



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**SAMILLY ALBUQUERQUE RIBEIRO**

**IMPACTO TEMPORAL DESENCADEADO PELA DIETA BÁSICA REGIONAL**  
**SOBRE A BARREIRA EPITELIAL INTESTINAL EM MODELO *in vivo***

**FORTALEZA**

**2017**

SAMILLY ALBUQUERQUE RIBEIRO

**IMPACTO TEMPORAL DESENCADEADO PELA DIETA BÁSICA REGIONAL  
SOBRE A BARREIRA EPITELIAL INTESTINAL EM MODELO *in vivo***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

R372i Ribeiro, Samilly Albuquerque.  
IMPACTO TEMPORAL DESENCADEADO PELA DIETA BÁSICA REGIONAL SOBRE A  
BARREIRA EPITELIAL INTESTINAL EM MODELO *in vivo* / Samilly Albuquerque Ribeiro. – 2017.  
99 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

1. Desnutrição.. 2. DBR. 3. Barreira morfofuncional. I. Título.

CDD 615.1

---

SAMILLY ALBUQUERQUE RIBEIRO

**IMPACTO TEMPORAL DESENCADEADO PELA DIETA BÁSICA REGIONAL  
SOBRE A BARREIRA EPITELIAL INTESTINAL EM MODELO *in vivo***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Aos Camundongos.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre conceder oportunidades e ajudar a superar as dificuldades do dia a dia.

À FUNCAP, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima pela oportunidade, por todo conhecimento compartilhado e toda serenidade nos momentos decisivos. Obrigada pela disposição em contribuir para o meu crescimento científico e por cada palavra de fé transmitida.

Ao Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá, que mais uma vez participou da minha caminhada, sempre com muita disposição e alfinetadas para alegrar o dia. Muito obrigada pelos conselhos, apoio, tempo desperdiçado avaliando essa louca e orientação nos momentos decisivos.

Aos participantes da banca examinadora de qualificação, Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, Dra. Marjorie Moreira Guedes e Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá pelo tempo dedicado e as valiosas contribuições ao trabalho.

Aos participantes da banca examinadora de defesa, Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento e Prof. Dr. Manasses Claudino Fonteles por contribuir para minha formação e para o enriquecimento do trabalho. Obrigada pelo tempo dedicado.

Ao Pedro Henrique Quintela, Francisco Advane e Paloma Araújo, pelo companheirismo, toda ajuda nos momentos de decisão e conhecimento compartilhado nesta caminhada científica.

À Herlice Veras, por cada pedacinho de paciência perdido nos PCRs da vida, por cada momento de descontração, por cada ataque de nervo que você teve que aturar e pela amizade verdadeira que construímos.

Aos professores responsáveis pelos laboratórios colaboradores, Gerly Brito que permitiram a execução de protocolos experimentais importantes para o desenvolvimento do trabalho.

Aos estudantes de pós-graduação Josiane, Deiziane, Rômmulo, Daynesi que ajudaram na execução de experimentos cruciais do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia por contribuir para meu crescimento acadêmico e científico.

Aos meus avós, que infelizmente já não estão presente fisicamente, mas sempre estarão em meu coração. Agradeço todo apoio, toda preocupação e todas as provações que me

fizeram passar todos esses anos. Agradeço cada alegria, cada raiva, cada carinho compartilhado.

Aos meus pais, meu tio e minha madrinha, que mesmo sem entender bem o que eu faço, estão sempre na torcida. Obrigada por serem minha base, por serem uma família de verdade e por todo carinho.

À minha irmã, Samya Ribeiro por ser minha mão de obra escrava nas idas ao laboratório aos domingos, por toda “paciência” nos meus momentos de sobrecarga e por toda descontração nesse período de decisão. Obrigada por me acompanhar sempre e ser meu braço direito.

A Ana Karolina dos Santos, Mariana Bona, Marília Maia e Mara Prata por me receberem tão bem no laboratório, por compartilhar risadas, tristezas e expectativas.

À família LDI que me recebeu com tanto carinho e hoje fazem parte da minha segunda família.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

“Começos podem chegar ao fim, assim como o fim pode se tornar um começo.” (Autor: desconhecido).

## RESUMO

A desnutrição é, ainda hoje, uma realidade em regiões de baixo poder socioeconômico, como as regiões Norte e Nordeste do Brasil. A compreensão de fisiopatologias desencadeadas por dietas multideficientes de nutrientes é importante para aplicação de tratamentos adequados. O presente estudo visou caracterizar as alterações cinéticas na barreira funcional gastrointestinal de camundongos desnutridos pela dieta básica regional (DBR), uma dieta típica da região do semiárido brasileiro. Camundongos C57BL/6 machos (21 dias de idade) foram induzidos à desnutrição pela DBR por um período total de 21 dias. Parâmetros como peso, consumo de água e ração foram avaliados a cada dois dias. A bioimpedância elétrica, o comprimento da cauda, a avaliação morfométrica, permeabilidade intestinal (teste de lactulose e manitol), transcrição gênica e expressão proteica das junções firmes, transportadores transmembranares e CFTR foram avaliadas no 7º, 14º e 21º dia. A DBR reduziu de modo significativo ( $P < 0,001$ ) o peso e o ganho de peso a partir do 7º dia experimental, assim como os valores de massa magra ( $P < 0,05$ ), líquido corporal total ( $P < 0,01$ ) e fluído extracelular ( $P < 0,05$ ). O fluído intracelular reduziu ( $P < 0,05$ ) no grupo desnutrido apenas no 14º dia, enquanto a massa gorda reduziu ( $P < 0,05$ ) a partir do 14º dia. A DBR alterou principalmente a morfologia intestinal do jejuno, com redução significativa da cripta ( $P = 0,002$ ) e aumento significativo da razão vilos/cripta ( $P = 0,049$ ) no 7º dia; redução da altura do vilos ( $P = 0,022$ ) e da cripta ( $P = 0,007$ ) no 14º dia; e redução significativa da cripta ( $P = 0,001$ ) e da razão vilos/cripta ( $P = 0,012$ ) no 21º dia. No teste de permeabilidade intestinal, houve redução significativa tanto da lactulose ( $P = 0,004$  e  $P = 0,015$ ) quanto do manitol ( $P = 0,02$  e  $P = 0,031$ ) nos animais desnutridos no 7º e 14º dia experimental e aumento da razão L/M ( $P = 0,0317$ ) nos animais desnutridos no 14º dia. Os níveis de RNAm de claudina-1 e ocludina foram reduzidos ( $P < 0,05$ ) nos grupo desnutrido no 14º dia, enquanto que claudina-2 e ocludina foram reduzidos ( $P < 0,05$ ) no 21º dia. A DBR aumentou os níveis de PepT-1 ( $P < 0,05$ ) no 7º, os níveis de SGLT-1 no 7º e 14º ( $P < 0,05$ ) dia, ao passo que, CFTR e SGLT-1 reduziu ( $P < 0,05$ ) no 21º dia. A expressão proteica foi aumentada apenas para ocludina nos animais desnutridos ( $P < 0,05$ ) no 14º dia. A DBR é capaz de desnutrir camundongos recém-desmamados, reduzindo o ganho de peso, a massa magra, a massa gorda e os fluídos corporais, além de alterar de forma dinâmica a morfologia intestinal do jejuno, permeabilidade intestinal e níveis de RNAm de junções firmes, transportadores intestinais e canal de cloreto.

**Palavras-chave:** Desnutrição. DBR. Barreira morfofuncional. Junções firmes.

## ABSTRACT

### IMPACT TIME UNLEASHED BY DIET BASIC REGIONAL ON INTESTINAL EPITHELIAL BARRIER IN MODEL *in vivo*

Malnutrition is still a reality in regions of low socioeconomic power, such as the North and Northeast regions of Brazil. The understanding of the pathophysiologies triggered by multideficient diets is important for application of suitable treatments. The present study aimed to characterize the dynamic changes in the gastrointestinal barrier of mice malnourished by the regional basic diet (RBD), a diet typical of the Brazilian semiarid region. Male C57BL/6 mice (21 days old) were induced to DBR malnutrition for a total period of 21 days. The bioelectrical impedance, the tail length, the morphometric evaluation and intestinal permeability (lactulose and mannitol test), gene transcription and protein expression of tight junctions, transmembrane transporters and CFTR were evaluated on the 7th, 14th and 21st days. The RBD significantly reduced ( $P < 0.001$ ) weight and weight gain from the 7th day, as well as reduced body mass values ( $P < 0.05$ ), total body fluid ( $P < 0.01$ ) and extracellular fluid ( $P < 0.05$ ). Intracellular fluid decreased ( $P < 0.05$ ) in the malnourished group only at 14 days, while fat mass decreased ( $P < 0.05$ ) in the 14th. The RBD altered the intestinal morphology of jejunum, with a significant reduction of the crypt height ( $P = 0.002$ ) and a significant increase of the villus/crypt ratio ( $P = 0.049$ ) on 7th; reduction of villi ( $P = 0.022$ ) and crypt ( $P = 0.007$ ) height on 14th; and a reduction of the crypt ( $P = 0.001$ ) and the villus/crypt ratio ( $P = 0.012$ ) on day 21. In L/M, there was significant reduction of both lactulose ( $P = 0.004$  and  $P = 0.015$ ) and mannitol ( $P = 0.02$  and  $P = 0.031$ ) in malnourished animals at the 7th and 14th experimental days and an increase in the L/M ratio ( $P = 0.0317$ ) in malnourished animals on the 14th. The levels of claudin-1 and occludin mRNA were reduced ( $P < 0.05$ ) in the malnourished group on day 14, while claudin-2 and occludin levels were reduced ( $P < 0.05$ ) at the 21st day. DBR increased levels of PepT-1 ( $P < 0.05$ ) in the 7th, SGLT-1 levels in the 7th and 14th ( $P < 0.05$ ) day, whereas, CFTR and SGLT-1 reduced ( $P < 0.05$ ) on the day 21. Protein expression was increased only to occludin in malnourished animals ( $P < 0.05$ ) on the 14th day. The DBR was capable of malnourish weanling mice, reducing weight gain, lean mass, fat mass and body fluids, as well as dynamically change the intestinal morphology of the jejunum, intestinal permeability and mRNA levels of tight junctions, intestinal transporters and chloride channel.

**Keywords:** Malnutrition. RBD. Morphofunctional barrier. Tight junctions.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Morfologia da barreira epitelial do intestino delgado.....	25
<b>Figura 2</b>	Barreira epitelial intestinal e distribuição das diferentes famílias de células epiteliais no intestino delgado.....	26
<b>Figura 3</b>	Anatomia do complexo juncional de células epiteliais intestinais.....	27
<b>Figura 4</b>	Informação nutricional das dietas controle e DBR.....	34
<b>Figura 5</b>	Protocolo experimental da indução da desnutrição pela DBR.....	35
<b>Figura 6</b>	Efeitos da DBR no peso, ganho de peso, comprimento de cauda de camundongos.....	45
<b>Figura 7</b>	Consumo de dieta e água por um período de 21 dias no modelo de desnutrição por DBR.....	46
<b>Figura 8</b>	Índice de massa corporal, massa gorda e massa livre de gordura em animais desnutridos por DBR.....	47
<b>Figura 9</b>	Valores de água corporal total, fluídos extracelulares e intracelulares em animais desnutridos por DBR.....	48
<b>Figura 10</b>	Dinâmica na morfologia intestinal do jejuno induzida por DBR.....	50
<b>Figura 11</b>	Dinâmica na morfologia intestinal do íleo induzida por DBR.....	52
<b>Figura 12</b>	Percentual de excreção de lactulose, manitol e razão lactulose/manitol no 7º dia de consumo de DBR.....	54
<b>Figura 13</b>	Percentual de excreção de lactulose, manitol e razão lactulose/manitol no 14º dia de consumo de DBR.....	55
<b>Figura 14</b>	Percentual de excreção de lactulose, manitol e razão lactulose/manitol no 21º dia de consumo de DBR.....	56
<b>Figura 15</b>	Análise na transcrição quantitativa de claudina-1 após consumo de DBR.....	57
<b>Figura 16</b>	Análise da transcrição quantitativa relativa de claudina-2 após consumo de DBR.....	58
<b>Figura 17</b>	Análise da transcrição quantitativa relativa de ocludina após consumo de DBR.....	59

<b>Figura 18</b>	Análise da transcrição quantitativa relativa de SGLT-1 após consumo de DBR.....	60
<b>Figura 19</b>	Análise da transcrição quantitativa relativa de PepT-1 após consumo de DBR.....	61
<b>Figura 20</b>	Análise da transcrição quantitativa relativa de CFTR após consumo de DBR.....	62
<b>Figura 21</b>	Expressão quantitativa relativa e localização de claudina-2 após consumo de DBR.....	63
<b>Figura 22</b>	Expressão quantitativa relativa e localização de ocludina após consumo de DBR.....	64
<b>Figura 23</b>	Expressão quantitativa relativa e localização de SGLT-1 após consumo de DBR.....	65
<b>Figura 24</b>	Expressão quantitativa relativa e localização de PepT-1 após consumo de DBR.....	66
<b>Figura 25</b>	Avaliação cinética do consumo de DBR em camundongos recém-desmamados.....	68

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação da desnutrição de acordo com a gravidade.....	14
<b>Tabela 2</b>	Classificação de risco das taxas de prevalência por tipo de desnutrição..	16
<b>Tabela 3</b>	Oligonucleotídeos iniciadores, suas respectivas sequências e condições de PCR Genes.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DEP	Desnutrição energético proteica
CFTR	Regulador de condutância transmembranar da fibrose cística (do inglês, <i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> )
DBR	Dieta Básica Regional
ECF	Fluido extracelular ( <i>extracellular fluid</i> )
FM	Massa gorda ( <i>fat mass</i> )
FFM	Massa livre de gordura ( <i>Fat-free mass</i> )
HAZ	Altura para a idade por Z escore ( <i>height-age Z score</i> )
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência ( <i>High performance liquid chromatography</i> )
IMC	Índice de massa corporal ( <i>body mass index</i> )
ICF	Fluído intracelular ( <i>intracellular fluid</i> )
JA	Junções aderentes
JF	Junções firmes
L/M	Teste de lactulose e manitol
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos ( <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> )
MUAC	Circunferência do braço médio-superior ( <i>mid-upper arm circumference</i> )
MLCK	Cinase de cadeia leve de miosina ( <i>Myosin light-chain kinase</i> )
PepT-1	Transportador de peptídeo-1 ( <i>Peptide Transporter-1</i> )
PKC	Proteína quinase C ( <i>Protein kinase C</i> )
OMS	Organização Mundial de Saúde
RNA	Ácido ribonucléico ( <i>ribonucleic acid</i> )
SGLT-1	Transportador de glicose dependente do sódio ( <i>Sodium-glucose linked transporter</i> )
WAZ	Peso por idade ( <i>weight-for-age Z score</i> )
WHZ	Peso-por-altura ( <i>weight-for-height Z score</i> )
ZO-1	Zonula ocludens-1

## LISTA DE SÍMBOLOS

Da	Dalton
Na <sup>+</sup>	Sódio
K <sup>+</sup>	Potássio
cm	Centímetros
°C	Graus Celsius
±	Mais ou menos
Kg	Quilogramas
m	Metros
M	Molar
µg	Microgramas
MHz	Megahertz
µL	Microlitros
µM	Micromolar
mg	Miligramas
µm	Micrômetro
mL	Mililitros
%	Por cento
®	Marca Registrada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1</b>	<b>Desnutrição: definição, classificação e aspectos clínicos</b> .....	14
<b>1.2</b>	<b>Aspectos epidemiológicos da desnutrição</b> .....	16
<b>1.3</b>	<b>Implicações sociais da desnutrição</b> .....	18
<b>1.4</b>	<b>Eventos fisiopatológicos e moleculares da desnutrição</b> .....	20
<b>1.5</b>	<b>Dieta Básica Regional</b> .....	23
<b>1.6</b>	<b>Barreira morfofuncional intestinal</b> .....	24
<i>1.6.1</i>	<i>Morfologia da barreira funcional</i> .....	24
<i>1.6.2</i>	<i>Aspectos estruturais e regulação das Junções firmes</i> .....	27
<i>1.6.2.1</i>	<i>Proteínas Claudinas</i> .....	28
<i>1.6.2.2</i>	<i>Proteínas Ocludinas</i> .....	29
<i>1.6.2.3</i>	<i>Zonulas ocludens</i> .....	29
<i>1.6.3</i>	<i>Fisiologia da absorção de carboidratos e proteínas</i> .....	30
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA</b> .....	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	33
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	33
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Primários</b> .....	33
<b>3.3</b>	<b>Objetivos Secundários</b> .....	33
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
<b>4.1</b>	<b>Animais e comitê de ética</b> .....	34
<b>4.2</b>	<b>Dieta Básica Regional</b> .....	34
<b>4.3</b>	<b>Protocolo Experimental</b> .....	35
<b>4.4</b>	<b>Grupos Experimentais</b> .....	36
<b>4.5</b>	<b>Mensuração do desenvolvimento dos animais experimentais</b> .....	36
<b>4.6</b>	<b>Bioimpedância elétrica</b> .....	37
<b>4.7</b>	<b>Análise morfométrica</b> .....	37
<b>4.8</b>	<b>Teste de permeabilidade intestinal</b> .....	38
<i>4.8.1</i>	<i>Coleta de amostra</i> .....	38
<i>4.8.2</i>	<i>Preparação da amostra e detecção das concentrações de lactulose e manitol</i> .....	38
<b>4.9</b>	<b>Avaliação da transcrição gênica de proteínas transmembranas e das proteínas formadores de JF</b> .....	39

4.9.1	<i>Extração do RNA total</i> .....	39
4.9.2	<i>Síntese de cDNA</i> .....	40
4.9.3	<i>Reação de cadeia de polimerase quantitativo</i> .....	40
4.10	<b>Imuistoquímica</b> .....	41
4.11	<b>Análise estatística</b> .....	43
5	<b>RESULTADOS</b> .....	44
5.1	<b>Efeitos da desnutrição induzida pela DBR nos indicadores de crescimento</b> .....	44
5.2	<b>Efeitos da desnutrição induzida pela Dieta básica regional na composição corporal dos animais</b> .....	46
5.3	<b>Impacto da desnutrição induzida pela Dieta Básica Regional na morfometria intestinal</b> .....	49
5.4	<b>Alterações temporais na permeabilidade intestinal desencadeada pela desnutrição induzida pela Dieta básica regional</b> .....	53
5.5	<b>Efeitos da DBR na relativa transcrição dos transportadores transmembranas, canal iônico e junções firmes</b> .....	56
5.5.1	<i>Alterações na transcrição relativa das junções firmes desencadeadas pela DBR</i> .....	56
5.5.2	<i>Alterações na transcrição relativa dos transportadores transmembranares e canal iônico desencadeadas pela DBR</i> .....	59
5.6	<b>Expressão e localização proteica dos transportadores transmembranas e junções firmes após indução de desnutrição por DBR</b> .....	62
5.7	<b>Impacto da DBR na composição corporal, morfologia, função intestinal, transcrição e expressão proteica relativa dos transportadores e junções firmes</b> .....	67
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	69
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	81
8	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	82

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Desnutrição: definição, classificação e aspectos clínicos

A Organização Mundial de Saúde (OMS) (2006) define desnutrição, também denominada de desnutrição energético-proteica (DEP), como o consumo desequilibrado de calorias e/ou nutrientes para o crescimento, ou quando há incapacidade de utilização plena dos nutrientes ingeridos devido alguma patologia; sendo um grave problema clínico e social ligado ao aumento substancial do risco de mortalidade e morbidade infantil (BLACK et al., 2013).

A DEP é responsável por causar déficits no desenvolvimento físico, como atraso de crescimento, redução da massa muscular e diminuição de calcificação óssea (VICTORA et al., 2008). Esta patologia pode ter origem ainda na vida intrauterina, culminando no baixo peso ao nascer; ou na infância, devido à interrupção precoce do aleitamento materno, seguida de uma alimentação complementar inadequada; ou mesmo decorrente de privação alimentar ao longo da vida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Além disso, a desnutrição pode ser oriunda de doenças crônicas, como a doença inflamatória intestinal e repetidos episódios de infecções entéricas ou respiratórias (ACF, 2010).

Os índices antropométricos utilizados para avaliar o estado de crescimento são o escore Z peso para a altura (WHZ, do inglês *weigh-height Z score*), o escore Z altura para a idade (HAZ, do inglês *height-age Z score*) e o escore Z peso para a idade (WAZ, do inglês *weigh-age Z score*) (WHO, 2006). A Organização Mundial de Saúde (2017) classifica a desnutrição de acordo com a gravidade, definida clinicamente por um valor de escore Z, conforme descrito na **Tabela 1**.

**Tabela 1** – Classificação da desnutrição de acordo com a gravidade.

<b>Classificação</b>	<b>Valores de escore Z</b>
<b>Normal</b>	escore Z $\geq$ -1,0 DP*
<b>Leve</b>	- 2,0 $\leq$ escore Z < -1,0 DP
<b>Moderada</b>	- 3,0 $\leq$ escore Z < -2,0 DP
<b>Severa</b>	escore Z < -3,0 DP

Fonte: WHO (2017).

Nota: \*DP - Desvio padrão de referência segundo a OMS (2006).

Os índices antropométricos também são usados para definir os diferentes tipos de desnutrição. A **desnutrição aguda ou baixo peso** (do inglês, *wasting*) é definido com o índice de baixo peso para altura (WHZ) e é na maioria dos casos um indicativo de um processo recente e severo de perda de peso, apesar de poder ser derivado de uma doença crônica. Enquanto que, a **desnutrição crônica ou nanismo** (do inglês, *stunting*) é definido com o índice de baixa altura para a idade (HAZ), resultante de uma condição subótima de saúde e/ou nutricionais. Em contrapartida, a **subnutrição** é definida com o índice de baixo peso para idade (WAZ), ou seja, é influenciado tanto pelo índice WHZ como pelo índice HAZ, culminando numa interpretação complexa. Em termos gerais, tanto a variação mundial como a distribuição etária de subnutrição são semelhantes à desnutrição crônica (ACF, 2010; WHO, 2017).

A desnutrição aguda, apesar de indicar um processo recente, se não tratada pode durar vários meses e evoluir para quadros de desnutrição aguda com severidade moderada a grave (GARENNE et al., 2009; ISANAKA et al., 2011). Na clínica, existem três tipos de manifestações de desnutrição aguda grave de grande importância, designadas por: marasmo, *kwashiorkor* e *kwashiorkor* marasmático. O marasmo é definido por um estado de deficiência calórica causada por privação crônica de macronutrientes e/ou infecções recorrentes, caracterizado principalmente pela hipotrofia muscular e perda parcial de gordura subcutânea, além da ausência ou presença de um edema discreto (BUTSCH; HEIMBURGER, 2008). Crianças menores de cinco anos de idade com marasmo possuem um peso para a altura abaixo de 70% ou menor que -3 escores Z desvio padrão da mediana de uma população de referência padrão e/ou circunferência do braço médio-superior (MUAC, do inglês *mid-upper arm circumference*) menor que 115 mm (ACF, 2010; BUTSCH; HEIMBURGER, 2008). Na clínica, o marasmo afeta principalmente crianças maiores que dois anos de idade, caracterizado por extrema magreza, com uma aparência incompatível com a idade (ACF, 2010).

O *kwashiorkor* é caracterizado principalmente pela presença de edema decorrente da deficiência proteica por um longo período de tempo. Uma criança que sofre de *kwashiorkor* pode não parecer estar desnutrida, devido ao inchaço provocado pela redução da pressão coloidosmótica intravascular resultante da hipoalbuminemia (ACF, 2010; BUTSCH; HEIMBURGER, 2008). A atrofia muscular é grave, sem perda de gordura subcutânea, e na sua forma mais grave, o *kwashiorkor* resulta em pele descamativa e brilhante, lesões cutâneas e cabelos descoloridos (ACF, 2010). O *kwashiorkor* marasmático é uma forma mais severa e

com características comuns das duas condições, podendo ocorrer após trauma, sepse e doença inflamatória crônica (SOUZA, E. et al., 2016).

