluída
BIF5707-4/1	Regulação da Expressão Gênica em Processos Fisiológicos (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	17/09/2018	28/10/2018	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BIF5794-2/2	Sinalização Celular (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	02/10/2018	10/12/2018	120	8	80	B	N	Concluída
VPS5717-7/3	Preparação Pedagógica (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	12/03/2019	25/03/2019	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5793-14/2	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	12/03/2019	24/06/2019	15	1	100	A	N	Concluída
FBA5728-4/8	Aprimoramento Pedagógico	02/04/2019	30/04/2019	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5756-1/3	Alergia Alimentar	29/04/2019	05/05/2019	30	0	-	-	N	Turma cancelada
FBF5805-2/7	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	20/08/2019	28/10/2019	90	6	100	A	N	Concluída
MCM5926-1/3	Células e Moléculas da Resposta Imune Inata (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	23/09/2019	06/10/2019	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	29
Estágios:			
Total:	0	25	29

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Anexo C

Currículo Lattes

Gabriela Kodja Vívian

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/7148367141278438
ID Lattes: **7148367141278438**
Última atualização do currículo em 14/10/2020

Possui graduação em Biomedicina pelo Centro Universitário Lusíada (2017). Tem experiência na área de análises clínicas, e compreende a técnica de Western Blotting. Atualmente sou mestranda aluna do Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, desenvolvendo o projeto Avaliação da via sinalizadora do fator de transcrição NFkB ativada pelo lipopolissacarídeo em um modelo de envelhecimento submetido a carência proteica. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Gabriela Kodja Vívian
Nome em citações bibliográficas	VÍVIAN, G. K.;KODJA, GABRIELA
Lattes iD	http://lattes.cnpq.br/7148367141278438

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2018
Mestrado em andamento em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Conceito CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Avaliação da via sinalizadora do fator de transcrição NFkB ativada pelo lipopolissacarídeo em um modelo envelhecido submetido a carência proteica,Orientador: Ricardo Ambrósio Fock.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2014 - 2017
Graduação em Biomedicina.
Centro Universitário Lusíada, UNILUS, Brasil.
Título: Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas alogênico, autólogo e singênico: Vantagens e Desvantagens.
Orientador: Profa. Me. Eliana Cláudia Perroud Morato.

2011 - 2013
Ensino Médio (2º grau).
colegio stella maris, SM, Brasil.

Atuação Profissional

Centro Universitário Lusíada, UNILUS, Brasil.

Vínculo institucional

2016 - 2017
Vínculo: Estudante, Enquadramento Funcional: Estudante

Projetos de pesquisa

2017 - 2017
Trasplante de célula-tronco hematopoiética alogênico, autólogo e sinigênico: vantagens e desvantagens
Descrição: Visa avaliar o cenario dos trasplantes no Brasil, mostrar as dificuldades de se achar um doador compativel, quais as doenças onco hematologica que obtem melhor resposta em relação aos tipos de trasplantes abordados nesse trabalho..
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (1) .

Integrantes: Gabriela Kodja Vívian - Integrante / Eliana Claudia Perroud Morato Ferreira - Coordenador.

Idiomas

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

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1. SARTORI, TALITA ; SANTOS, ANDRESSA CRISTINA ANTUNES ; OLIVEIRA DA SILVA, RENAIRA ; **KODJA, GABRIELA** ; ROGERO, MARCELO MACEDO ; BORELLI, PRIMAVERA ; FOCK, RICARDO AMBRÓSIO . Branched chain amino acids improve mesenchymal stem cell proliferation, reducing nuclear factor kappa B expression and modulating some inflammatory properties. NUTRITION JCR, v. 78, p. 110935, 2020.

Apresentações de Trabalho

1. SILVA, R. O. ; HASTREITER, A. A ; **VÍVIAN, G. K.** ; SANTOS, A. C. A. ; MAKIYAMA, E. N ; BORELLI, P ; FOCK, R. A . Influência do envelhecimento sobre aspectos imunomodulatórios de células tronco mesenquimais medulares em situação de desnutrição proteica. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. **VÍVIAN, G. K.**; SANTOS, A. C. A. ; Da Silva, R.O ; BORELLI, P ; FOCK, R. A . Avaliação Da Produção De Citocinas Relacionadas A Resposta Imunológica Inata Em Modelo De Envelhecimento Submetido A Carência Proteica. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 15ºCongresso Nacional Da Sociedade Brasileira De Alimentação E Nutrição -SBAN. 2019. (Congresso).
2. Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular- HEMO 2017. 2017. (Congresso).
3. Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular- HEMO 2017.Transplante De Clelulas-tronco Hematopoeticas Alogenico, Autologo e Singenico: Vantagens e Desvantagens. 2017. (Outra).
4. Curso de Terapia Celular (XXI Congresso da SBTMO). 2017. (Outra).
5. Transfusão de Sangue em Clínica, Cirúrgica e Obstetrícia, Atualização das Indicações, Ri Riscos e Dilemas e XXV Simposio Internacional de Hemoterapia e Terapia Celular. 2017. (Simpósio).
6. XXI Congresso da Sociendade Brasileira de Trasplante de Medula Óssea - SBTMO 2017. 2017. (Congresso).
7. Board Review- X Curso de Revisão em Hematologia e Hemoterapia + II Sipósio multidisciplinar em Hematologia e Hemoterapia e Trasplante de Medula Óssea. 2016. (Simpósio).
8. Curso de Atualização em Laboratório Clínico. 2016. (Outra).
9. 8º Curso de interação clínico laboratorial- presencial. 2015. (Congresso).
10. Curso de atualização em controle de qualidade em hematologia e coagulação. 2015. (Outra).
11. XXIII Simpósio internacional de hemoterapia e terapia celular - presencial. 2015. (Simpósio).
12. curso teórico e práatico de coleta, processamento e congelamento de células-tronco do sangue do cordão umbilical. 2014. (Outra).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 16/10/2020 às 13:20:21

Imprimir currículo

/