## 1.2 Aspectos epidemiológicos da desnutrição

Dados recentes apontam uma redução das taxas mundiais de desnutrição infantil (UNICEF; WHO; WB, 2016). Aplicação do tratamento adequado preconizado pela OMS, como suplementação de vitamina A, zinco e ferro, e treinamento dos profissionais de saúde foram fatores favoráveis para redução da desnutrição (BHUTTA et al., 2013). Contudo, os dados de prevalência ainda continuam alarmantes para algumas regiões (UNICEF; WHO; WB, 2016).

A OMS definiu intervalos de prevalência para os tipos de desnutrição de acordo com o grupo estatístico relativo dos níveis de prevalência em todo mundo (WHO, 2017). A classificação de risco para prevalência de desnutrição, descrito na **Tabela 2**, indica os níveis aceitáveis para os tipos de desnutrição no mundo.

**Tabela 2** – Classificação de risco das taxas de prevalência por tipo de desnutrição.

Tipos de desnutrição	Classificação das taxas de prevalência (%)			
	Baixo	Médio	Alto	Muito alto
<b>Desnutrição crônica</b>	< 20	20-29	30-39	≥ 40
<b>Desnutrição aguda</b>	< 5	5-9	10-14	≥ 15
<b>Subnutrição</b>	< 10	10-19	20-29	≥ 30

Fonte: WHO (2017).

A Ásia, África e Oceania ainda são as regiões de maior prevalência de desnutrição aguda, crônica e subnutrição em crianças menores de cinco anos de idade (BLACK et al., 2013; UNICEF; WHO; WB, 2016). Estima-se que, em 2015, cerca de 156 milhões de crianças abaixo de cinco anos de idade no mundo tinham desnutrição crônica e cerca de 50 milhões de crianças menores que cinco anos estavam com desnutrição aguda (UNICEF;

WHO; WB, 2016). Enquanto que, a subnutrição, de acordo com a última estimativa da UNICEF, acomete cerca de 100,7 milhões de crianças (BLACK et al., 2013).

Atualmente, a desnutrição aguda em crianças menores de cinco anos de idade encontra-se quase em estado de emergência no Sul da Ásia, acometendo cerca de 14,1%, seguida pela Sudeste da Ásia e Oceania (ambas 9,2%), África Ocidental (8,9%), África Meridional (7,8%), Norte da África (7,7%), África Oriental (6,6%) e Sul da África (5,4%). Em contraste, na América Latina, Central e Caribe tem apresentado prevalência abaixo de 5% (UNICEF; WHO; WB, 2016).

A desnutrição crônica, em contrapartida, possui maior prevalência na Oceania (38,2%), seguida da África Oriental (37,5%), Sul da Ásia (34,4%), África Ocidental (32,1%), África Meridional (31,2%). Porém, a prevalência para as regiões da América Latina Oriental e Central, Ásia Oriental e do Caribe também foram baixas (<10%) (UNICEF; WHO; WB, 2016). De acordo com dados das Nações Unidas (NU) em 2011, a subnutrição acometeu em torno de 19,3% de crianças menores de cinco anos de idade na Ásia, seguida de 17,7% de crianças na África, 14% na Oceania e apenas 3,4% na América Latina e Caribe (BLACK et al., 2013). Mesmo com a redução das taxas, observa-se que a má nutrição atinge diversas regiões, principalmente em países subdesenvolvidos. Essa condição, de certa forma, é causada pela falta de um efetivo sistema de controle e diagnóstico, gerando uma subnotificação da problemática e assim subestimando a prevalência.

Embora a desnutrição não seja a causa primária de mortalidade, esta foi associada a 5,9 milhões de óbitos no ano de 2015 (UNICEF; WHO; WB; UNPD, 2015). Os dados também mostram redução das taxas de mortalidade, entretanto, entre 1995 e 2015 foram registradas 236 milhões de mortes no mundo (ONU, 2015). As maiores taxas de mortalidades foram na África Subsaariana, seguida da Sul da Ásia, Oceania, Ásia Central, Sudeste da Ásia, Ásia Ocidental e América Latina e Caribe (UNICEF; WHO; WB, 2016).

No Brasil, os últimos dados de prevalência apontam redução nacional de desnutrição, no qual a prevalência de desnutrição aguda foi de apenas 1,5% e de desnutrição crônica foi de apenas 7% em 2006/2007 (VICTORA et al., 2011). As taxas de mortalidade também indicaram queda, permitindo o país alcançar a meta do milênio, estipulada no quarto Objetivo de Desenvolvimento do Milênio, reduzindo a mortalidade de 219 mil em 2000 a 52 mil em 2015 (UNICEF; WHO; WB; UNPD, 2015). Contudo, estudo indica que o diagnóstico do

estado nutricional nem sempre é registrado no prontuário dos pacientes, além de existir subnotificação da desnutrição como causa associada ao óbito (SARNI et al., 2009).

As regiões Norte e Nordeste possuem as maiores prevalências de desnutrição crônica e subnutrição do país (CORREIA et al. 2014), apesar dos dados recentes apontarem redução das taxas de déficit de crescimento e baixo peso (WHO, 2012). Um estudo recente de metanálise mostrou que a desnutrição crônica continua um problema de saúde pública e social no país, atingindo principalmente populações de baixo poder socioeconômico (SOUSA, P. et al., 2016). A região Norte do Brasil apresentou o dobro da média nacional de prevalência de desnutrição (14,7%) (VICTORA et al., 2011), com os municípios de maior risco à nível nacional, como o município de Jordão, Acre, que possui a maior taxa de déficit de crescimento (35,8%) do país (ARAÚJO et al., 2016).

Em contrapartida, a região Nordeste, que é considerada um dos principais focos de desnutrição infantil, por ocupar a maior parte do Semiárido brasileiro, obteve um declínio de 67% nas taxas de prevalência de desnutrição em 2007 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Em adição, a região ainda conta com altas taxas de desnutrição aguda (17,9%) e subnutrição (8,3%) quando comparadas com a região Sul, 5,1% e 1,5% respectivamente (AGÊNCIA BRASIL, 2010).

No Ceará, o resultado de dois estudos transversais mostrou redução de 60% da desnutrição aguda entre 1999 e 2007, relacionada ao desenvolvimento socioeconômico e intervenções de saúde (CORREIA et al., 2014). Contudo, um estudo coorte que avaliou crianças desnutridas em comunidades de baixo poder socioeconômico, mostrou que em Fortaleza (CE) há prevalência média de crianças com pontuações para desnutrição crônica (HAZ) e desnutrição aguda (WHZ), no qual 30% das crianças possuem desnutrição crônica e quase metade destas possuem acesso à nutrição multideficiente (PSAKI et al., 2012). Portanto, os dados apontam para uma negligência das autoridades para a problemática no Brasil, aumentando o risco de saúde principalmente em comunidades de baixo poder aquisitivo.

### **1.3 Implicações sociais da desnutrição**

A desnutrição é um problema de saúde com implicações a curto e longo prazo. Em curto prazo, a desnutrição contribui de modo direto e indireto para mortalidade infantil, com o aumento a susceptibilidade a doenças infecciosas, como infecções respiratórias, malária e

diarreia (ACF, 2010; SCHAIBLE; KAUFMANN, 2007). Em acréscimo, ainda é reportada por reduzir a eficácia de vacinas tanto na infância (HOEST et al., 2014) como na vida adulta (MCDADE et al., 2001), contribuindo para o aumento de mortalidade.

Estudos ainda apontam que a DEP na primeira infância é fator de risco para infecções entéricas, com aumento da duração e incidência de diarreia (GUERRANT et al., 1992; MOORE et al., 2001; SCHORLING et al., 1990). Assim como, infecções recorrentes na primeira infância são responsáveis por desencadear danos na barreira intestinal e má absorção de nutrientes importantes, com conseqüente déficit de crescimento, gerando um ciclo-vicioso infecções entéricas-desnutrição (GUERRANT et al., 2008; 2013). As infecções respiratórias e malária também contribuem para desnutrição em menor escala que as doenças diarreicas, com associação à redução do crescimento linear e ganho de peso na infância, respectivamente (ROWLAND; COLE; WHITEHEAD, 1977; ROWLAND; ROWLAND; COLE, 1988).

Visto que, há uma diminuição crescente das taxas de mortalidade relacionada à desnutrição, a atenção para as morbidades decorrentes da desnutrição aumentou nas últimas décadas. Em longo prazo, a desnutrição afeta o desenvolvimento saudável do indivíduo, sendo intimamente associada a doenças crônicas na vida adulta que impactam tanto a produtividade individual como da sociedade em que vivem (BLACK et al., 2013).

A DEP na primeira infância é reportada por desencadear diversas doenças na vida adulta. O baixo peso ou altura no início da vida foi associada com doenças cardiovasculares (BARKER, 2002; FALL, 2006), assim como obesidade (JAFAR et al., 2008; KIMANI-MURAGE et al., 2010), diabetes tipo 2 (BARKER et al., 1993a) e aumento do risco de síndromes metabólicas, como resistência a insulina (BAVDEKAR et al., 1999; VEENING; VAN; DELEMARRE-VAN, 2002), pressão alta (BARKER et al., 1989; SAWAYA et al., 2005) e dislipidemia (BARKER et al., 1993a; 1993b).

Além disso, apesar da complexidade de fatores sociais envolvidos, diversos estudos apontam que o baixo peso ao nascer e baixo peso ou déficit de crescimento na infância estão relacionados com redução de habilidade cognitiva que persiste na idade adulta, reduzindo assim o nível de escolaridade dos acometidos (GALLER et al., 2012; VICTORA et al., 2008) e contribuindo para diminuição do potencial econômico individual (ACF, 2010; HODDINOTT et al., 2008; WORLD BANK, 2007). Galler et al. (2013) mostraram que a desnutrição está associada com mais ansiedade, vulnerabilidade, menor sociabilidade e curiosidade intelectual, maior desconfiança, orientação mais egocêntrica e um menor senso de

eficácia ou competência, mesmo quando esta se limita ao primeiro ano de vida, seguida de nutrição adequada.

O ciclo vicioso desnutrição/infecção entérica também é associado com a redução do desenvolvimento cognitivo na infância e consequente contribuição na redução do nível de escolaridade (ACOSTA et al., 2014; GUERRANT et al., 2013). Estudos mostram que o desenvolvimento cognitivo é afetado devido a danos estruturais diretos ao cérebro que prejudicam o desenvolvimento motor infantil (PITCHER; HENDERSON-SMART; ROBINDON, 2006) e o comportamento exploratório (BROWN; POLLITT, 1996).

A desnutrição gera impacto econômico decorrente de múltiplos fatores, como: custo de internações e tratamentos; transmissão intergeracional de pobreza resultante da redução do nível de escolaridade; além da baixa produtividade devido à má condição física (GRANTHAM-MCGREGOR et al., 2007; VICTORA et al., 2008). De acordo com a UNICEF, o custo global de tratamento para desnutrição é de US\$20 a US\$30 bilhões por ano (ACF, 2010). Além disso, estima-se que a desnutrição infantil é responsável por reduzir em pelo menos 8% o avanço econômico dos países com grande prevalência (ACF, 2010).

#### **1.4 Eventos fisiopatológicos e moleculares da desnutrição**

As implicações sociais da desnutrição são consequências de um estado fisiopatológico persistentes, que pode, ou não, ser revertido pela aplicação de uma intervenção terapêutica adequada (LIMA et al., 2014a; PRENTICE et al. 2013; SESSO et al., 2004). O desenvolvimento de um estado patológico é resultado de uma sequência de circunstâncias, como a: ingestão insuficiente de nutrientes, redução de reservas corporais, alterações fisiológicas e lesões morfológicas (GERUDE et al., 2002).

O consumo insuficiente de energia conduz o organismo às alterações fisiológicas para manutenção da função de órgãos vitais (CAHILL, 2006). Diante disto, tecidos com alto poder de renovação celular são os mais rapidamente afetados, causando sinais evidentes de desnutrição, como redução do peso, da prega cutânea, da circunferência braquial, aparecimento de manchas no corpo e queda de cabelo (ACF, 2010; GOUVEIA et al., 1999). Além de causar comprometimento da altura, edema, hepatomegalia, diminuição de circunferência craniana e torácica quando persiste em fase crítica de desenvolvimento (GERUDE et al., 2002; GOUVEIA, 1999).

A privação nutricional no início da vida sugere atrofia de diversos órgãos corporais, como o coração, os rins, o timo e a musculatura (DESAI et al., 1996). A redução da massa muscular é associada à risco de mortalidade tanto na desnutrição crônica como aguda (OLOFIN et al., 2013). Alves et al. (2008) sugerem que a desnutrição hipoproteica reduz o número de fibras no músculo esquelético, além de retardar a diferenciação morfológica, a taxa metabólica e contrátil das fibras musculares esqueléticas. Estudos também apontaram que a redução de reservas lipídicas podem estar ligada ao aumento de risco de mortalidade, devido à depleção de leptina, um hormônio que tem função de aumentar a secreção de linfócitos e citocinas (BARTZ et al., 2014; FERNÁNDEZ-RIEJOS et al., 2010; WELLS; CORTINA-BORJA, 2013).

Diversas alterações fisiológicas na desnutrição são associadas com o surgimento de doenças crônicas, como o aumento da pressão arterial, que em crianças desnutridas ou em modelos animais pode perdurar por longo período de tempo, sendo um forte indício de desenvolvimento de hipertensão na idade adulta (SESSO et al., 2004; SAWAYA et al., 2005). Sabe-se atualmente que a diminuição da pressão arterial e o aumento da frequência cardíaca em crianças desnutridas são decorrentes de alterações no sistema nervoso autonômico cardíaco (BARRETO et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2012). A restrição fetal também é associada com aumento do risco de obesidade (ROSEBOOM et al., 2001), provavelmente relacionado com alterações epigenéticas (TOBI et al., 2009).

Além disso, o sistema digestório é uma dos principais sistemas afetados pela desnutrição, devido sua alta capacidade de renovação. Ao longo de décadas, estudos clínicos vem detectando alterações no sistema digestivo decorrentes de diversos tipos de privação nutricional, como: atrofia da mucosa e redução da secreção gástrica (VELA, 1974); aumento do infiltrado de células inflamatórias intestinais (QUARENTEI, 1983); anormalidades na borda em escova de enterócitos do jejuno (BRUNSER; CASTILHO; ARAYA, 1976); redução do volume das células epiteliais do jejuno, com irregularidade dos núcleos (BURMAN, 1965); redução da proliferação celular no intestino grosso (HAGEMANN; STRAGAND, 1977; ROEDIGER, 1986); e dano pancreático, com atrofia de células acinares (CROZIER et al., 2009).

As alterações morfológicas intestinais diferem de acordo com o grau de desnutrição e doenças associadas. Pires et al. (2003) identificaram diminuição da altura de vilos, da espessura total da mucosa e da razão vilos/cripta em crianças desnutridas que se acentuam

conforme o grau de desnutrição, enquanto que Sullivan et al. (1991) identificaram hipertrofia de criptas com elevada infiltração de linfócitos. Crianças com *kwashiorkor* apresentaram altura de vilos e criptas reduzidas na porção terminal do duodeno e inicial do jejuno (STANFIELD et al., 1965). Em contrapartida, a presença de diarreia persistente em crianças desnutridas mostra redução da altura dos vilos e da razão vilo/cripta (PIRES et al., 2003).

Modelos pré-clínicos permitiram identificar que alterações induzidas pela desnutrição no plexo mioentérico do estômago de ratos adultos estão associadas com diminuição em torno de 20,13% da área do estômago, resultando em menor dispersão e maior densidade dos neurônios mioentéricos (MOLINARI et al., 2002). Também foi possível identificar diminuição significativa de peso intestinal, de forma geral (TEIXEIRA, 2003; PILEGI; ARAÚJO; SANT'ANA, 2004; SILVA-GUSMAN, 2004), atrofia da mucosa intestinal (VIDUEIROS et al., 2004; UENO et al., 2011), aumento da permeabilidade intestinal (BROWN et al., 2015; UENO et al., 2011), retardo na migração de células epiteliais no eixo cripta-vilo, bem como uma redução da profundidade das criptas (TEIXEIRA, 2003; UENO et al., 2011) e mudanças no transporte basal de íons de um estado absorptivo para secretório, direcionando sódio e água para o lúmen (FERRARIS; CAREY, 2000).

Além disso, a desnutrição pode influenciar o microambiente do lúmen intestinal, favorecendo a disbiose, uma alteração do equilíbrio das populações bacterianas, especialmente com aumento das taxas de bactérias Gram-negativas em relação aos simbiontes Gram-positivos aeróbicos (BROWN et al., 2015). A redução de bactérias Gram-positivas, necessárias para o estímulo da secreção de IgA na mucosa intestinal, pode gerar um comprometimento da quantidade de células CD4+, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e células T na mucosa, levando a uma limitação da resposta imune adaptativa (PETERSON; ARTIS, 2014).

Alterações imunológicas são bem documentadas na desnutrição (ATTIA et al., 2016; CORTÉS-BARBERENA et al., 2008; GIASSI et al., 2008; QUEIROZ et al., 2014), como atrofia de órgãos linfoides, com consequente leucopenia, decréscimo da razão CD4/CD8, aumento do número de células T em crianças severamente desnutridas (SAVINO, 2002) e desvio de reposta imunológica de células T *helper* 1 para células T *helper* 2 (NEYESTANI; WOODWARD, 2005).

Estudos recentes vêm evidenciando a correlação de biomarcadores inflamatórios associados com a desnutrição para melhorar o diagnóstico e prognóstico infantil (PRATA et al., 2016; GUERRANT et al., 2016). A presença de mioleoperoxidase (MPO), lactoferrina e

calproectina fecal são fortemente correlacionadas com a desnutrição (PRATA et al., 2016). Em acréscimo, Guerrant et al. (2016) mostraram que crianças desnutridas da comunidade de Fortaleza (CE) com maiores níveis de MPO e A1AT (alfa 1 antitripsina) fecal crescem menos e quando apresentam associação de elevadas taxas de lactulose/manitol, com LPS, I-FABP e SAA ou MPO e neopterina possuem um crescimento subsequente prejudicado (GUERRANT et al., 2016).

### **1.5 Dieta Básica Regional (DBR)**

Estudos sobre a fisiopatologia associada à desnutrição são limitados em seres humanos por diversos motivos, dentre eles os aspectos éticos, com critérios bem rígidos para intervenções e aplicação de técnicas invasivas. Por este motivo, diversos modelos experimentais com diferentes déficits de nutrientes têm sido desenvolvidos para compreender melhor a fisiopatologia associada à desnutrição (ALVES et al., 2008; BOLICK et al., 2013; JACOBI et al., 2013).

Neste contexto, a dieta básica regional (DBR) foi formulada por Teodósio et al. (1990) com o objetivo de refletir as deficiências alimentares de populações com baixo poder socioeconômico do Nordeste brasileiro. A dieta foi elaborada de acordo com inquéritos sobre o consumo dietético da zona da Mata Sul do estado de Pernambuco, com pelo menos quatro alimentos consumidos pela população local (TEODÓSIO et al., 1990). Consiste de uma dieta moderadamente deficiente em proteína e minerais, que induz desnutrição em roedores (SAMPAIO et al., 2016; TEODÓSIO et al., 1990; UENO et al., 2011). Desde então, diversos trabalhos em modelo murino vêm tentando elucidar, correlacionar e explorar o impacto do consumo desta dieta no organismo (ALMEIDA et al., 2005; BROWN et al., 2015; SAMPAIO et al., 2016; UENO et al., 2011).

A ingesta da dieta multideficiente DBR em neonatos pode contribuir para doença aterosclerótica, pois afeta a proliferação de células musculares lisas dos vasos sanguíneos (PAIXÃO et al., 2005). Além disso, a DBR pode afetar de modo permanente a mielinização e organização de nervos, como o nervo óptico. A dieta, quando introduzida precocemente, alteram o nervo óptico, indicando um comprometimento da transmissão nervosa, disfunção da capacidade visual (ALMEIDA et al., 2005), além de desencadear efeitos deletérios no desenvolvimento somático e maturação do sistema nervoso, atrasando a maturação e evolução da atividade locomotora (BARROS et al., 2006).

A ingestão crônica de DBR também produz insuficiência de crescimento, alterações na morfometria do intestino delgado e na função da barreira intestinal quando introduzida em diversas fases de desenvolvimento (UENO et al., 2011; BROWN et al., 2015; SAMPAIO et al., 2016), alterando o perfil de microbiota intestinal (BROWN et al., 2015). A DBR, quando introduzida pós desmame, é capaz de reduzir espécies gram-negativas, como a família Lactobacillaceae, e expandir espécies gram-positivas, como Bacteroidetes e Proteobacterias, no duodeno, favorecendo assim a disbiose (BROWN et al., 2015). Além disso, neste contexto a desnutrição precoce por DBR pareceu afetar mais severamente roedores machos, mudando o perfil de microbiota em relação às fêmeas (MOORE et al., 2014).

## **1.6 Barreira morfofuncional intestinal**

### ***1.6.1 Morfologia da barreira intestinal***

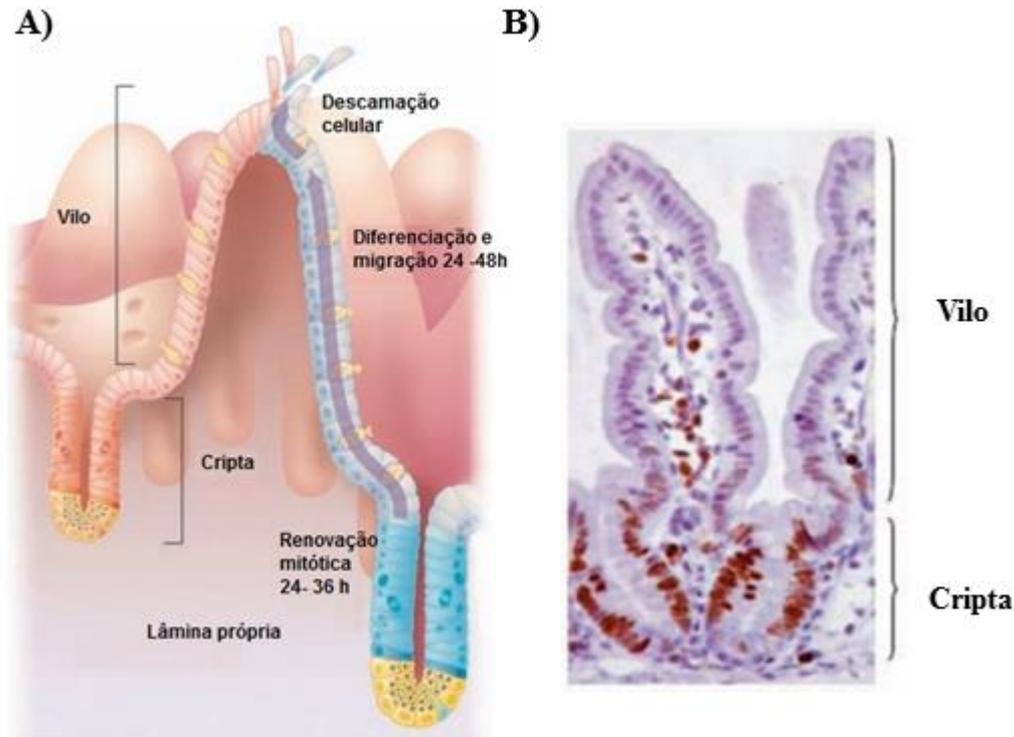
O epitélio gastrointestinal atua como a maior interface primária entre o organismo e o ambiente externo e sua integridade é crítica para a saúde humana (PETERSON; ARTIS, 2014), podendo ser modificado por diversas patologias (TURNER, 2009). A desnutrição é uma das síndromes responsáveis por alterar as funções de barreira do epitélio intestinal (JACOBI et al., 2013; LIMA et al., 2017), causando susceptibilidade à doenças infecciosas (BOLICK et al., 2013; LIMA et al., 2017) e doenças crônicas na vida adulta (DEBOER et al., 2012).

A barreira intestinal é responsável pela regulação de funções importantes, tais como a digestão, secreção e absorção de eletrólitos, água e nutrientes, além da função imune (MADARA, 1991; TURNER, 2009). É formada por uma única camada de células colunares simples e polarizadas, que juntamente com a lâmina própria se dobra e formam as criptas e os vilos, **Figura 1** (MADARA, 1991). As vilosidades se estendem para o lúmen intestinal e as criptas são invaginações epiteliais na mucosa do intestino (PETERSON; ARTIS, 2014).

As criptas são responsáveis pelo potencial proliferativo deste tecido devido às células-tronco intestinais, que produzem células capazes de se autorrenovar, denominadas como progenitoras ou transitórias (PETERSON et al., 2015). Conforme estas células migram das criptas para o ápice, vão se diferenciando em enterócitos absorptivos ou em células secretórias (células caliciformes, células de Paneth ou células enteroendócrinas), reduzindo o ritmo proliferativo e chegando a apoptose no ápice da vilosidade (CROSNIER; STAMATAKI;

LEWIS, 2006). Este processo de renovação do epitélio intestinal ocorre em torno de 24 a 48 horas (**Figura 1**) (RADTKE; CLEVERS, 2005).

**Figura 1** – Morfologia da barreira epitelial do intestino delgado.

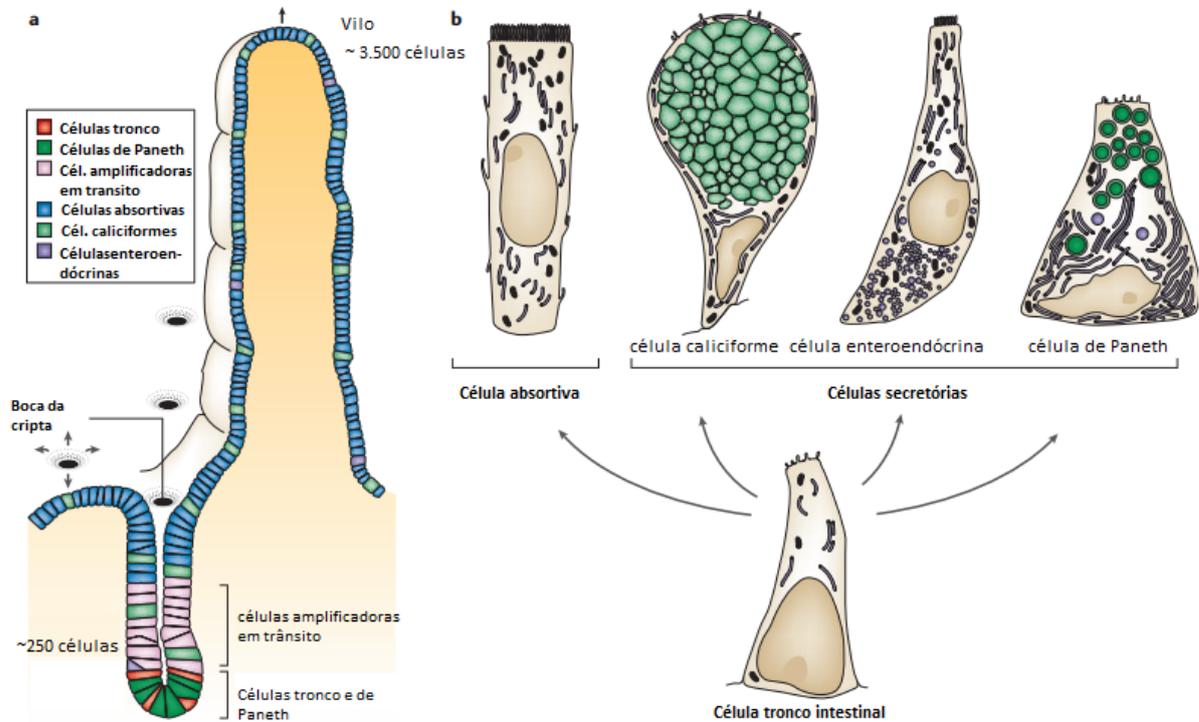


Fonte: Adaptado de Radtke e Clevers (2005).

Legenda: A) Desenho esquemático da morfologia da barreira epitelial do intestino delgado, indicando cripta e vilo, com suas respectivas áreas mitóticas (em azul), região de diferenciação e migração para o ápice do vilo e consequente processo de apoptose, indicado como descamação celular. B) Fitomicografia do intestino delgado, com indicação de vilo e cripta.

As células absortivas são células colunares, caracterizada pela presença de microvilosidades em sua superfície apical, enquanto as células caliciformes apresentam-se em forma de cálice e são caracterizadas por contínua produção de mucina (glicoproteica) para lubrificar e proteger o epitélio intestinal, **Figura 2** (CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006). As células de Paneth encontram-se dispersas na parte inferior da cripta e são responsáveis por secretar proteínas antibacterianas para proteger as células-tronco próximas (PETERSON; ARTIS, 2014). Ao passo que, células enteroendócrinas são responsáveis por secretar vários hormônios intestinais, dentre os quais catecolaminas (CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006).

**Figura 2** – Barreira epitelial intestinal e distribuição das diferentes famílias de células epiteliais no intestino delgado.



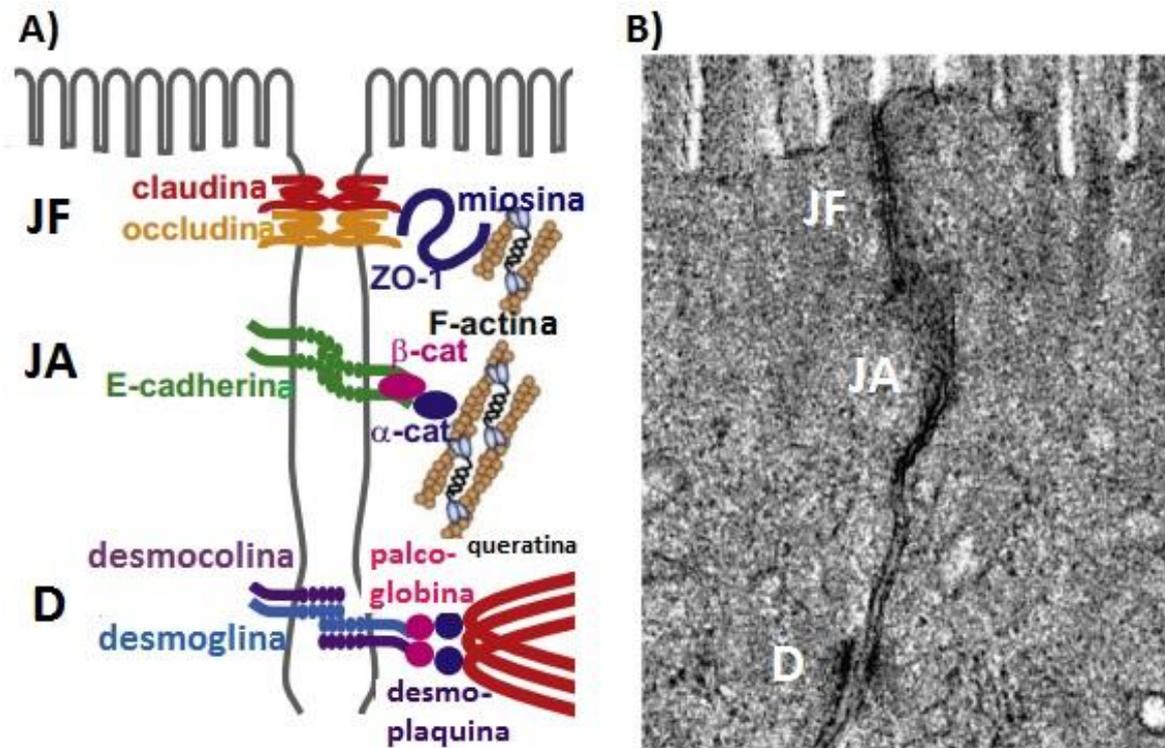
Fonte: Adaptado de Crosnier et al. (2006).

Legenda: Barreira epitelial intestinal indicando a distribuição dos diferentes tipos de células. a) Vilão e cripta indicando a distribuição dos tipos celulares. Na cripta (~250 células) estão as células de Paneth (verde) intercalada pelas células tronco (vermelho), seguida pelas células amplificadoras em trânsito (rosa) que se diferenciam em células absortivas (azul). As pequenas setas indicam o fluxo cripta-vilão das células. No vilão (~3500 células) estão as células absortivas intercaladas com algumas caliciformes (verde claro) e células enteroendócrinas (roxo). b) Esquema representativo de diferenciação da célula tronco intestinal em células absortivas, caliciformes, enteroendócrinas e de Paneth.

As células epiteliais intestinais interagem entre si através de três complexos juncionais: junções firmes (JF), junções aderentes (JA) e desmossomos, **Figura 3** (KARCZEWSKI et al., 2010; TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001). As JF e JA estão localizadas na região apical dos enterócitos, têm o papel de selar os espaços entre as células e são conectadas ao citoesqueleto através de um anel perijuncional de actina e miosina (TURNER, 2009). As JA formam interações fortes e homotípicas com moléculas em células adjacentes e são constituídas por caderinas (família de proteínas transmembranares) (TURNER, 2009). A ruptura de JA resulta na perda do contato de célula-célula, célula-matriz e polarização, além de ocasionar apoptose prematuro por sinalização de células ineficazes (HERMISTON; GORDON, 1995). Os desmossomos têm a função de conectar células

epiteliais adjacentes, são compostos por múltiplas subunidades de proteínas, indicadas na **Figura 3**, e filamentos de queratina que se ligam à membrana plasmática (TURNER, 2009).

**Figura 3** – Anatomia do complexo juncional de células epiteliais intestinais.



Fonte: adaptado de Choi et al. (2017).

Legenda: Imagem representativa do complexo juncional de células epiteliais intestinais e sua respectiva eletromicrografia. No ápice encontra-se o complexo de junções firmes (JF) com localização dos seus componentes estruturais (claudina, occludina e ZO-1 ligada à cadeia de miosina). Em seguida, o complexo de junções aderentes (JA) e a localização de seus componentes estruturais (caderinas: E-caderina,  $\alpha$  e  $\beta$ -catenina). O complexo desmossomos (D) vem logo em seguida, com as respectivas localizações de seus componentes estruturais (desmoglinas, desmocolina, desmoplaquina, placoglobina e filamentos de queratina).

### 1.6.2 Aspectos estruturais e regulação das Junções firmes

As junções firmes são estruturas complexas e dinâmicas, que incluem mais de 40 proteínas capazes de interagir com a célula adjacente (SCHNEEBERGER; LYNCH, 2004). Estas estruturas são constituídas por proteínas transmembranares, como as claudinas, occludinas e tricelulina, e proteínas citoplasmáticas, como as zonula ocludens e cigulinas (TURNER et al., 2009). As proteínas transmembranares permeiam às adesões celulares, vedando os espaços, enquanto as proteínas citoplasmáticas conectam as proteínas transmembranares ao citoesqueleto de actina (CHIBA et al., 2008).

As proteínas de JF coordenam e refinam os transportes via paracelular. Desta forma, proporcionam uma barreira morfofuncional a diversas substâncias e moléculas. Neste contexto, esta função pode ser alterada por diversos estímulos fisiológicos e patológicos (CAPLAN et al., 2008; TURNER et al., 2009). A regulação das JF é complexa, envolvendo diversas vias de sinalização, como a proteína quinase C (PKC), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), miosina quinase de cadeia leve (MLCK) e família Rho de pequenas GTPases (ULLUWISHEWA et al., 2011). As JF possuem importante papel na formação de um fluxo hidroeletrolítico constante por via paracelular e, assim, mantém gradientes eletroquímicos essenciais para absorção de eletrólitos e dos principais nutrientes, tais como glicose e peptídeos (WADA et al., 2013). Além disso, parecem regular a diferenciação celular, proliferação e polaridade (MATERR; BALDA, 2007; TSUKITA; FURESE; ITOH, 2001).

#### *1.6.2.1 Proteínas Claudinas*

As claudinas (do latim claudere, fechar) são uma família de 27 proteínas (20-27 KDa) que possuem quatro domínios transmembranares, com domínios C-terminal e N-terminal citoplasmáticos (TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001). Suas alças extracelulares fazem as interações homofílicas e heterofílicas com células adjacentes, criando uma barreira seletiva para a passagem de determinadas moléculas pela via paracelular (ANDERSON; ITALLIE, 2009).

Estudos prévios determinaram vários subtipos de claudinas que estão envolvidos na estrutura e funcionamento das JF (TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001; TSUKITA et al., 2009; TAMURA, et al., 2011). Estas possuem padrões de expressão diferentes, com características seletivas de permeabilidade dependentes do número e das posições de aminoácidos carregados na primeira alça extracelular da proteína (RAHNER; MITIC; ANDERSON, 2001). Como exemplo, as claudinas 2 e 15 que apresentam padrões de expressão e função diferentes entre a infância e a vida adulta (TAMURA et al., 2011; WADA et al., 2013).

Em relação as suas funções, estas proteínas podem ser classificadas como formadoras de função de barreira, diminuindo a permeabilidade paracelular; ou formadoras de poros, aumentando a permeabilidade paracelular (ANDERSON; ITALLIE, 2009). As claudina-1, -3, -4, -5, -8, -9, -11, e -14 são exemplos de formadoras de barreira, enquanto claudina-2, -7, -12, e -15 são formadoras de poros (SUZUKI et al., 2013).

As claudinas são consideradas os membros mais importantes das junções firmes, sendo capazes de manter a função de barreira de forma independente das demais proteínas formadoras das JFs (ANDERSON; ITALLIE, 2009). Também são importantes para absorção de nutrientes, eletrólitos e água (TAMURA et al., 2011) e, desta forma, compõem um sistema essencial para o transporte eficiente de glicose, de aminoácidos, de lipídeos e de micronutrientes, dependentes do transporte paracelular de Na<sup>+</sup> (WADA et al., 2013). De modo interessante, a deficiência de claudina-1 gera uma perda severa de fluidos e eletrólitos, culminando em mortalidade no prazo de 24 horas após o nascimento (FURUSE et al., 2002).

#### 1.6.2.2 Proteína Ocludina

A ocludina (do latim “occludere”, passagem restrita), uma fosfoproteína tetraspanina (65 kDa), foi a primeira proteína a ser identificada nas junções firmes (FURUSE et al., 1993). É composta por quatro domínios transmembranares, duas alças voltadas para o meio extracelular e uma alça voltada para o meio intracelular, e possui um N-terminal curto e um longo domínio C-terminal citoplasmático (TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001). A interação homofílica das alças extracelulares de ocludina com as células adjacentes cria uma barreira apenas para macromoléculas (AL-SADI et al., 2011) e sua interação com o citoesqueleto se dá por meio da ligação do domínio C-terminal longo como as zonulas ocludens (TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001).

Sabe-se que a ocludina desempenha papel importante na apoptose, formando um complexo de sinalização que inicia a morte quando há quebra da interação claudina-claudina (BEEMAN; WEBB; BAUMGARTNER, 2012). Também é importante na translocação celular, responsável pela sinalização, ativação de PI3K (fosfatidilinositol-3-cinase do inglês, *Phosphoinositide 3-kinase*) e consequente alongamento celular (DU et al., 2010). Além disso, a ocludina parece estar envolvida na diferenciação epitelial gástrica, com função secretória (SCHULZKE et al., 2005).

#### 1.6.2.3 Zonulas ocludens

As zonula ocludens (ZOs) são proteínas compostas por três domínios PDZ (PDZ-1, PDZ-2 e PDZ-3, do inglês *PSD95-DlgA-ZO-1,-2 e -3*), um domínio Src homologia-3 (SH3) e um domínio-membrana associado à guanilato kinase (GUK) no lado do N-terminal (ANDERSON; ITALLIE, 2009). O PDZ é um domínio estrutural, encontrado nas proteínas

de sinalização, responsável por ligar as proteínas transmembranares aos filamentos de actina e miosina no citoesqueleto (SUZUKI et al., 2013).

Existem três proteínas ZOs: ZO-1 (220 Da), ZO-2 (160 Da), e ZO-3 (130 Da). As claudinas se ligam aos primeiros domínios PDZ de ZO-1, -2, -3 (ITOH et al., 1993), enquanto a molécula de adesão juncional A (MAJ-A) se liga ao domínio de PDZ-3 de ZO-1 (TSUKITA et al., 2009) e a ocludina se liga ao domínio GUK de ZO-1 (ULLUWISHEWA et al., 2011). O segundo domínio PDZ é utilizado para interações entre proteínas ZOs (UTEPPERGENOV; FANNING; ANDERSON, 2006). A deficiência de ZO-1 não é capaz de alterar a estrutura de junções firmes, contudo há um atraso na organização de ocludina e claudinas (UMEDA et al., 2004).

### ***1.6.3 Fisiologia da absorção de carboidratos e proteínas***

A manutenção das junções firmes é de suma importância para absorção adequada de nutrientes (WADA et al., 2013). Carboidratos e proteínas são nutrientes essenciais para manutenção do metabolismo e funções vitais nas células. A absorção desses nutrientes ocorre por meio de transporte transcelular na região apical e basolateral, sendo o mecanismo primordial para obtenção de energia (BOUDRY et al., 2010).

Os carboidratos e proteínas são moléculas demasiadamente grandes para serem absorvidas, portanto são primeiramente reduzidas de tamanho. Os carboidratos começam a ser digeridos ainda na cavidade oral por meio de reações enzimáticas, seguida no lúmen intestinal através de enzimas presentes na borda em escova dos enterócitos (KOEPPEN; STANTON, 2009). Enquanto, as enteropeptidases e pepsinas são responsáveis pela quebra de proteínas, reduzindo-as a aminoácidos livres e pequenos peptídeos com 2 a 6 aminoácidos (FRENHANI; BURINI, 1999).

Existem três tipos do transportador de glicose dependente do sódio (SGLT, do inglês *sodium glucose linked transporter-1,-2,-3*) e 14 membros de transportadores GLUT (SCHEEPERS; JOOST; SCHURMANN, 2004), sendo o SGLT-1 o principal cotransportador de glicose e de galactose (BOUDRY et al., 2010). O SGLT-1 cotransporta glicose e  $\text{Na}^+$  e, de forma passiva, água. A função deste transportador dependente da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase para manter as concentrações intracelulares ideais de  $\text{Na}^+$  para o transporte de glicose. O transporte basolateral ocorre através de difusão facilitada pelo transportador GLUT2, responsável pelo transporte de glicose do citoplasma para corrente sanguínea (BOUDRY et

al., 2010). A absorção passiva de água permitiu o desenvolvimento da terapia de reidratação oral para gerenciar a doença diarreica hipersecretória (KIMMICH; RANDLES, 1984). O transportador GLUT2 também pode mediar o transporte de glicose na região apical, esse mecanismo é dependente do recrutamento do transportador GLUT2 para a região apical do enterócito, que se dá pela ativação da via dependente de proteína quinase C (PKC) e sinalização de proteína quinase (MAP kinase) (KELLETT, 2001).

O transporte de proteínas se dá principalmente pelo transportador de peptídeo 1 (PepT-1, do inglês *peptide transporter-1*). O PepT-1 é um transportador de di/tripeptídeos acoplado ao H<sup>+</sup>, altamente expresso na superfície apical das células epiteliais do intestino delgado (KIM et al., 2007). Os peptídeos absorvidos pelos enterócitos são imediatamente hidrolisados por uma série de peptidases localizadas na borda em escova e no próprio enterócito absorptivo. O PepT-1 é de amplo interesse clínico porque pode mediar a absorção dos fármacos, denominados de fármacos peptidomiméticos, como diversos tipos de antibióticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina e antivirais (RUBIO-ALIAGA; DANIEL, 2008).

Além disso, a quantidade de Na<sup>2+</sup> no lúmen é de suma importância para manutenção do transporte de nutrientes. Estudos permitiram identificar que íons, como Cl<sup>-</sup> e bicarbonato, geram uma força eletromotriz para o retorno passivo de Na<sup>+</sup> ao lúmen através da via paracelular (FERRARIS; CAREY, 2000). Neste contexto, o regulador transmembrana de fibrose cística (CFTR, do inglês *cystic fibrosis transmembrane regulator*) é um canal iônico regulado pela fosforilação dependente de AMPc, pertencente a família de transportadores ABC e são expressos em muitos tipos de células epiteliais, principalmente nas respiratórias e intestinais. São permeáveis principalmente a íons Cl<sup>-</sup> e bicarbonato e responsáveis pela secreção de íons nas vias aéreas, intestino, pâncreas e fígado (MORNON et al., 2015; RIORDAN, 2008).

Deste modo, o presente estudo visou investigar as consequências da desnutrição sobre a modulação do funcionamento das principais proteínas de barreira e dos transportadores responsáveis pela absorção de nutrientes no intestino, com o intuito de explorar os mecanismos e correlacioná-los com o aspecto temporal de exposição à dieta multideficiente DRB.

## 2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A desnutrição é, ainda hoje, um grave problema clínico e social ligada ao aumento do risco de mortalidade e morbidade (BLACK et al., 2013; WHO; WB; UNPD, 2015), sendo responsável por alterar diversos sistemas corporais (ALVES et al., 2008; CROZIER et al., 2009; DESAI et al., 1996), dentre eles o sistema digestivo (BURMAN, 1965; CROZIER et al., 2009; PIRES et al., 2003; VELA, 1974). O sistema digestivo regula diversas funções importantes, tais como a digestão, secreção e absorção de eletrólitos, água e nutrientes, além da função imune (MADARA, 2011; TURNER, 2009).

Modelos pre-clínicos vêm sendo implementados para a busca de um melhor entendimento da fisiopatologia no sistema digestivo associada à desnutrição (ALMEIDA et al., 2005; JACOBI et al., 2013; MOORE et al., 2014). Neste contexto, o emprego da DBR nos diversos modelos experimentais contribui para a compreensão do impacto gerado pelas deficiências alimentares de populações com baixo poder socioeconômico do Nordeste brasileiro (BROWN et al., 2015; SAMPAIO et al., 2016; TEODÓSIO et al., 1990).

Os eventos desencadeados pela desnutrição induzida por DBR são complexos e dependentes da fase de desenvolvimento que é introduzida na dieta. Sabe-se, até o momento, que a DBR gera alterações na morfologia e permeabilidade intestinal, bem como na expressão de junções firmes em neonatos (UENO et al., 2011). Além disso, podem desencadear alterações na permeabilidade e nos transcritos de junções firmes em animais recém-desmamados (BROWN et al., 2015; SAMPAIO et al., 2016). Entretanto, nenhum trabalho até o momento caracterizou a cinética de alterações corporais e intestinais desencadeadas por DBR quando a desnutrição é induzida em fase de introdução de alimentos sólidos na dieta.

Visto que, a desnutrição acarreta consequências de um estado fisiopatológico persistente, que pode, ou não, ser revertido (LIMA et al., 2014a; PRENTICE et al. 2013; SESSO et al., 2004). O presente estudo teve como foco avaliar a cinética de modificações na composição corporal, na morfologia e função da barreira morfofuncional de animais induzidos à desnutrição por DBR em período pós-desmame e assim proporcionando uma melhor compreensão da fisiopatologia associada à desnutrição.

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Caracterizar a cinética de alterações desencadeadas pela desnutrição induzida pela Dieta Básica Regional (DBR) na barreira morfofuncional intestinal de camundongos C57BL/6 recém-desmamados.

#### **3.2 Objetivos Primários**

1. Padronizar um modelo de desnutrição induzida pela DBR em camundongos C57BL/6 avaliando alterações temporais no ganho de peso, composição corporal e no desenvolvimento;
2. Investigar alterações morfológicas no íleo e jejuno no 7º, 14º e 21º dia de consumo da DBR em camundongos C57BL/6;
3. Avaliar alterações na permeabilidade intestinal no 7º, 14º e 21º dia de consumo da DBR em camundongos C57BL/6.

#### **3.3 Objetivos Secundários**

1. Avaliar alterações na transcrição gênica das proteínas formadoras das junções firmes, dos transportadores intestinais, PEPT-1 e SGLT-1, e do canal iônico CFTR no 7º, 14º e 21º dia, no jejuno de camundongos desnutridos pela DBR por RT-qPCR;
2. Avaliar alterações na expressão de proteínas formadoras das junções firmes, dos transportadores intestinais, PEPT-1 e SGLT-1, no 14º e 21º dia, por meio de quantificação indireta por imunohistoquímica no jejuno de camundongos desnutridos pela DBR.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais e comitê de ética

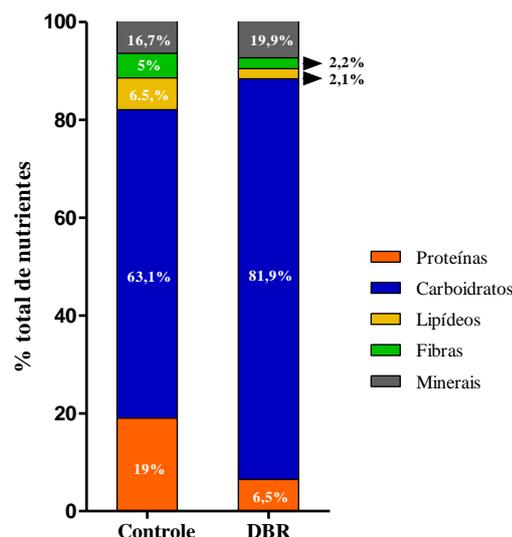
Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos com 21 dias de idade ( $n = 6$  a 8 por grupo), provenientes do Biotério Setorial da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 horas), em ambiente com temperatura controlada de  $22 \pm 2$  °C, com acesso a alimento e água “ad libitum”.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com a Lei nº 11.794 e as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará – nº 17/15.

### 4.2 Dieta Básica Regional (DBR)

A Dieta Básica Regional (DBR) e a dieta controle correspondente foram adquiridas a partir da empresa Roster® (São Paulo, Brasil). As dietas foram fabricadas de acordo com as especificações de Teodósio et al. (1990) e Ueno et al (2011). A DBR é uma dieta multideficiente em nutrientes e sua composição nutricional está exposta na **Figura 4**.

**Figura 4** - Informação nutricional das dietas controle e DBR.



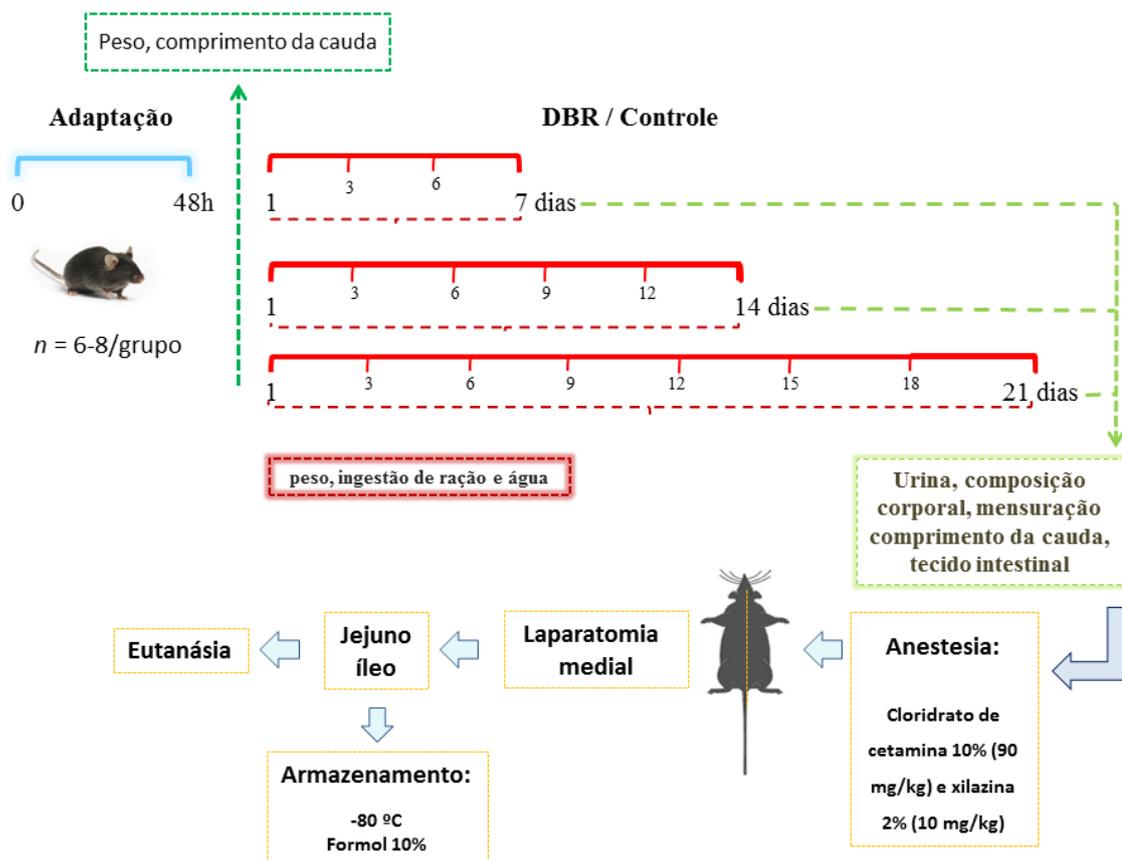
Fonte: Autor.

Nota: Composição nutricional das dietas controle e DBR expressa em percentual (%) total dos nutrientes. A dieta controle é composta de 16,7% de minerais, 5% fibras, 6,5% de lipídeos, 63,1% de carboidratos e 19% de proteínas. A dieta DBR, por sua vez, é composta de 19,9% de minerais, 2,2% de fibras, 2,1% de lipídeos, 81,9% de carboidratos, 6,5% de proteínas.

### 4.3 Protocolo experimental

O modelo de desnutrição seguiu conforme descrito por Brown et al. (2015), com algumas adaptações. Os camundongos C57BL/6 com 21 dias de idade passaram por 48 horas de adaptação ao biotério local, em seguida tiveram o peso corpóreo e comprimento da cauda aferidos e imediatamente foram distribuídos de forma randômica nos grupos nutrido e desnutrido. A desnutrição foi induzida pelo consumo da DBR (6,5% de proteína), enquanto que o padrão saudável foi induzido pelo consumo da dieta controle (19% de proteína). O protocolo foi conduzido por três períodos diferentes (7, 14 e 21 dias) (**Figura 5**), contabilizando um total de seis grupos, descritos no subitem 4.4.

**Figura 5** - Protocolo experimental da indução da desnutrição pela DBR.



Fonte: Autor.

Legenda: Animais C57BL/6 passaram 48 horas de adaptação (azul) ao novo ambiente e em seguida foram divididos nos grupos: nutridos (consumo de dieta controle) e DBR (consumo da dieta básica regional – DBR) (vermelho). Foram conduzidas três linhas de tempo experimental: 7, 14 e 21 dias. O peso, ingestão de água e ração foram avaliadas a cada dois dias experimentais e ao final de cada tempo experimental foi mensurado o comprimento da cauda, urina e composição corporal, após anestesia foi coletado tecido intestinal e em seguida os animais foram eutanaziados e os tecidos armazenados a -80°C ou em formol a 10%.

Os animais foram monitorados a cada dois dias quanto ao peso corporal, consumo de dieta e água. A avaliação da composição corporal por meio da bioimpedância elétrica foi realizada em linha de tempo específica, descrita no item 4.6. Ao final de cada período experimental foi mensurado o comprimento da cauda, além de coletarmos amostras fecais e de urina. Em seguida, os animais foram anestesiados por via intramuscular com cloridrato de cetamina 10% (90 mg/Kg) e cloridrato de xilazina 2% (10 mg/Kg). Após a anestesia, foi feita uma laparotomia mediana longitudinal, o jejuno e íleo foram identificados, dissecados e coletados em três regiões de  $\pm 2,0$  cm cada. Logo em seguida, os animais foram eutanaziados por meio de secção da veia cava inferior e os tecidos coletados foram armazenados a  $- 80$  °C para a avaliação por RT-PCR e fixados em formol para a avaliação morfométrica e imunohistoquímica.

#### 4.4 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- 1) **Nutrido – fase aguda:** receberam dieta controle por um período total de 7 dias;
- 2) **Desnutrido – fase aguda:** receberam dieta DBR por um período total de 7 dias;
- 3) **Nutrido – fase intermediária:** receberam dieta controle por um período total de 14 dias;
- 4) **Desnutrido – fase intermediária:** receberam dieta DBR por um período total de 14 dias;
- 5) **Nutrido – fase crônica:** receberam dieta controle por um período total de 21 dias;
- 6) **Desnutrido – fase crônica:** receberam dieta DBR por um período total de 21 dias.

Os períodos experimentais foram escolhidos com base em estudos da literatura, no qual avaliou-se a desnutrição por DBR por um período de 7 dias (SAMPAIO et al., 2016) e por um período mais crônico de 21 dias (BROWN et al., 2015).

#### 4.5 Mensuração do desenvolvimento dos animais experimentais

A medida de comprimento da cauda é um parâmetro usado em estudos pré-clínicos, para estimar o desenvolvimento do animal, sendo realizado de acordo com BROWN et al. (2015). A mensuração foi realizada no início e ao fim de cada linha experimental. A mensuração no dia inicial da dieta foi realizada a partir de imobilização do animal, enquanto que na última mensuração, os animais encontravam-se anestesiados, de acordo com o informado no subitem

4.3. Os animais foram posicionados sobre uma superfície, a cauda foi estendida de modo distal e reta e com o auxílio de um paquímetro digital a cauda foi medida a partir da sua base.

#### **4.6 Bioimpedância elétrica**

O ImpediVET® (Carlsbad, California, EUA) é um dispositivo de espectroscopia de bioimpedância tetra polar (BIS) de canal único que varre 256 frequências entre 4 kHz e 1000 kHz em menos de um segundo. O dispositivo utiliza uma plotagem de impedância complexa para determinar a água corporal total (do inglês, *total body water* - TBW), o fluido extracelular (do inglês, *extracellular fluid* - ECF) e o fluido intracelular (do inglês, *intracellular fluid* - ICF) a partir de dados de impedância. A massa livre de gordura (do inglês, *Fat-free mass* - FFM) e a massa gorda (do inglês, *fat mass* - FM) são calculadas através de um software acoplado ao dispositivo, assim como o índice de massa corporal (IMC, do inglês *body mass index*).

O procedimento de avaliação corporal decorreu de acordo com o protocolo especificado pelo fabricante. O animal anestesiado com cloridrato cetamina 10% (90 mg/Kg) e cloridrato de xilazina 2% (10 mg/Kg) foi colocado sobre uma superfície não condutora com membros posteriores e anteriores em perpendicular ao corpo e a cauda foi estendida distalmente. Quatro agulhas de (calibre 25 x 12) foram utilizadas como eletrodos, sendo inseridas na região subdérmica, ao longo da linha média dorsal. Os eletrodos centrais foram inseridos na região medial entre os ouvidos e na base da cauda, interceptando a linha imaginária do músculo da coxa com a linha média do corpo. Enquanto que, os eletrodos periféricos foram inseridos entre os olhos, cerca de 1,0 cm do eletrodo entre os ouvidos, e na cauda, cerca de um centímetro do eletrodo da base da cauda. As agulhas foram então acopladas ao dispositivo. O comprimento entre os eletrodos centrais foi mensurado e adicionado ao equipamento, assim como o peso do animal. Em seguida, uma corrente elétrica foi acionada, os parâmetros de bioimpedância de resistência e reatância foram obtidos por um único espectro de 4 a 1 MHz numa série de 256 pontos. Valores predefinidos pelo fabricante para camundongos são usados para calcular os parâmetros de composição corporal (CARLE, 2010). O procedimento foi realizado com todos os grupos experimentais descrito no item 4.4.

#### **4.7 Análise morfométrica**

Os segmentos obtidos do jejuno e íleo foram fixados em formol a 10% tamponado por um período de até 24 h. Decorridas o período de fixação, os fragmentos foram retirados do

formol e armazenados em álcool 70% até o processo de parafinização. O material foi processado rotineiramente para exame morfométrico em equipamento automático de tecido Lupe® modelo PT09 (histotécnico) para ser desidratado em concentrações crescentes de etanol (70 a 100%). Após a desidratação, realizou-se inclusão dos tecidos em parafina através do equipamento para banho histológico (modelo BH05). O material nos blocos de parafina foi cortado (5,0 µm de espessura) utilizando o micrótomo de impacto (Poycut S, Leica, Alemanha) e colocado em lâminas histológicas para posterior coloração com hematoxilina e eosina (H&E). Posteriormente, com o auxílio de um microscópio óptico acoplado ao sistema de aquisição de imagens (LEICA) e o programa ImageJ, foram medidas as alturas de 10 vilos e as profundidades de 10 criptas de cada lâmina para cálculo da razão vilos/cripta.

#### **4.8 Teste de permeabilidade intestinal**

##### ***4.8.1 Coleta da amostra***

O procedimento experimental foi realizado para todos os grupos descritos no item 4.4. Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas 24h antes do período de coleta para adaptação. Decorrida às 24h, os animais permaneceram em jejum por um período de 8h. Em seguida, todos os animais receberam por meio de gavagem 250 µl da solução teste, contendo 5,0 g de Lactulose (Duphar Laboratories, Southampton, Reino Unido) e 1,0 g de Manitol (Henrifarma Chemicals and Pharmaceuticals LTDA, São Paulo, Brasil), dissolvidos em 20 mL de água. A urina, preservada com clorexidina (0,236 mg/mL de urina, Sigma Chemical, St Louis, MO), foi recolhida 5 horas após a administração da solução de teste. Os volumes urinários foram mensurados, registrados, centrifugados a 10.000 rpm por 3 min e armazenados a – 80°C até o dia de análise.

##### ***4.8.2 Preparação da amostra e detecção das concentrações de lactulose e manitol***

Duas soluções padrão de carboidratos foram usadas para calibrar o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High performance liquid chromatography*). Cada padrão continha 60 µM dos seguintes açúcares: glucosamina, manitol, melibiose e lactulose (grupo I); e inositol, sorbitol, glucose e lactose (grupo II). As soluções padrão foram utilizadas para calibrar o sistema de HPLC no início das medições e entre os grupos, para corrigir a perda de sensibilidade devido ao acúmulo de materiais nos eletrodos. Para a determinação da variação intra-experimento, empregou-se os grupos I e II na concentração de 0,1 mM. Para o estudo, misturamos 50 µl de urina mais 50 µl de uma solução

contendo melibiose (3,6 mM) diluída em 2,9 ml de água destilada e desionizada duas vezes. Após centrifugação, empregou-se 50 µl para determinação de açúcar por cromatografia líquida de alta pressão, HPLC-PAD. As concentrações de lactulose e manitol foram medidas para todos os grupos experimentais por meio de cromatografia líquida de alta pressão com detecção amperométrica pulsada, conforme descrito anteriormente (BARBOSA et al., 1999; LIMA et al., 2007).

#### **4.9 Avaliação da transcrição gênica de proteínas transmembranas e das proteínas formadoras de junções firmes**

##### **4.9.1 Extração do RNA total**

Visto que, o jejuno obteve alterações morfológicas mais significativas que o íleo para todos os tempos, para tal procedimento foi utilizado os tecidos de jejuno de todos os grupos experimentais. Segmentos de jejuno armazenados a -80 °C foram descongelados e pesados. Cada tecido foi posto em contato com uma esfera de metal e congelada no -80 °C por 15 minutos. A extração de RNA foi realizada de acordo com o protocolo do *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha).

O tecido congelado com a esfera de metal e 1000 µl de triazol foram adicionados, em seguida foi submetido à alta rotação pelo equipamento TissueLyse® (Qiagen, Hilden, Alemanha) por até 5 minutos. Deixou-se o tubo com o homogenato por 5 minutos à temperatura ambiente. Logo após este período, foram adicionados 200µL de BCP (1 -bromo-3-cloropropano, FLUKA 16720) em cada amostra, misturadas vigorosamente e deixadas em temperatura ambiente por 2 a 3 min. Em seguida, centrifugou-se por 15 minutos a 10.000 rotações por minuto (rpm) a 4°C, transferiu-se o sobrenadante para outro tubo de 2,0 mL e foi adicionado 1 volume de etanol 70%. As amostras foram novamente misturadas vigorosamente e 700 µl foi transferido para coluna *mini spin*, que retém o RNA. Centrifugou-se por 15 segundos a 10.000 rpm à temperatura ambiente e descartou-se o volume do tubo coletor. À coluna foi adicionado o tampão RW1 e, então, novamente submetido à centrifugação (10.000 rpm). O volume do tubo coletor foi descartado. Em seguida, adicionou-se 500µL do tampão RPE e centrifugou-se (10.000 rpm) 15 segundos. Este último procedimento foi repetido com centrifugação por 2 minutos. O frasco coletor foi então trocado e repetiu-se a centrifugação por 1 minuto. O RNA retido na coluna foi eluído em 50 µL de água RNase-free e coletado após centrifugação a 10 000 rpm por 1 min.

A quantidade e qualidade do RNA isolado foram analisadas através de leituras da absorvância a 260 nm e razão 260/280nm pelo equipamento Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), respectivamente. O RNA extraído foi armazenado a -80 °C.

#### 4.9.2 Síntese de cDNA

O RNA total isolado armazenado a -80 °C seguiu para a síntese de cDNA através do *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad, Califórnia, EUA), de acordo com instruções do fabricante. O protocolo da reação incluiu 1,0 µL da enzima transcriptase reversa, 4 µL do tampão *5x iScriptReaction Mix* (solução constituída de oligonucleotídeos e iniciadores aleatórios), 200 ng/µL de RNA extraído das amostras e completou-se o volume total até 20µL com água livre de nuclease. O protocolo padrão no termociclador iCycler® (Bio-Rad, Califórnia, Estados Unidos) foi 25°C por 5 min, 42°C por 30 min e 85°C por 5 min. O cDNA sintetizado foi armazenado em freezer -20 °C até a amplificação pela Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR).

#### 4.9.3 Reação em cadeia de polimerase quantitativo

A transcrição relativa dos genes *SGLT-1*, *PepT-1*, *CFTR*, *claudina-1*, *claudina-2* e *occludina* foi realizada através do equipamento CFX96 Touch® (Bio-Rad, Califórnia, EUA). Como mostra a **Tabela 3**, a sequência dos iniciadores de DNA (primers) dos genes investigados foi obtida no sítio eletrônico *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), no qual o gene de referência utilizado foi o *18S*.

Para a reação foram utilizados 10 µL de Syber Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems, Inglaterra), 2,0 µL de cada iniciador (0,2 µM) e 1,0 µL de cDNA das amostras completando com água livre de nuclease até um volume final de 20µL. As condições de anelamento para cada gene investigado estão descritos na **tabela 3**, todos os ciclos começaram com a etapa de desnaturação (20 segundos a 95°C) e finalizaram com etapa de extensão (45 segundos por 1 minuto a 72°C). Os dados foram obtidos com o *software* do sistema CFX96 (BioRad, Califórnia, EUA) e foram baseados nos valores do ciclo de limiar, em que a fluorescência observada é de 10 vezes maior do que a fluorescência basal para cada ensaio de qPCR. Todas as amplificações foram avaliadas quanto à curva de *melting*, realizada para assegurar a especificidade da amplificação e detectar a formação de dímeros de iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico.

**Tabela 3** - Oligonucleotídeos iniciadores, suas respectivas sequências e condições de PCR Genes .

Genes	Sequência dos iniciadores	Nº NCBI	Condições de anelamento
<i>Claudina-1</i>	S – TCTACGAGGGACTGTGGATG AS – TCAGATTCAGCAAGGAGTCG	NM_016674.4	20'' - 58°C
<i>Claudina -2</i>	S – CCCACCACCACCAGCTTAAT AS – GAAATGGCTTCCAGGTCAGC	NM_016675.4	20'' - 60°C
<i>Ocludina</i>	S – AAGAGCAGCCAAAGGCTTCC AS – CGTCGGGTTCACTCCCATTA	NM_008756.2	20'' - 60°C
<i>SGLT-1</i>	S – CGGAAGAAGCGATCTGAGAA AS –	NM_019810.4	20'' - 58°C
<i>PepT-1</i>	S – AGGGGAGAACGGAATCAGGT AS- CTTTTCGCCAGAAGGGAAGA	NM_053079.2	20'' - 60 °C
<i>CFTR</i>	S – GGATGCTGAGGAAGCAACTC AS – CCAGCCTGGA ACTCTCTTTG	NM_021050.2	20'' - 58 °C
<i>18S</i>	S – ACATCCAAGGAAGGCAGCAG AS – GCTGGAATTACCGCGGCTG	NR_003278.3	20'' - 60 °C

Fonte: Autor.

Nota: S – iniciador senso (5'-3') e AS – iniciador anti-senso (3'-5'). Gene de referência: 18S.

Os valores do ciclo quantitativo (Cq/Ct) dos genes foram exportados para o Microsoft Excel® (Microsoft, EUA) e os níveis relativos de RNA foram calculados de acordo com a metodologia  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , no qual  $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gene alvo} - \text{Média do Ct gene de referência } 18S)$ , conforme descrito por (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

#### 4.10 Imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi realizada para avaliação dos transportadores, *SGLT-1* e *PepT-1*, e as proteínas de junções firmes, ocludina e claudina 2 (clau-2), nos grupos experimentais de 14 e 21 dias. Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos pela Santa Cruz Biotechnology® (Texas, Estados Unidos). O jejuno foi processado de acordo com o subitem 4.7, ao final do processo os cortes foram colocados em lâminas de L-polilisina

StarFrost® (Knittel glass, São Paulo, Brasil). As lâminas foram aquecidas na estufa (temperatura 60 °C) por 1 hora, hidratadas no xilol à temperatura ambiente e em etanol em concentrações decrescentes (100 – 70%) por 3 min cada etapa. As lâminas foram lavadas em água corrente e recuperadas em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0), sob aquecimento em potência máxima no microondas por 18 minutos para a recuperação antigênica. Após o resfriamento, obtido à temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com água destilada por 3 minutos.

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com banhos de 20 minutos com peróxido de hidrogênio a 3%. Após lavagem com tampão fosfato (PBS), os cortes foram secos com papel filtro e incubados “overnight” a 4°C com anticorpo primário de coelho para PEPT-1 (diluição 1:200), SGLT-1 (diluição 1:200), claudina-2 (diluição 1:200) e ocludina (diluição 1:200). Após a lavagem no dia seguinte, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% (15 minuto). Em seguida, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário (de detecção) anti-IgG de coelho, diluído 1:200 em PBS-BSA, por 30 minutos. No dia seguinte, os cortes foram lavados com PBS, secos com papel filtro e incubados com o anticorpo secundário anti-coelho Dako® (California, Estados Unidos) por 30 min. Após período de incubação secundária, os cortes foram lavados com PBS e incubados com o complexo avidina-biotina peroxidase conjugada (complexo ABC Vectastain®) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, foi feita a coloração com o cromógeno 3,3 diaminobenzidina-peróxido (DAB), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer por aproximadamente 8 minutos. Por fim, foi realizada a desidratação em etanol (95% e 100%) e xilol, seguida da montagem das lâminas.

Os controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima. Contudo o anticorpo primário foi substituído por PBS – BSA 5%. As seções foram avaliadas em microscópio sob aumento de 200x. Para a estatística, foi realizada uma contagem semi-quantitativa das amostras, de acordo com a intensidade da coloração e da quantidade de células intestinais coradas. A contagem foi baseada em um sistema de pontuação que varia de 0 a 4, onde 0: sem coloração marcada, 1: 0 a 25% de células intestinais marcadas, 2: 25 a 50% células intestinais marcadas, 3: 50 a 75% de células intestinais marcadas, 4: > 75% células intestinais marcadas (WANG et al, 2012). A marcação para PEPT-1, SGLT-1, claudina-2 e ocludina em cada amostra será calculado pela quantificação de pixels marcados na área total, descrito por Brey et al. (2003).

#### 4.11 Análise estatística

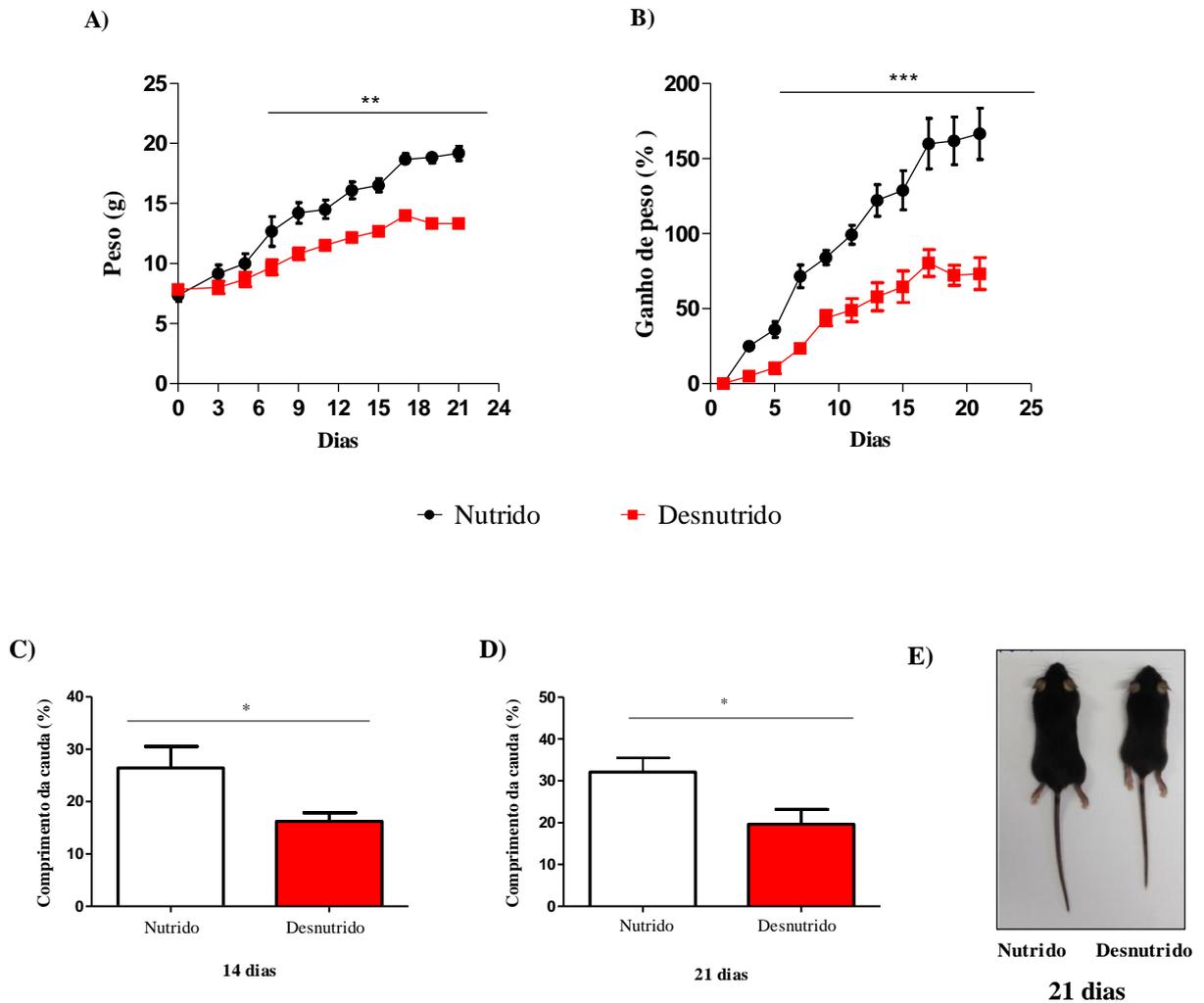
Todos os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os dados paramétricos foram analisados pelo teste *t de Student* ou Análise de Variância (ANOVA) seguida do pós-teste *Bonferroni* para dados pareados. Enquanto que, os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de *Mann-Whitney*. Todos os testes foram analisados usando o software GraphPad Prism® (Califórnia, Estados Unidos) e os resultados considerados significativos foram  $P < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeitos da desnutrição induzida pela DBR nos indicadores de crescimento

O peso, ganho de peso e comprimento da cauda, utilizados como parâmetros indicativos de desenvolvimento, foram reduzidos de modo significativo no grupo desnutrido. Os animais desnutridos ( $9,66 \pm 0,61$ g) reduziram o peso de modo significativo ( $P < 0,01$ ) a partir do 7º dia em relação aos nutridos ( $12,66 \pm 1,22$ g) (**Figura 6, item A**). Ao avaliarmos o ganho de peso, também se observou de modo significativo ( $P < 0,001$ ) um menor ganho ponderal nos animais desnutridos ( $23,51 \pm 3,76\%$ ) em relação aos nutridos ( $71,46 \pm 7,54\%$ ) a partir do 7º dia de desnutrição, que perdurou até o 21º dia experimental (*Nutrindo* =  $26,42 \pm 4,08\%$  vs *Desnutrido* =  $16,25 \pm 1,61\%$ ) (**Figura 6, item B**). Entretanto, o percentual de variação do comprimento da cauda foi significativamente menor ( $P < 0,05$ ) nos animais desnutridos no 14º dia (*Nutrindo* =  $26,42 \pm 4,08\%$  vs *Desnutrido* =  $16,25 \pm 1,61\%$ ) e 21º dia (*Nutrindo* =  $34,61 \pm 2,81$  vs *Desnutrido* =  $22,17 \pm 3,0\%$ ), mostrando crescimento linear, porém de modo atrasado em relação aos nutridos (**Figura 6, item C e D**). A figura representativa dos animais nutridos e desnutridos mostra a redução do comprimento total dos animais desnutridos no 21º dia (**Figura 6, item E**).

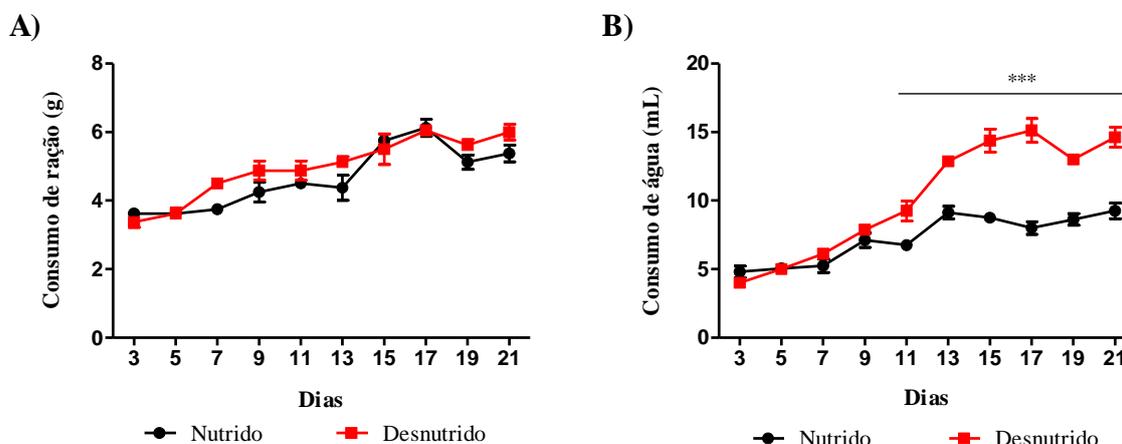
**Figura 6** – Efeitos da DBR no peso, ganho de peso, comprimento da cauda de camundongos.



Os valores da figura apresentam-se em média  $\pm$  E.P.M dos grupos ( $n=6$ ) nutrido (barra branca) e desnutrido (barra vermelha). A) Peso nos grupos por um período de 21 dias, a análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste *Bonferroni*. B) Percentual do ganho de peso nos grupos por um período de 21 dias, a análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste *Bonferroni*. C) e D) Percentual da variação do comprimento da cauda no 14º e 21º dia, respectivamente, a análise estatística foi feita através do teste *t* de *Student*. E) Imagem ilustrativa do animal nutrido (Nut) e desnutrido (Desnut) no 21º dia experimental. Os valores significativos tiveram  $*P < 0,05$  e  $***P \leq 0,001$ , comparado com o grupo nutrido.

A redução do peso, ganho ponderal de peso e do percentual de variação do comprimento da cauda dos animais desnutridos não teve relação com o consumo das dietas durante o período experimental, não apresentando diferença significativa ( $P > 0,05$ ) (**Figura 7, item A**). No entanto, foram observadas alterações no consumo de água, apresentando-se maior no grupo desnutrido ( $P < 0,001$ ) a partir do 11º dia (*Nutrido* =  $6,75 \pm 0,31$  ml vs *Desnutrido* =  $9,25 \pm 0,72$  ml) (**Figura 7, item B**).

**Figura 7** – Consumo de dieta e água por um período de 21 dias no modelo de desnutrição por DBR.



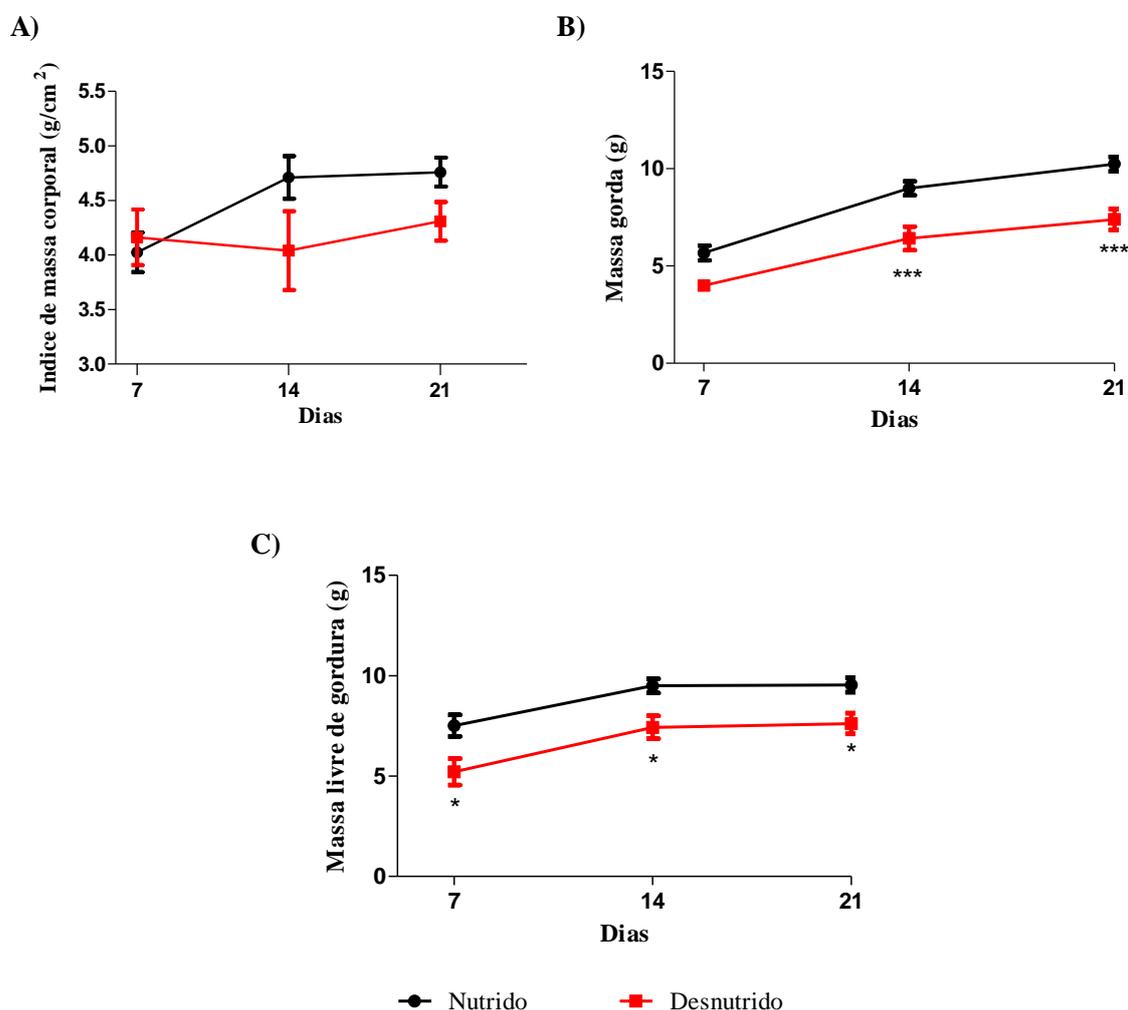
Os valores da figura apresentam-se a média  $\pm$  E.P.M dos grupos ( $n=6$ ) nutrido e desnutrido. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste de *Bonferroni*. A) Consumo de dieta dos animais nutridos e desnutridos por um período de 21 dias. B) Consumo de água dos animais nutridos e desnutridos por um período de 21 dias. Os valores significativos tiveram  $***P \leq 0,001$ , comparados com o grupo nutrido.

## 5.2 Efeitos da desnutrição induzida pela Dieta básica regional na composição corporal dos animais

A bioimpedância elétrica permitiu avaliarmos a composição corporal dos animais nutridos e desnutridos quanto à água corporal total, fluido extracelular, fluido intracelular, massa livre de gordura, massa gorda e o índice de massa corporal.

Como mostra a **Figura 8**, o índice de massa corporal total não apresentou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos em nenhum ponto avaliado (**item A**). Enquanto que, os valores de massa gorda foram menores de modo significativo ( $P < 0,001$ ) entre os grupos (*Nutrido*:  $8,99 \pm 0,36$  g vs. *Desnutrido*:  $6,68 \pm 0,58$  g) no 14º dia, permanecendo diminuído no 21º dia ( $P < 0,001$ ; *Nutrido*:  $10,24 \pm 0,36$  g vs. *Desnutrido*:  $7,39 \pm 0,53$  g) (**Figura 8, item B**). Ao avaliarmos os valores de massa livre de gordura, houve alteração significativa em todos os tempos avaliados (**Figura 8, item C**). No 7º dia, os animais desnutridos ( $4,68 \pm 0,5$  g) apresentaram redução significativa dos valores de massa livre de gordura em relação aos nutridos ( $7,51 \pm 0,53$  g), que perdurou até o 21º dia ( $P < 0,05$ ; *Nutrido*:  $9,54 \pm 0,36$ g vs. *Desnutrido*:  $7,62 \pm 0,51$  g).

**Figura 8-** Índice de massa corporal, massa gorda e massa livre de gordura em animais desnutridos por DBR.

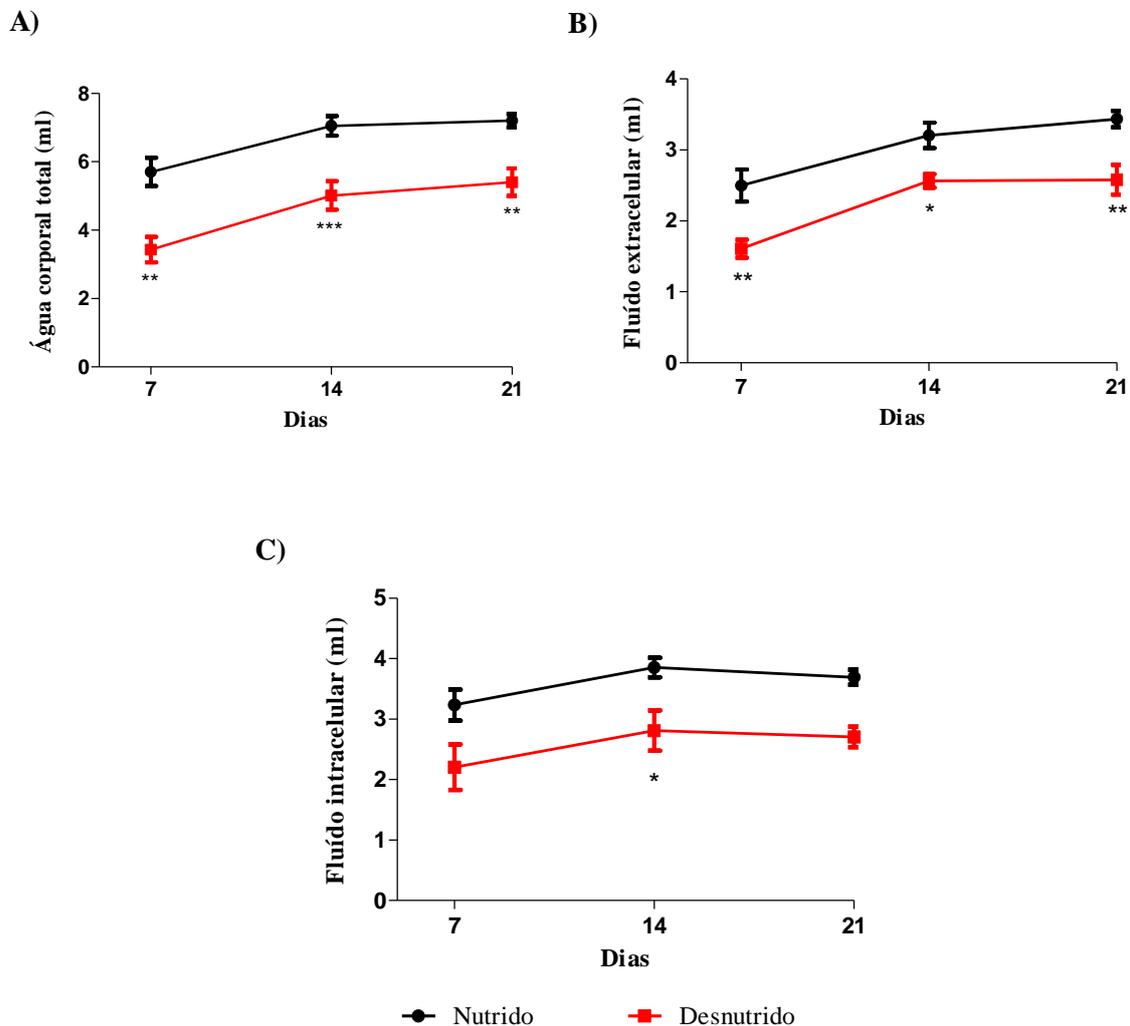


Os valores da figura apresentam-se em média  $\pm$  E.P.M do índice de massa corporal (g/cm<sup>2</sup>), massa gorda (g) e massa livre de gordura (g) dos grupos nutridos (linha preta) e desnutridos (linha vermelha) ( $n = 6$  por grupo). A) Índice de massa corporal dos animais nutridos e desnutridos no 7º, 14º e 21º dia. B) Massa gorda dos animais nutridos e desnutridos no 7º, 14º e 21º dia. C) Massa livre de gordura dos animais nutridos e desnutridos no 7º, 14º e 21º dia. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste *Bonferroni* e os valores considerados significativos foram os \*\*\* $P \leq 0,001$ , comparados com o grupo nutrido.

O volume de água corporal total foi diferente entre os grupos em todos os tempos avaliados (**Figura 9, item A**). No 7º dia, os animais desnutridos ( $3,81 \pm 0,48$  ml) apresentaram volume de água corporal total significativamente menor ( $P < 0,01$ ) em relação aos nutridos ( $5,5 \pm 0,39$  ml), assim como no 14º e 21º dia, os animais desnutridos (14º dia:  $5,44 \pm 0,41$  ml e 21º dia:  $5,57 \pm 0,37$  ml) apresentaram respectivos volumes de água corporal total significativamente menores ( $P < 0,001$  e  $P < 0,01$ ) do que os animais nutridos (14º dia:  $7,05 \pm 0,29$  ml e 21º dia:  $6,98 \pm 0,26$  ml). Ao avaliarmos o volume de líquido extracelular, também

houve redução significativa no grupo desnutrido em relação aos nutridos em todos os tempos avaliado (**Figura 9, item B**). No 7º dia, o grupo nutrido ( $2,49 \pm 0,22$  ml) apresentou redução significativa ( $P < 0,01$ ) em relação ao desnutrido ( $1,54 \pm 0,14$  ml), permanecendo reduzido de modo significativo ( $P < 0,01$ ) até o 21º dia (*Nutrido*:  $3,43 \pm 0,11$  ml vs. *Desnutrido*:  $2,57 \pm 0,21$  ml). Em contrapartida, o volume de fluido intracelular reduziu de modo significativo apenas no 14º nos animais desnutridos ( $2,81 \pm 0,33$  ml) quando comparado com animais os nutridos ( $3,85 \pm 0,16$  ml) (**Figura 9, item C**).

**Figura 9** - Valores de água corporal total, fluídos extracelulares e intracelulares em animais desnutridos por DBR.



Os valores da figura apresentam-se em média  $\pm$  E.P.M do volume de água corporal total (ml), fluido extracelular (ml) e fluido intracelular (ml) dos grupos nutridos (linha preta) e desnutridos (linha vermelha) ( $n = 6$  por grupo). A) Volume de água corporal total dos animais nutridos e desnutridos no 7º, 14º e 21º dia. B) Fluido extracelular dos animais nutridos e desnutridos no 7º, 14º e 21º dia. C) Fluido intracelular dos animais nutridos e desnutridos no 7º, 14º e 21º dia. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do pós-teste *Bonferroni* e os valores considerados significativos foram os  $*P \leq 0,05$ ,  $**P \leq 0,005$  e  $***P \leq 0,001$ , comparados com o grupo nutrido.

### 5.3 Impacto da desnutrição induzida pela Dieta Básica Regional na morfometria intestinal

Como mostra a **Figura 10**, no 7º dia a altura do vilão no jejuno permaneceu inalterada ( $P=0,7879$ ) (**item B**), enquanto que houve uma redução significativa da altura da cripta ( $P=0,002$ ) nos animais desnutridos quando comparado aos nutridos (**Figura 10, item C**). Este resultado refletiu-se na razão vilão/cripta, acarretando num aumento significativo da razão ( $P=0,049$ ) nos animais desnutridos (**Figura 10, item D**).

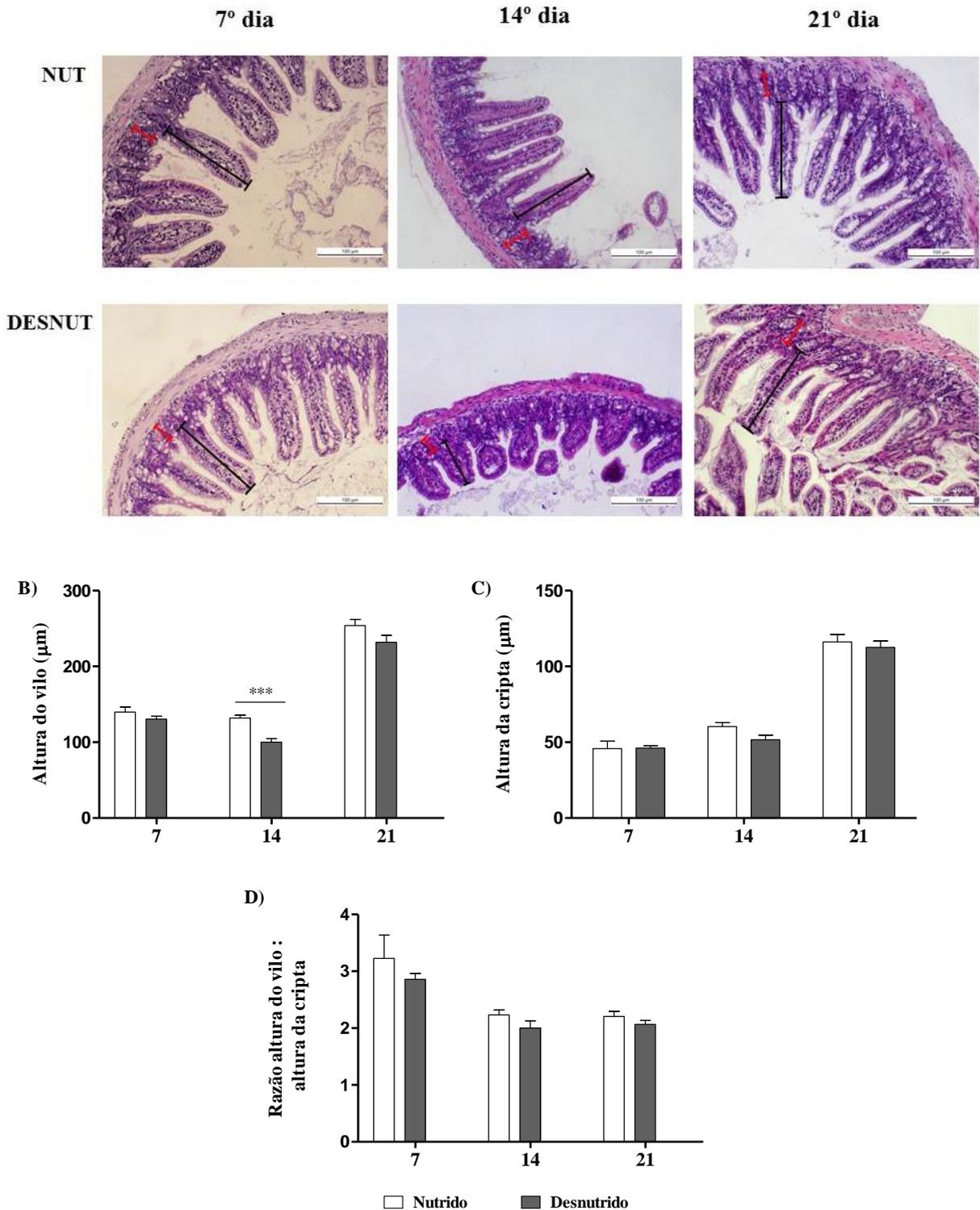
No 14º dia, a altura do vilão (**Figura 10, item B**) e da cripta (**Figura 10, item C**) apresentaram-se reduzidas de modo significativo ( $P=0,1087$  e  $P=0,1917$ , respectivamente) em animais desnutridos. Contudo, a razão vilão/cripta permaneceu inalterada, não apresentando diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre os grupos (**Figura 10, item D**).

Ao avaliarmos o 21º dia, o jejuno apresentou a altura da cripta reduzida de modo significativo ( $P=0,0016$ ) nos animais desnutridos (**Figura 10, item B**), enquanto que o vilão permaneceu inalterado ( $P=0,4433$ ) (**Figura 10, item C**). Em consequência, a razão vilão/cripta aumentou de modo significativo ( $P=0,0121$ ) no grupo desnutrido em relação ao nutrido (**Figura 10, item D**).



Ao avaliarmos a morfologia do íleo dos animais nutridos e desnutridos no 7º dia, pode-se observar que não houve alteração significativa ( $P > 0,05$ ) na morfometria (**Figura 11, item A, B e C**). Em contrapartida, os animais desnutridos apresentaram redução significativa ( $P = 0,0001$ ) do vilão quando comparado com os animais nutridos no 14º dia (**Figura 11, item A**), sem alterações significativas ( $P > 0,05$ ) nos demais parâmetros. No 21º dia, a morfologia do íleo retorna ao estado basal, não apresentando diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos em nenhum parâmetro avaliado.

**Figura 11** - Dinâmica na morfologia intestinal do íleo induzida por DBR.

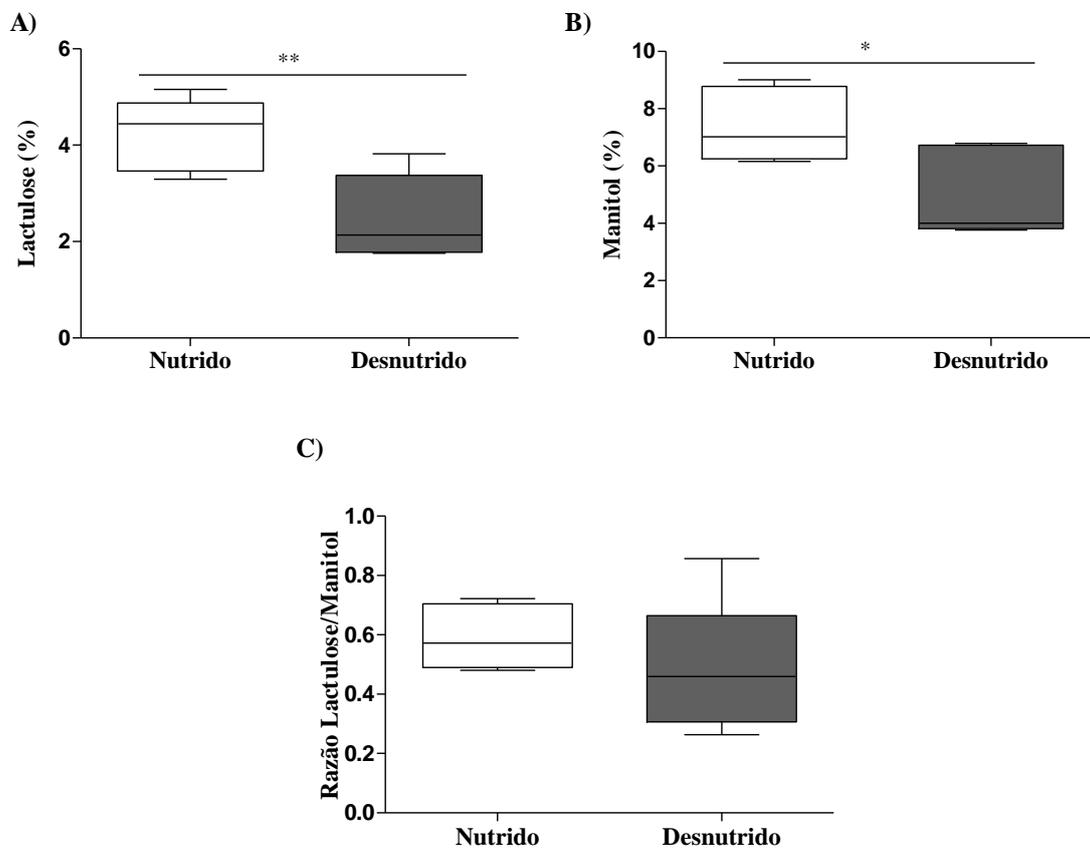


Os valores da figura apresentam-se em média  $\pm$  E.P.M das alturas do vilão ( $\mu\text{m}$ ) e da cripta ( $\mu\text{m}$ ) e razão vilão/cripta das secções do íleo de animais nutridos (barra branca) e desnutridos (barra cinza) ( $n = 4$  por grupo). A) Imagem representativa corada por hematoxilina-eosina da morfologia do íleo de animais nutridos (NUT) e desnutridos (DESNUT), com linhas indicando a altura do vilão (preta) e a altura da cripta (vermelha) (aumento de 200 x). B) Altura do vilão dos animais nutridos e desnutridos. C) Altura da cripta dos animais nutridos e desnutridos. D) Razão da altura do vilão/altura cripta dos animais nutridos e desnutridos. A análise estatística foi feita através do teste não paramétrico *Mann Whitney* e os valores considerados significativos foram os  $***P \leq 0,001$ .

#### **5.4 Alterações temporais na permeabilidade intestinal desencadeada pela desnutrição induzida pela Dieta básica regional**

O teste de lactulose e manitol permitiu avaliarmos as alterações temporais na permeabilidade intestinal decorrentes da desnutrição. Observamos uma redução tanto do percentual de excreção de lactulose como de manitol nos animais desnutridos no 7º dia experimental, indicando diminuição da permeabilidade paracelular e área absorptiva, respectivamente. Os animais desnutridos ( $2,47 \pm 0,35\%$ ) apresentaram excreção de lactulose significativamente menor ( $P=0,0043$ ) em relação aos nutridos ( $4,27 \pm 0,29\%$ ) (**Figura 12, item A**). Assim como, houve redução significativa ( $P=0,0206$ ) da excreção de manitol dos animais desnutridos ( $7,36 \pm 0,5\%$ ) em relação aos animais nutridos ( $4,85 \pm 0,6\%$ ) (**Figura 12, item B**). Contudo, a razão lactulose/manitol permaneceu inalterada ( $P=0,1061$ ) (**Figura 12, item C**).

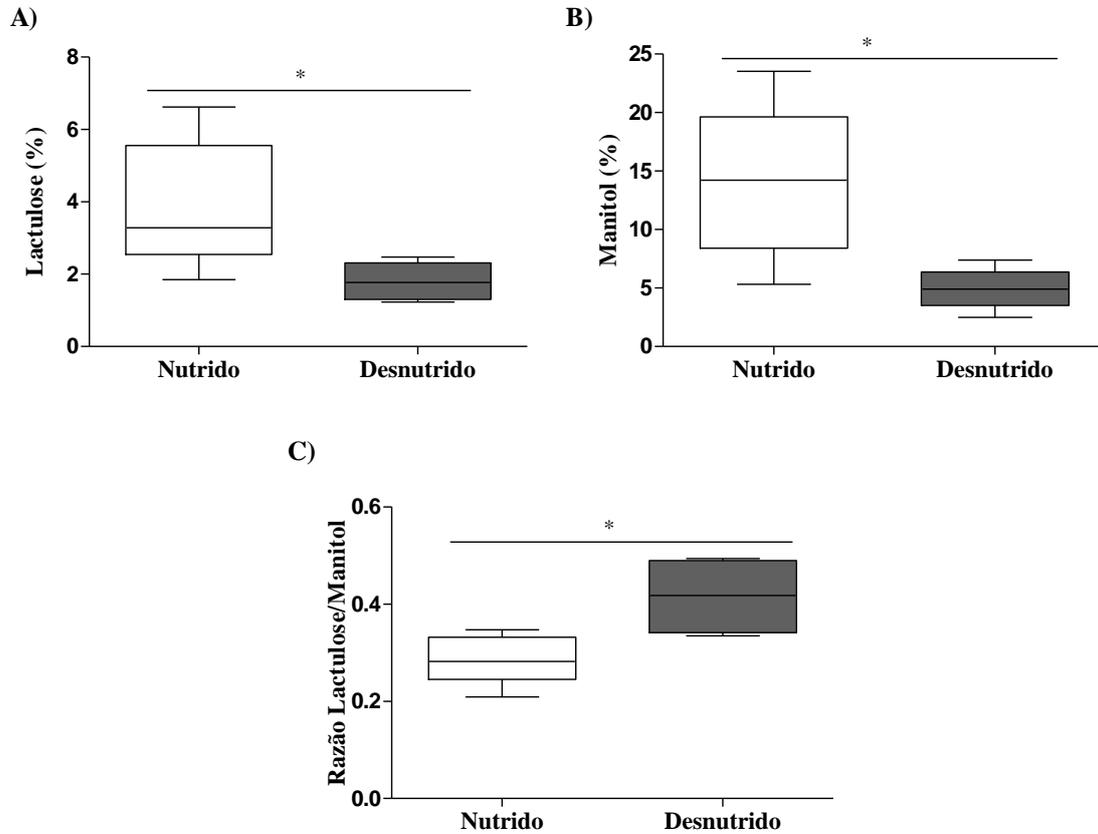
**Figura 12** – Percentual de excreção de lactulose, manitol e razão lactulose/manitol no 7º dia de consumo de DBR.



Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil da porcentagem de excreção de lactulose e manitol e da razão lactulose/manitol dos grupos nutrido e desnutrido ( $n=5$  por grupo). A) Percentual de excreção de lactulose. B) Percentual de excreção de manitol. C) Razão excreção de lactulose/manitol. A análise estatística foi feita através do teste não paramétrico *Mann Whitney* e os valores considerados significativos foram os \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,005$ .

Ao avaliarmos a permeabilidade no 14º dia, também observamos redução significativa ( $P=0,0095$ ) da excreção de lactulose nos animais desnutridos ( $1,8 \pm 0,23\%$ ) em relação aos nutridos ( $3,89 \pm 0,79\%$ ) (**Figura 13, item A**). Podemos ver também, excreção de manitol reduzida de modo significativo ( $P=0,019$ ) nos animais desnutridos ( $4,93 \pm 0,78\%$ ) quando comparado aos nutridos ( $14,06 \pm 2,96\%$ ) (**Figura 13, item B**). Em consequência, a razão lactulose/manitol (**Figura 13, item C**) aumentou de modo significativo ( $P=0,0317$ ) nos animais desnutridos ( $0,41 \pm 0,04$ ) em relação aos animais nutridos ( $0,28 \pm 0,02$ ), indicando dano intestinal.

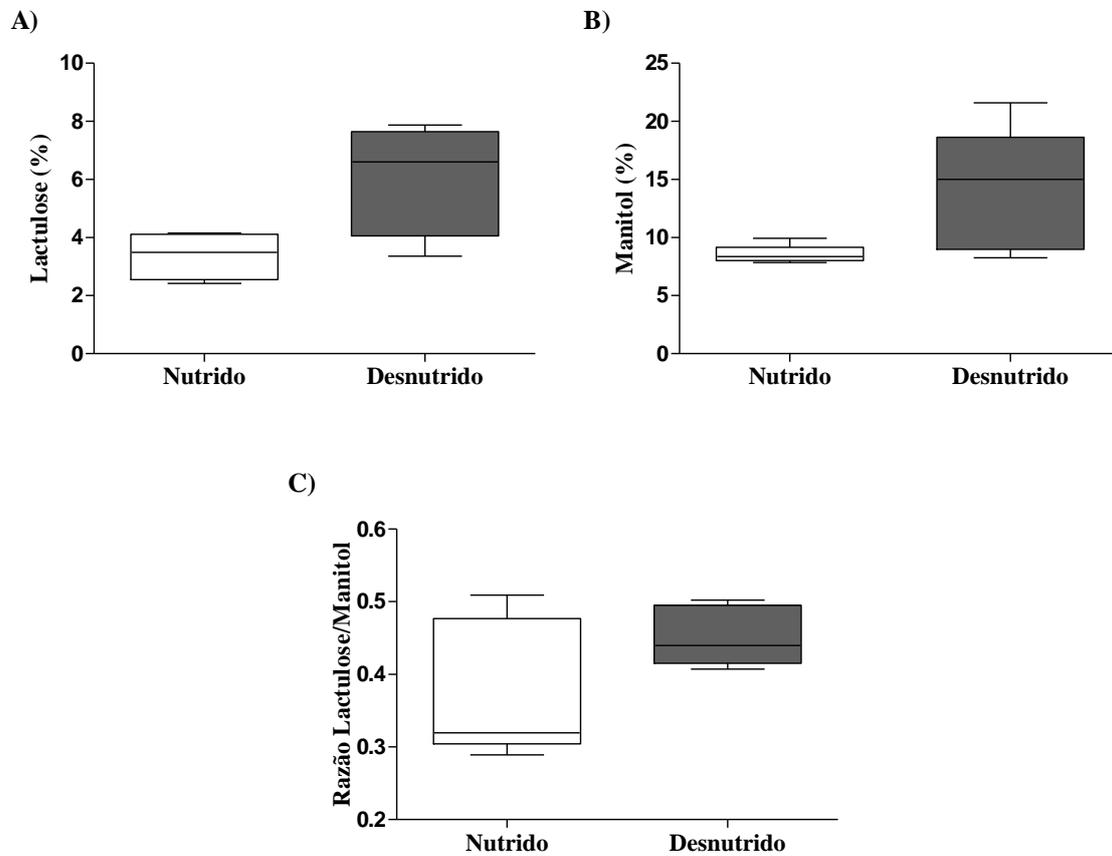
**Figura 13** – Percentual de excreção de lactulose, manitol e razão lactulose/manitol no 14º dia de consumo de DBR.



Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil da porcentagem de excreção de lactulose e manitol e da razão lactulose/manitol dos grupos nutrido e desnutrido ( $n=5$  por grupo). A) Percentual de excreção de lactulose. B) Percentual de excreção de manitol. C) Razão excreção de lactulose/manitol. A análise estatística foi feita através do teste não paramétrico *Mann Whitney* e os valores considerados significativos foram os  $*P \leq 0,05$ .

Em contrapartida, no 21º dia os animais desnutridos retornaram ao estado basal, ou seja, não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na permeabilidade a lactulose e manitol quando comparados aos animais nutridos (**Figura 14, item A e B, respectivamente**). Contudo, os animais desnutridos ( $6,0 \pm 0,84\%$ ) mostraram tendência ( $P=0,0556$ ) ao aumento da excreção de lactulose quando comparados com os animais nutridos ( $3,36 \pm 0,35\%$ ) (Figura 14, item A), indicando tendência ao aumento de permeação paracelular. Enquanto que, o percentual de excreção de manitol permaneceu inalterada ( $P=0,0952$ ) (Figura 14, item B), assim como a razão lactulose/manitol ( $P=0,4206$ ) (Figura 14, item C).

**Figura 14** - Percentual de excreção de lactulose, manitol e razão lactulose/manitol no 21º dia de consumo de DBR.



Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil da porcentagem de excreção de lactulose e manitol e da razão lactulose/manitol dos grupos nutrido e desnutrido ( $n=5$  por grupo). A) Percentual de excreção de lactulose. B) Percentual de excreção de manitol. C) Razão excreção de lactulose/manitol. A análise estatística foi feita através do teste *Mann Whitney* e os valores considerados significativos foram os  $P \leq 0,05$ .

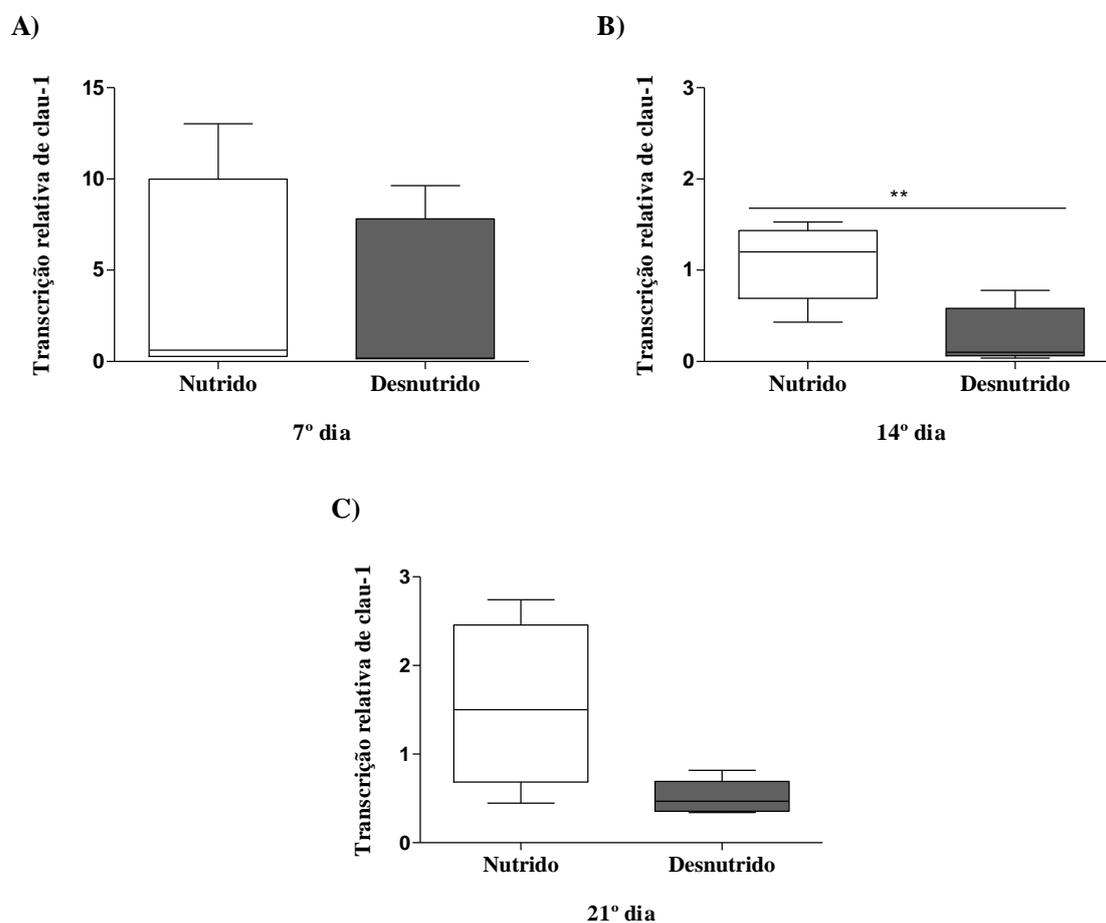
## 5.5 Efeitos da DBR na transcrição quantitativa relativa dos transportadores transmembranas, canal iônico e junções firmes

### 5.5.1 Alterações na transcrição relativa das junções firmes desencadeadas pela DBR

A **Figura 15** mostra que no 7º dia não houve nenhuma alteração significativa ao avaliarmos a transcrição relativa de claudina-1 (**item A**). No 14º dia, os animais desnutridos ( $0,28 \pm 0,13$  transcrição relativa) reduziram a transcrição gênica de claudina-1 de forma significativa ( $P=0,0159$ ) em relação aos animais nutridos ( $1,09 \pm 0,189$  transcrição relativa) (**Figura 15, item B**). Em contrapartida, no 21º dia os animais desnutridos ( $0,514 \pm 0,086$  relativa expressão) não apresentaram redução significativa ( $P=0,1111$ ) da transcrição gênica de claudina-1 quando comparados aos animais nutridos ( $1,54 \pm 0,47$  transcrição relativa)

(Figura 15, item C).

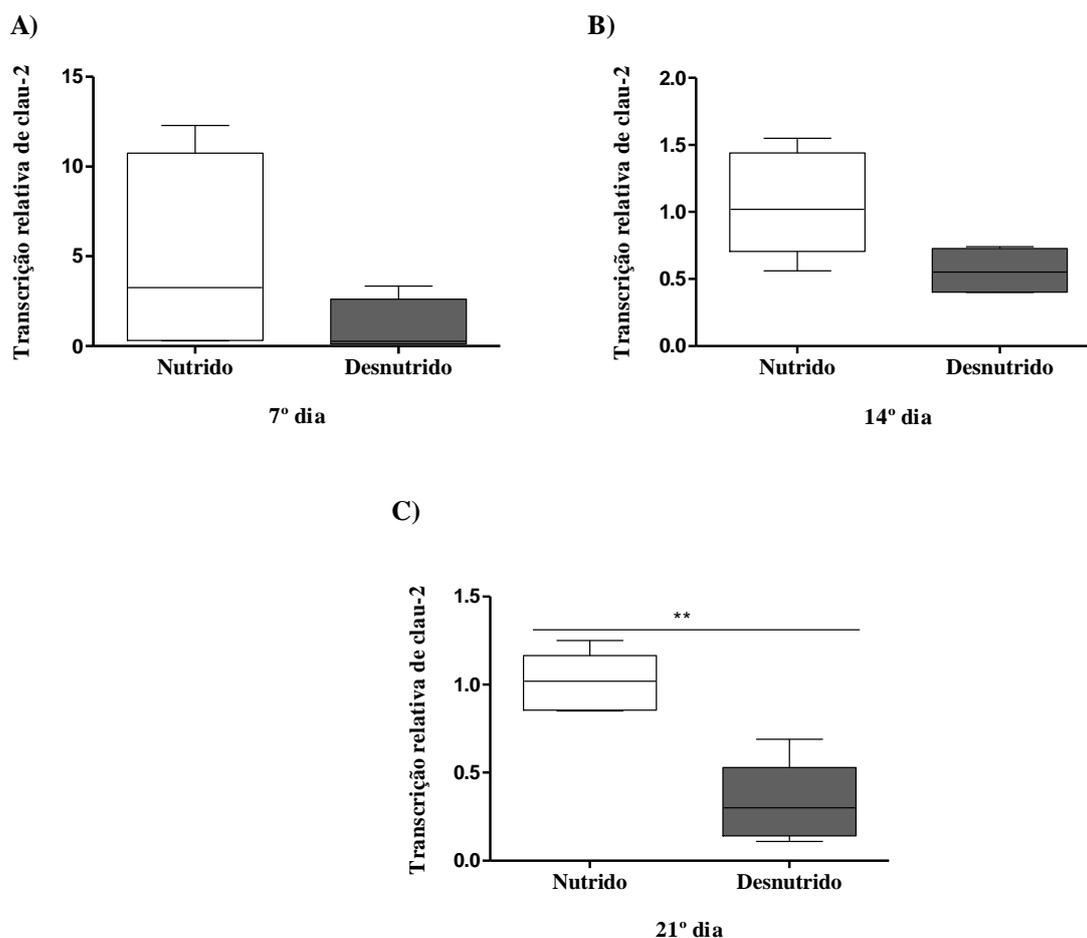
**Figura 15** – Análise da transcrição quantitativa relativa de claudina-1 após consumo de DBR.



Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil da transcrição relativa de claudina-1 (clau-1) nos grupos nutrido e desnutrido ( $n=5$  por grupo). A) Transcrição relativa de claudina-1 no 7º dia. B) Transcrição relativa de claudina-1 no 14º dia. C) Transcrição relativa de claudina-1 no 21º dia. A análise estatística foi feita através do teste não paramétrico *Mann Whitney* e os valores considerados significativos foram os  $**P \leq 0,005$ .

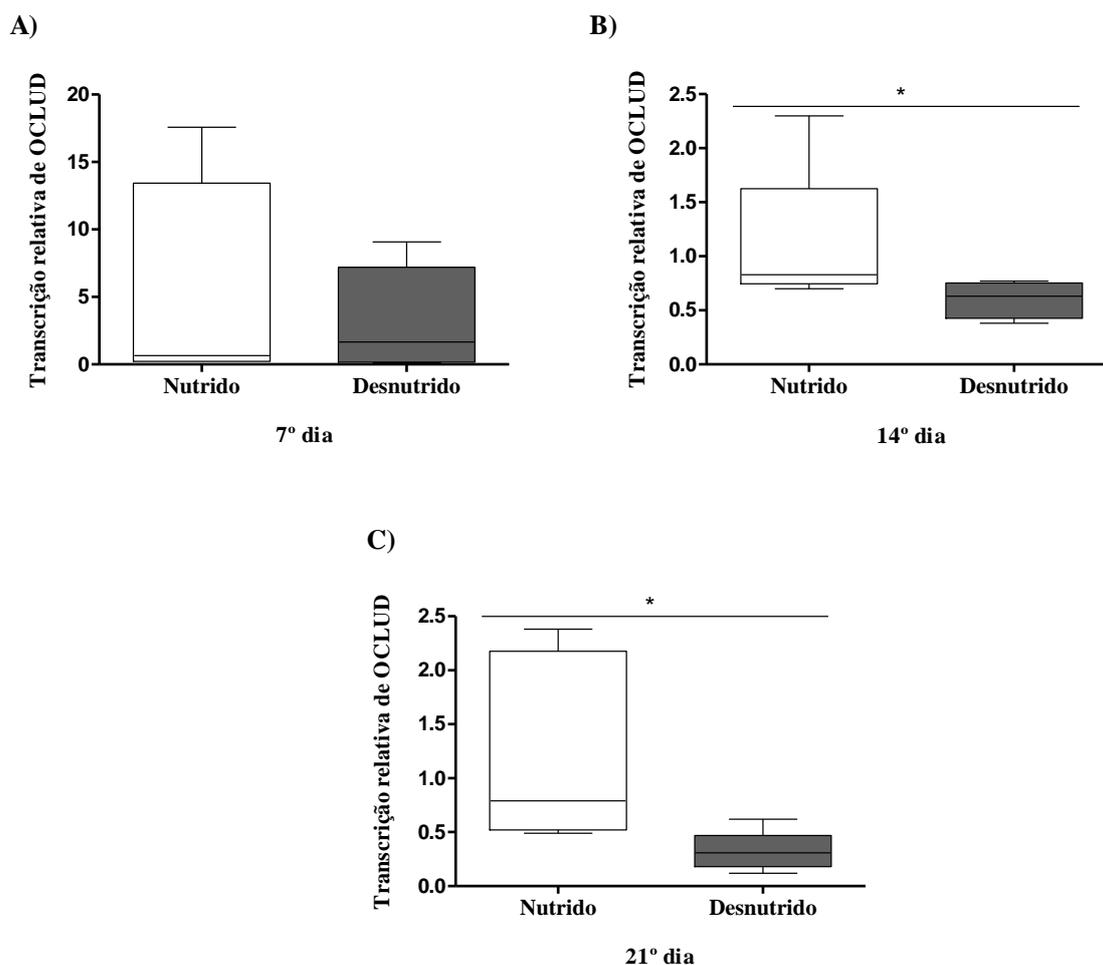
Ao avaliarmos a transcrição gênica de claudina-2, observamos que no 7º e 14º dia não houve diferença entre os grupos (**Figura 16, item A e B**). No entanto, a redução foi significativa ( $P=0,0079$ ) nos animais desnutridos ( $0,32 \pm 0,1$  transcrição relativa) em relação aos animais nutridos ( $1,0 \pm 0,07$  transcrição relativa) no 21º dia (**Figura 16, item C**).

**Figura 16** – Análise da transcrição quantitativa relativa de claudina-2 após consumo de DBR.



Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil da transcrição relativa de claudina-2 (clau-2) nos grupos nutrido ( $n=5$ ) e desnutrido ( $n=5$ ). A) Transcrição relativa de claudina-2 no 7º dia. B) Transcrição relativa de claudina-2 no 14º dia. C) Transcrição relativa de claudina-2 no 21º dia. A análise estatística foi feita através do teste não paramétrico *Mann Whitney* e os valores considerados significativos foram os  $**P \leq 0,005$ .

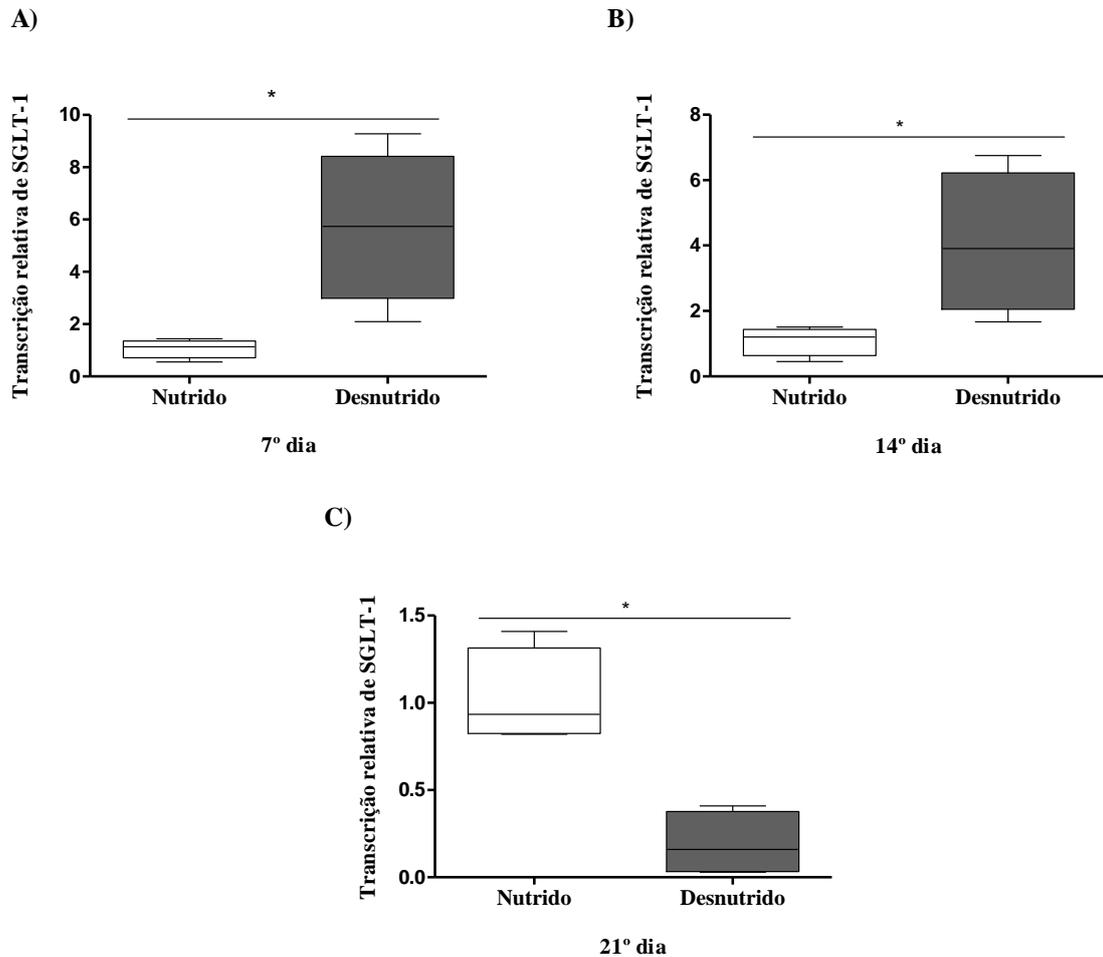
O efeito da desnutrição na relativa transcrição de ocludina foi semelhante em ambos os tempos, como mostra a **Figura 17**. No 14º dia e 21º dia, os animais desnutridos apresentaram redução significativa ( $P=0,0491$  e  $P=0,0173$ , respectivamente) dos níveis de RNAm de ocludina em relação aos animais nutridos (**Figura 17, item B e C**). Contudo, não houve modificações significativas no 7º dia (**Figura 17, item A**).

**Figura 17** – Análise da transcrição quantitativa relativa de ocludina após consumo de DBR.

Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil da transcrição relativa de ocludina (OCLUD) nos grupos nutrido e desnutrido ( $n=5$  por grupo). A) Transcrição relativa de ocludina no 7º dia. B) Transcrição relativa de ocludina no 14º dia. C) Transcrição relativa de ocludina no 21º dia. A análise estatística foi feita através do teste *Mann Whitney* e os valores considerados significativos foram os  $*P \leq 0,05$ .

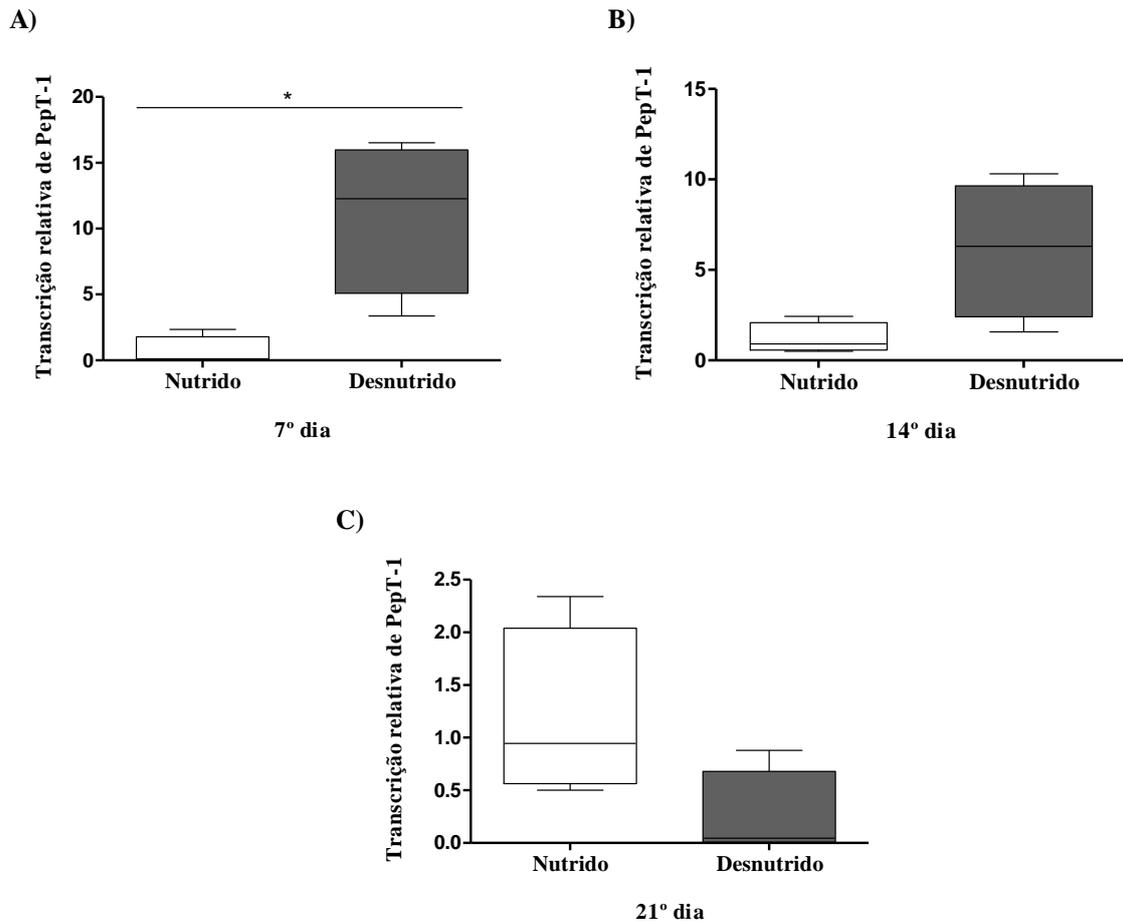
### 5.5.2 Alterações na transcrição relativa dos transportadores transmembranares e canal iônico desencadeadas pela DBR

A **Figura 18** mostra que a transcrição relativa de SGLT-1 foi maior de modo significativo ( $P = 0,0286$ ,  $P = 0,0159$ , respectivamente) nos animais desnutridos ( $5,71 \pm 1,46$ ;  $4,06 \pm 1,08$  transcrição relativa) em relação aos animais nutridos ( $1,05 \pm 0,15$ ;  $1,09 \pm 0,22$  transcrição relativa) no 7º e 14º dia (**item A e B**). Enquanto que, os níveis de RNAm de SGLT-1 foram menores de modo significativo ( $P=0,0286$ ) nos animais desnutridos ( $0,19 \pm 0,09$  transcrição relativa) em relação aos nutridos ( $1,02 \pm 0,13$  transcrição relativa) no 21º dia (**Figura 18, item C**).

**Figura 18** – Análise da transcrição quantitativa relativa de SGLT-1 após consumo de DBR.

Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil da transcrição relativa de SGLT-1 nos grupos nutrido e desnutrido ( $n=5$  por grupo). A) Transcrição relativa de SGLT-1 no 7º dia. B) Relativa transcrição de SGLT-1 no 14º dia. C) Relativa transcrição de SGLT-1 no 21º dia. A análise estatística foi feita através do teste não paramétrico *Mann Whitney* e os valores considerados significativos foram os  $*P \leq 0,05$ .

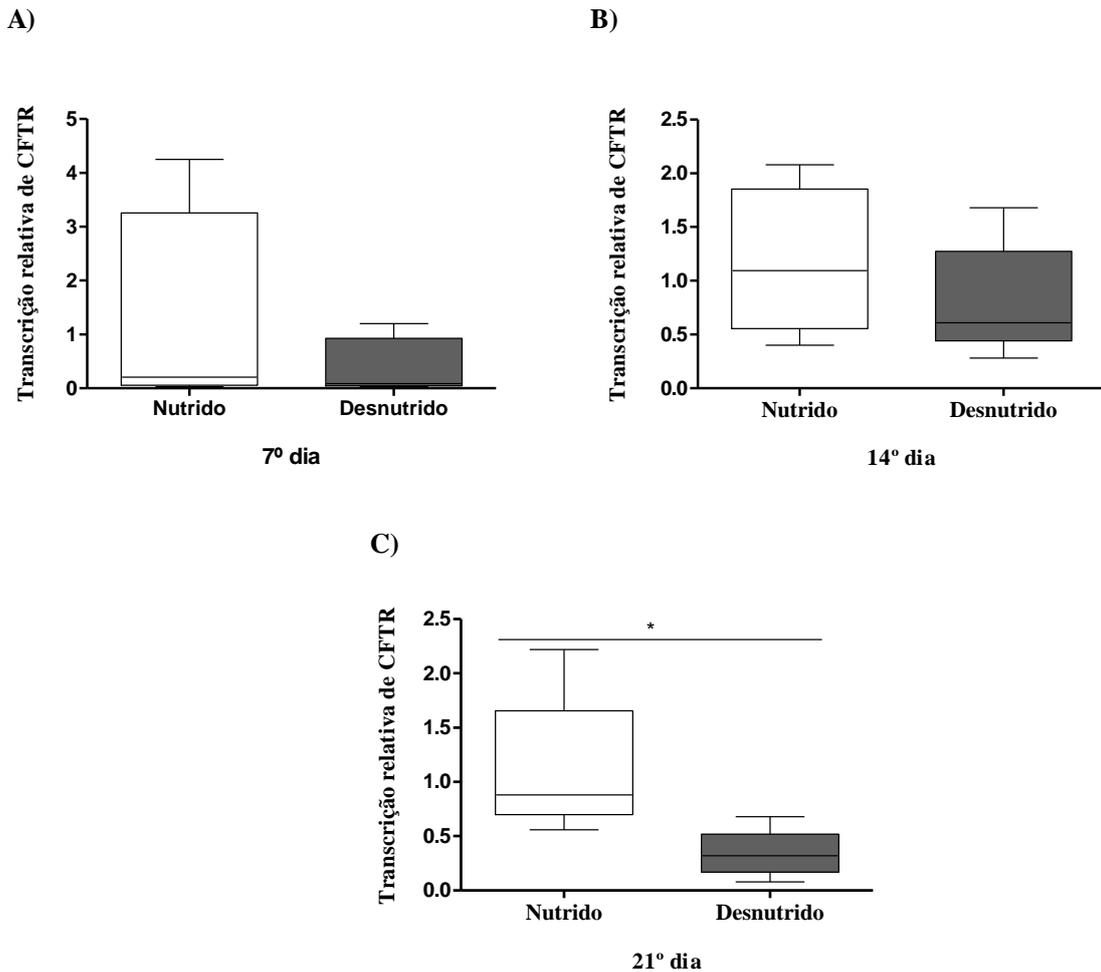
A transcrição relativa de PepT-1 reduziu de modo significativo ( $P = 0,0286$ ) nos animais desnutridos ( $11,12 \pm 2,88$  transcrição relativa) em relação aos animais nutridos ( $0,65 \pm 0,56$  transcrição relativa) no 7º dia (**Figura 19, item A**). No 14º dia, os níveis de transcritos de PepT-1 mostrou apenas uma tendência significativa ( $P=0,0571$ ) ao aumento nos animais desnutridos ( $6,12 \pm 1,87$  transcrição relativa) em relação aos animais nutridos ( $1,18 \pm 0,42$  transcrição relativa) (**Figura 19, item B**). Em contrapartida, no 21º dia os níveis de RNAm de PepT-1 foram menores nos animais desnutridos ( $0,24 \pm 0,21$  transcrição relativa) em relação aos nutridos ( $1,18 \pm 0,4$  transcrição relativa), porém sem diferença significativa ( $P= 0,1143$ ) (**Figura 19, item C**).

**Figura 19** – Análise da transcrição quantitativa relativa de PepT-1 após consumo de DBR.

Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil da transcrição relativa de PepT-1 nos grupos nutrido e desnutrido ( $n=5$  por grupo). A) Transcrição relativa de PeT-1 no 7º dia. B) Transcrição relativa de PeT-1 no 14º dia. C) Transcrição relativa de PeT-1 no 21º dia. A análise estatística foi feita através do teste não paramétrico *Mann Whitney* e os valores considerados significativos foram os  $*P \leq 0,05$ .

Ao avaliarmos os níveis de RNAm de CFTR, no 7º e 14º dia os níveis de transcritos permaneceram sem alteração significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos (**Figura 20, item A e B**). Em oposição, identificamos redução significativa ( $P = 0,0159$ ) nos animais desnutridos ( $0,34 \pm 0,09$  transcrição relativa) em relação aos animais nutridos ( $1,11 \pm 0,28$  transcrição relativa) apenas no 21º dia (**Figura 20, item B**).

**Figura 20** – Análise da transcrição quantitativa relativa de CFTR após consumo de DBR.

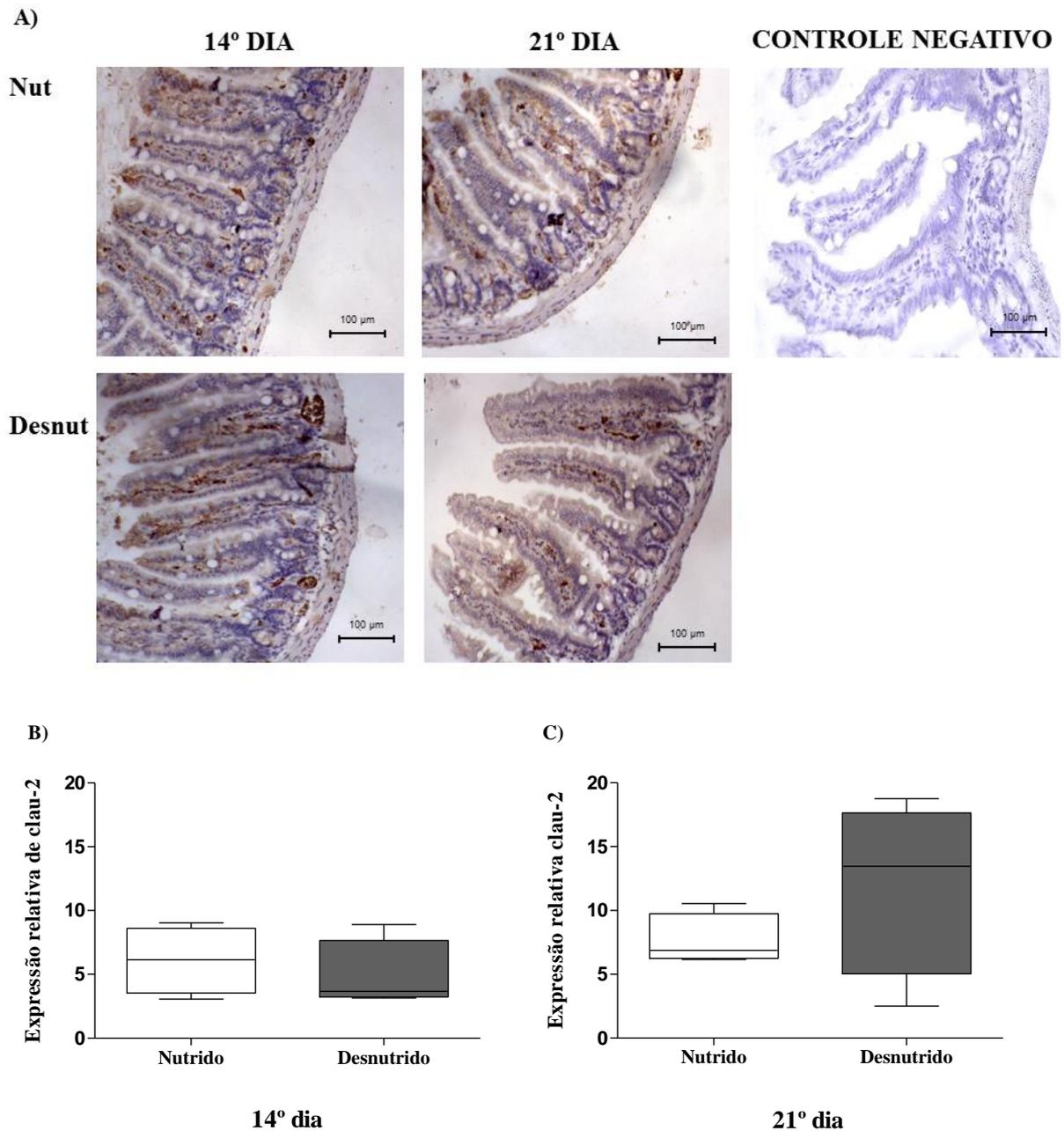


Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil da transcrição relativa de CFTR nos grupos nutrido e desnutrido ( $n=5$  por grupo). A) Transcrição relativa de CFTR no 7º dia. B) Transcrição relativa de CFTR no 14º dia. C) Transcrição relativa de CFTR no 21º dia. A análise estatística foi feita através do teste não paramétrico *Mann Whitney* e os valores considerados significativos foram os  $*P \leq 0,05$ .

## 5.6 Expressão proteica dos transportadores transmembranas e junções firmes após indução de desnutrição por DBR

A **Figura 21** mostra a expressão relativa de claudina-2. Nota-se marcação por todo epitélio desde a cripta ao vilão em ambos os grupos nutridos e desnutridos no 14º dia e 21º dia (**Figura 21, item A**). A quantificação indireta da área marcada mostrou que não há diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na expressão de claudina-2 entre os grupos nutridos e desnutridos no 14º e 21º dia (**Figura 21, item B e C**).

**Figura 21** – Expressão quantitativa relativa e localização de claudina-2 após consumo de DBR.

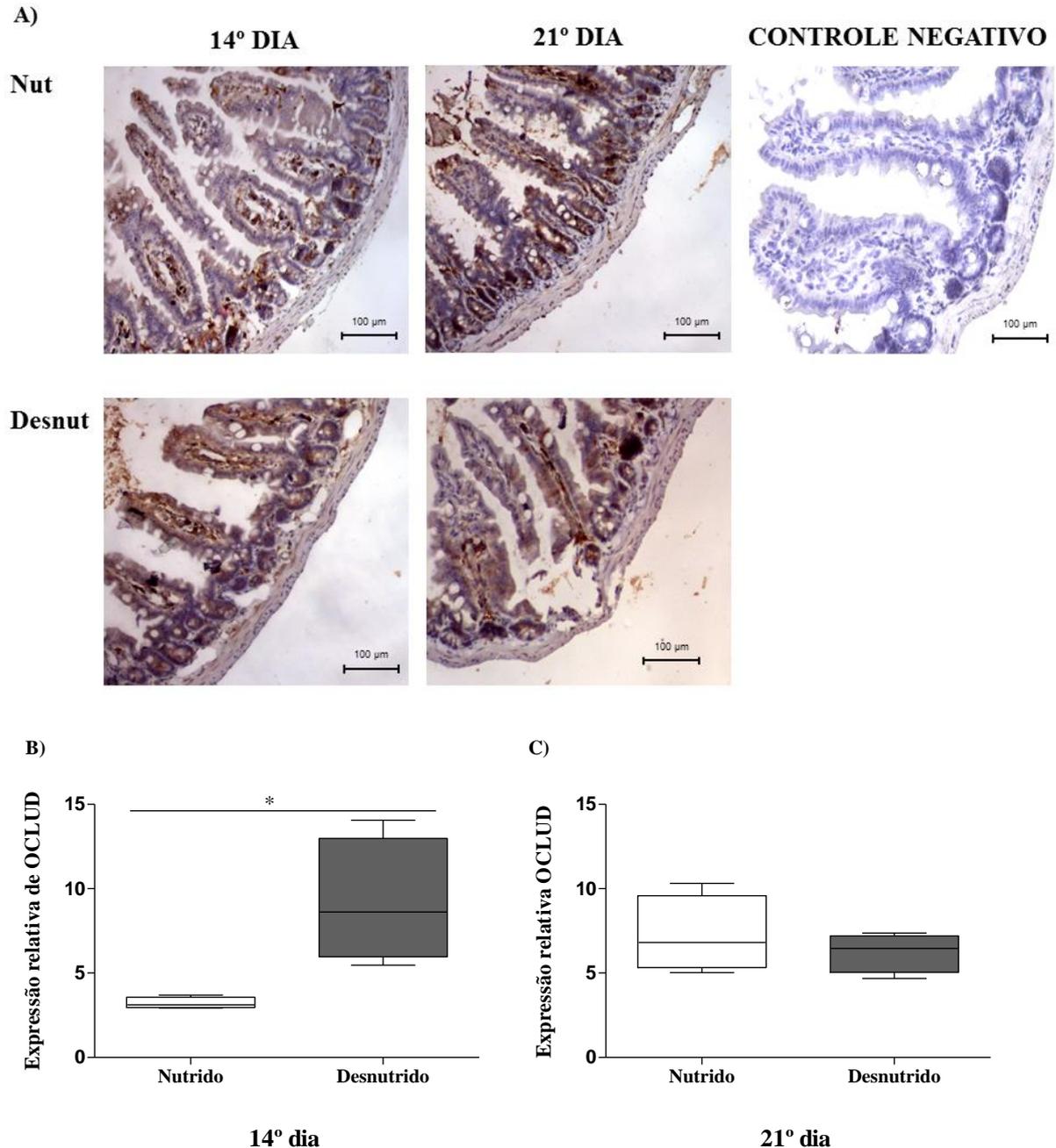


Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil da expressão relativa de claudina-2 (clau-2) nos grupos nutrido e desnutrido ( $n=4$  por grupo). A) Figuras representativas da marcação proteica de claudina-2 no 14° e 21° dia (aumento 200 x). B) Expressão relativa de claudina-2 no 14° dia. C) Expressão relativa de claudina-2 no 21° dia. A análise estatística foi feita através do teste não paramétrico *Mann Whitney* e os valores considerados significativos foram os  $P \leq 0,05$ .

Ao avaliarmos qualitativamente a expressão relativa de ocludina, detectamos ao longo de todo epitélio no 14° e 21° dia tanto no grupo nutrido como no grupo desnutrido (**Figura 22, item A**). Contudo, detectou-se aumento significativo ( $P= 0,0286$ ) da expressão proteica de ocludina nos animais desnutridos ( $9,19 \pm 1,84$  expressão relativa) quando comparados aos

nutridos ( $3,21 \pm 0,16$  expressão relativa) (**Figura 22, item B**). Em contrapartida, a quantificação indireta da área marcada no 21º dia mostrou que não há diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos nutridos e desnutridos no 21º dia (**Figura 22, item C**).

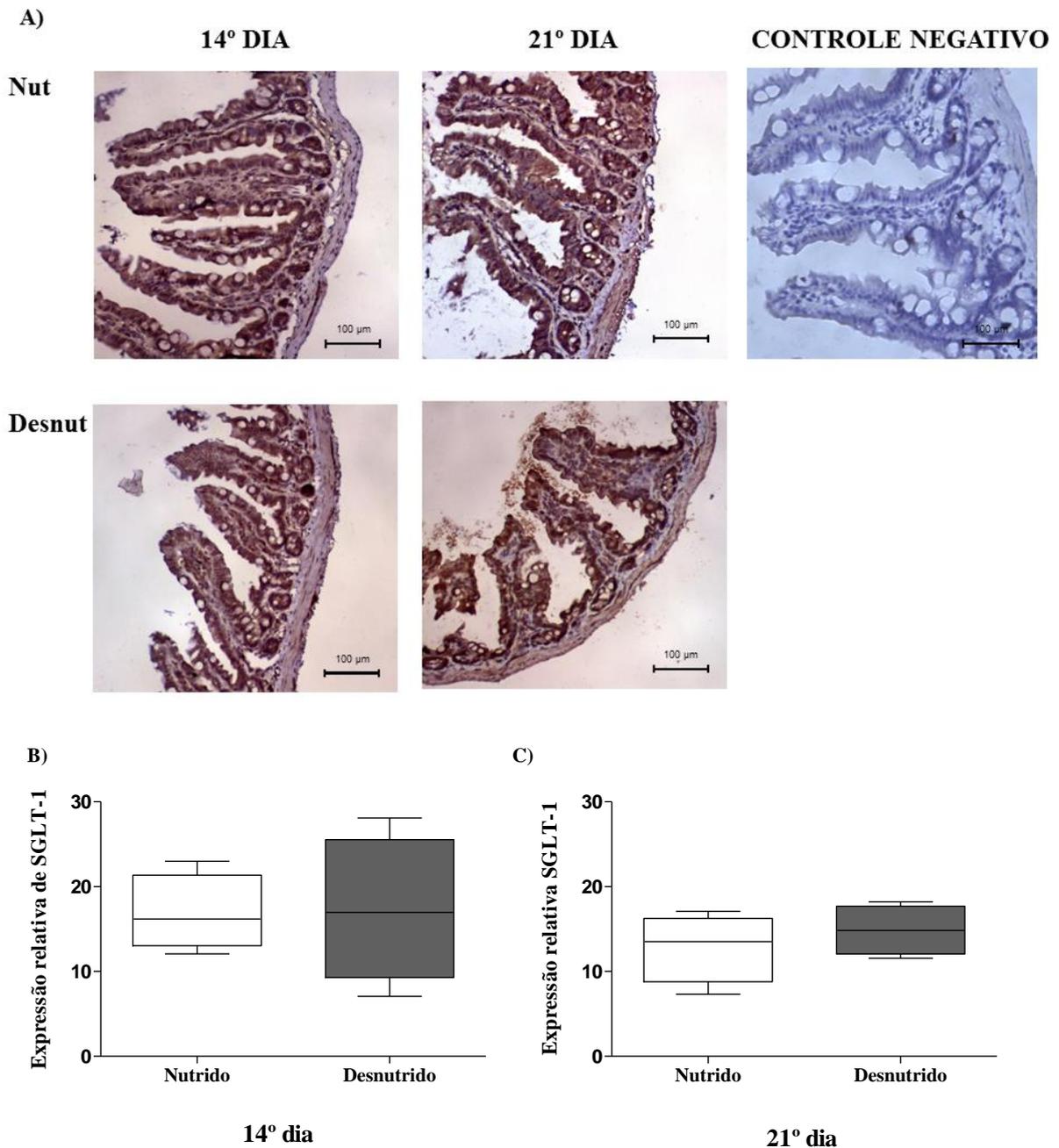
**Figura 22** - Expressão quantitativa relativa e localização de ocludina após consumo de DBR.



Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil da expressão relativa de ocludina (OCLUD) nos grupos nutrido e desnutrido ( $n=4$  por grupo). A) Figuras representativas da marcação proteica de ocludina no 14º e 21º dia (aumento 200 x). B) Expressão relativa de ocludina no 14º dia. C) Expressão relativa de ocludina no 21º dia. A análise estatística foi feita através do teste não paramétrico *Mann Whitney* e os valores considerados significativos foram os  $*P \leq 0,05$ .

A expressão relativa de SGLT-1 foi detectada na região apical longo de todo epitélio no 14º e 21º dia tanto no grupo nutrido como no grupo desnutrido (**Figura 23, item A**). Entretanto, não foi observada alteração significativa ( $P > 0,05$ ) na quantificação da expressão proteica de SGLT-1 entre os grupos no 14º e 21º dia (**Figura 23, item A e B**).

**Figura 23** - Expressão quantitativa relativa e localização de SGLT-1 após consumo de DBR.



Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil da expressão relativa de SGLT-1 nos grupos nutrido e desnutrido ( $n=4$  por grupo). A) Figuras representativas da marcação proteica de SGLT-1 no 14º e 21º dia (aumento 200 x). B) Expressão relativa de SGLT-1 no 14º dia. C) Expressão relativa de SGLT-1 no 21º dia. A análise estatística foi feita através do teste não paramétrico *Mann Whitney* e os valores considerados significativos foram os  $P \leq 0,05$ .



### **5.7 Impacto da DBR na composição corporal, morfologia, função intestinal, transcrição e expressão proteica relativa dos transportadores transmembranas e junções firmes**

A **Figura 25** mostra todas as alterações desencadeadas pelo consumo da dieta multideficiente. A DBR desencadeia atraso no desenvolvimento físico, com redução do peso e redução do ganho ponderal de peso a partir do 7º dia. A composição corporal também é alterada em curto período de tempo, no qual há redução de massa magra, massa livre de gordura, bem como volume de água corporal total, fluído extracelular.

As alterações na composição corporal e desenvolvimento físico foram acompanhados de modificações dinâmicas na morfologia e função da barreira epitelial intestinal. No 7º dia houve redução da altura da cripta e aumento da razão vilo/cripta no jejuno, além da redução de área absorptiva total, da permeabilidade paracelular e aumento dos níveis de RNAm de SGLT-1 e PepT-1. No 14º dia, observou-se redução do comprimento da cauda, fluído intracelular, atrofia de vilo e cripta no jejuno, bem como atrofia do vilo no íleo, redução da permeabilidade paracelular e área absorptiva, com indicativo de dano a permeabilidade intestinal. Além disso, as alterações na função intestinal no 14º dia foram associadas com redução de níveis de RNAm de claudina-1, ocludina, aumento nos níveis gênicos de SGLT-1 e aumento da expressão proteica de ocludina. Entretanto, no 21º dia, a DBR desencadeia aumento da razão vilo/cripta, com redução de cripta e manutenção do vilo no jejuno, sem alterações na morfologia do íleo, na permeabilidade intestinal e na expressão de proteínas de junção firmes e transportadores transmembranas, SGLT-1 e PepT-1, com redução da transcrição dos genes de claudina-2, ocludina, SGLT-1 e CFTR.

**Figura 25** – Avaliação cinética do consumo de DBR em camundongos recém-desmamados.

		7° Dia	14° Dia	21° Dia
<b>Desenvolvimento</b>	<b>Peso</b>	Redução	Redução	Redução
	<b>Ganho de peso</b>	Redução	Redução	Redução
	<b>Comp. da cauda</b>	Sem alteração	Redução	Redução
<b>Composição corporal</b>	<b>IMC</b>	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
	<b>MG</b>	Sem alteração	Redução	Redução
	<b>MLG</b>	Redução	Redução	Redução
	<b>ACT</b>	Redução	Redução	Redução
	<b>FE</b>	Redução	Redução	Redução
	<b>FI</b>	Sem alteração	Redução	Sem alteração
<b>Morfologia</b>	<b>Íleo</b>	Sem alterações	Redução do vilosidade	Sem alterações
	<b>Jejuno</b>	Redução da cripta Aumento da razão	Redução do vilosidade Redução da cripta	Redução da cripta Aumento da razão
<b>Permeabilidade</b>	<b>Lactulose</b>	Redução da excreção	Redução da excreção	Sem alterações
	<b>Manitol</b>	Redução da excreção	Redução da excreção	Sem alterações
	<b>Razão lactulose/manitol</b>	Sem alterações	Aumento da razão	Sem alterações
<b>Transcrição relativa</b>	<b>Clau-1</b>	Sem alterações	Redução	Sem alterações
	<b>Clau-2</b>	Sem alterações	Sem alterações	Redução
	<b>Oclud</b>	Sem alterações	Redução	Redução
	<b>SGLT-1</b>	Aumento	Aumento	Redução
	<b>PepT-1</b>	Aumento	Sem alterações	Sem alterações
	<b>CFTR</b>	Sem alterações	Sem alterações	Redução
<b>Expressão proteica</b>	<b>Clau-2</b>	-	Sem alterações	Sem alterações
	<b>Oclud</b>	-	Aumento da expressão	Sem alterações
	<b>SGLT-1</b>	-	Sem alterações	Sem alterações
	<b>PepT-1</b>	-	Sem alterações	Sem alterações

Fonte: Autor.

Legenda: Esquemática dos resultados desencadeados nos animais desnutridos pela DBR no 7°, 14° e 21° dia. IMC: índice de massa corpórea; MG: massa gorda; MLG: massa livre de gordura; ACT: água corporal total; FE: fluido extracelular; FI: fluido intracelular.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a dinâmica dos efeitos da dieta básica regional na barreira intestinal de camundongos C57BL/6, no intuito de melhor compreender a precoce fisiopatologia intestinal em crianças desnutridas de países em desenvolvimento. A ingestão da dieta multideficiente induziu o desenvolvimento atrofiado em animais, além de, alterar a composição corporal dos animais, a permeabilidade intestinal, os aspectos morfológicos intestinais, a transcrição gênica e expressão de proteínas formadoras de junções firmes e de transportadores intestinais.

A introdução de uma dieta não balanceada durante a primeira infância está diretamente relacionada com consequências a curto e longo prazo resultantes de respostas adaptativas desencadeadas por modificações epigenéticas (AGOSTI et al., 2017). Assim, o desenvolvimento de modelos em animais recém-desmamados vem ajudando na melhor compreensão da fisiopatologia associada a dietas multideficientes (BROWN et al., 2015; MOORE et al., 2014, JACOBI et al., 2013). Diferente dos trabalhos reportados na literatura, nossos resultados permitiram uma avaliação da cinética de alterações desencadeadas por uma dieta multideficiente, característica de populações de baixo poder socioeconômico do Nordeste brasileiro, na composição corporal, morfologia e função intestinal de roedores recém-desmamados.

No presente estudo, a ingestão de DBR foi capaz de reduzir o peso e ganho de peso na primeira semana, assim como ocasionou a redução de massa magra, massa gorda, fluidos corporais, sem alterações no índice de massa corporal dos animais e redução do comprimento da cauda a partir do 14º dia. A DBR, em diferentes modelos murinos, é caracterizada principalmente por um retardo de ganho de peso (BOLICK et al., 2013; MOORE et al., 2014, JACOBI et al., 2013), além de reproduzir alguns sinais clínicos de marasmo (TEODÓSIO et al., 1990). Modelos semelhantes também reportaram redução do peso e ganho ponderal de peso em curto período de tempo (BROWN et al., 2015; SAMPAIO et al., 2016). Em oposição, o indicador de desenvolvimento físico foi diferente de um estudo semelhante, que reportou redução do comprimento da cauda apenas no 21º dia de indução (BROWN et al., 2015).

O crescimento linear e o peso relacionado à idade são parâmetros-ouro preconizados pela OMS para diagnóstico de desnutrição (WHO, 2006). Contudo, diversas outras medidas antropométricas também são utilizadas para diagnóstico da desnutrição, como por exemplo, o

índice de massa corporal (IMC), dobras cutâneas, circunferência do braço médio, retenção de líquidos, dentre outros (WHO, 2006). O IMC é um método simples, econômico e não invasivo correlacionado com medidas de gordura, sobrepeso, obesidade e desnutrição (ACUÑA; CRUZ, 2004). Esse índice é bastante utilizado na clínica para diagnóstico de desnutrição quando associada com pontos de corte estabelecidos pela OMS (MUST; ANDERSON, 2006; SOETERS et al., 2017; WHO, 2006). A circunferência do braço e espessura cutânea em pelo menos dois pontos são associadas com a espessura do tecido muscular e adiposo, respectivamente, e correlacionadas com desnutrição crônica (baixo peso para idade) (FRIEDMAN et al., 2005; TANNER et al., 2014; WHO, 2006). Enquanto que, a retenção de líquido é indicativa de desnutrição aguda grave decorrente de deficiência proteica crônica (COULTHARD, 2015).

Estudos sobre a desnutrição em Fortaleza mostraram que crianças de 24 a 60 meses submetidas a uma nutrição inadequada apresentaram desnutrição leve para o índice WHZ e moderada para os índices HAZ e WAZ (PSAKI et al., 2012; LIMA et al., 2014b). Logo, a redução do ganho de peso e desenvolvimento físico em animais submetidos a uma dieta multideficiente demonstra que a DBR é capaz de desnutrir animais em período de desenvolvimento crítico, assim como é evidenciado na clínica. Em contrapartida, os animais desnutridos pela DBR não apresentaram alterações no índice de massa corporal em nenhum tempo. Nenhum trabalho, até o momento, avaliou a influência da DBR sobre o IMC. Contudo, isto pode ser resultado de algumas limitações do método para roedores, visto que na clínica o parâmetro é dependente de correlação do IMC com a idade e pontos de corte (MUST; ANDERSON, 2006). Além disso, Pomeroy et al. (2012) mostraram que em estados de desnutrição crônica há alterações de estrutura corporal; que, por sua vez, ocasionam o aumento do IMC e assim não predizem o real estado nutricional (ACUÑA; CRUZ, 2004).

Na desnutrição, o metabolismo de diversos órgãos é sustentado principalmente pela mobilização de gordura, assim como as reservas proteicas são acionadas quando o consumo de proteínas é insuficiente para manter o metabolismo proteico (CAHILL, 2006). Na clínica, crianças com marasmo reduzem drasticamente as reservas proteicas em relação ao peso corporal, assim como a massa gorda (VAN DEN BROECK; EECKELS; HOKKEN-KOELEGA, 1998). O declínio de reservas energéticas, em particular perda de massa muscular, é associado com o aumento de risco de mortalidade (VAN DEN BROECK; EECKEL; HOKKEN-KOELEGA, 1998), que pode ser explicado pelo agravamento da função de órgãos-chave devido à falta de energia (BRIEND et al., 2015).

A DBR, introduzida em fases iniciais de desenvolvimento, promoveu redução de massa magra partir do 7º dia, bem como reduziu a massa gorda e o comprimento da cauda a partir do 14º dia. Os animais desnutridos também apresentaram redução da retenção de líquidos em todos os tempos avaliados, indicando ausência de edema, mesmo como aumento do consumo de água no 11º dia. Na clínica, a desnutrição aguda grave, derivada da restrição calórica e proteica, é tipicamente caracterizada pela perda de tecido adiposo e tecido muscular, sem presença de edema e com proteínas viscerais relativamente normais, incluindo albumina (SOETERS et al., 2017). Assim, a ausência de edema, redução de massa magra e massa gorda no presente estudo indicam um quadro clínico de marasmo induzidos pela DBR, como foi reportado por Teodósio et al. (1990).

Além disso, tecido o adiposo desempenha um papel na manutenção do sistema imunológico devido à produção de leptina (WELLS; CORTINA-BORJA, 2013). Assim, a redução da resposta imunológica aumenta a susceptibilidade a doenças infecciosas (GUERRANT et al., 2008; 2013) e conseqüentemente eleva o risco de mortalidade devido ao aumento de metabolização de reservas proteicas (REEDS; FJELD; JAHOOR, 1994). Logo, a associação da redução de reservas energéticas, massa livre de gordura e massa gorda, pode indicar um possível comprometimento da resposta imune nestes animais e conseqüente aumento de susceptibilidade a doenças infecciosas, tal como é reportado para modelos com DBR (BOLICK et al., 2013; COUTINHO et al., 1992).

O presente estudo também identificou alterações nos fluídos intracelulares e extracelulares. A diferenciação do fluído intracelular e do fluído extracelular é muito importante na avaliação nutricional (WATERLOW et al., 1992). Gartner et al. (2003) identificaram que a desnutrição crônica é responsável por comprometer o crescimento de fluídos intracelulares e expandir os fluídos extracelulares, no decorrer do tempo. Diferente do observado no presente estudo, no qual os animais desnutridos apresentaram atrofia da fluído extracelular a partir do 7º dia, enquanto que a atrofia de fluído intracelular se deu apenas no 14º dia.

A mensuração de fluído intracelular é correspondente à massa celular e proporciona uma base de referência para a medição do consumo de oxigênio, requisitos calóricos, taxa metabólica basal e desempenho no trabalho (EARTHMAN et al., 2000; SHIZGAL, 1990). Em contrapartida, o fluído extracelular indica componentes extracelulares sólidos e matrizes

intersticiais, que consistem em grande parte dos tecidos derivados de colágeno, assim como o fluido intersticial e plasma (EARTHMAN et al., 2000).

Nenhum trabalho até o momento avaliou alterações desencadeadas pela desnutrição em modelo animal nos volumes de fluídos intracelulares e extracelulares. Contudo, o atraso de desenvolvimento da massa extracelular nos animais desnutridos pode indicar atrofia na formação de tecido de preenchimento e plasma. Além disso, aproximadamente 20% do fluido extracelular corresponde ao volume plasmático (FOGARTY; LOUGHREY, 2016) e o aumento de eletrólitos no plasma está diretamente associado com aumento da reabsorção de água no túbulo renal, redução da retenção de líquidos no espaço intersticial e aumento do consumo hídrico (CENEVIVA et al., 2008; FOGARTY; LOUGHREY, 2016; HEER et al., 2000). Portanto, a redução da água corporal total, fluido extracelular e aumento do consumo de água a partir do 11º dia pode indicar aumento de eletrólitos no plasma sanguíneo em animais desnutridos pela DBR.

Em oposição, às alterações no fluido intracelular indicam preservação inicial da taxa metabólica celular nos animais desnutridos, que decai no 14º dia juntamente com o perfil de reservas energéticas e retorna ao estado basal no 21º dia. Cheek et al. (1970) reportaram que a restauração da fase celular ou do protoplasma metabolicamente ativo é de grande importância para manutenção do metabolismo. Logo, o retorno do fluido intracelular ao estado basal indica restauração da taxa metabólica no 21º dia.

Além das alterações nos parâmetros corporais dos animais desnutridos, a DBR também desencadeou respostas adaptativas na barreira intestinal. O trato gastrointestinal é o primeiro sistema diretamente afetado por mudanças na ingestão de nutrientes, exibindo rápidas alterações fisiológicas e morfológicas (FERRARIS; CAREY, 2000). No 7º dia, o grupo desnutrido apresentou redução da altura da cripta e aumento da razão vilo/cripta no jejuno, sem alterações morfológicas no íleo. Além disso, o teste de permeabilidade intestinal indicou redução da permeação paracelular e área absorptiva, sem alterações nos níveis de RNAm das junções firmes e aumento dos níveis de RNAm de SGLT-1 e PepT-1.

As alterações morfológicas e funcionais em modelo de desnutrição por DBR ocorreu de modo diferente do reportado pela literatura. Os mecanismos de proliferação e apoptose de células do epitélio intestinal são altamente coordenados e podem ser alterados por diversas condições (EDELBLUM et al., 2006; RAMACHANDRAN; MADESH;

BALASUBRAMANIAN, 2000). Estudo recente mostrou que a desnutrição induzida por DBR reduz a altura da cripta da porção ileal em curto período de tempo (SAMPAIO et al., 2016). Enquanto que, em modelo porcino a desnutrição em curto prazo desencadeou diminuição do peso corporal, sem efeitos na permeabilidade intestinal e na altura das vilosidades do jejuno (JACOBI et al., 2013). Estudo realizado por Ueno et al. (2011), identificou que as alterações morfológicas intestinais desencadeadas por DBR são resultados de alterações subjacentes nas taxas de proliferação e apoptose. Assim, as alterações morfológicas observadas no jejuno indicam que em curto prazo, o consumo de DBR pode desencadear ligeiras mudanças na proliferação e apoptose de células intestinais.

O teste de lactulose e manitol (L/M) é um marcador consistente, não invasivo e sensível à permeabilidade intestinal (MENZIES; LAKER; POUNDER, 1979), bastante utilizado na clínica (BEHRENS et al, 1987). A lactulose e manitol são açúcares não metabolizados, no qual a lactulose é absorvida apenas via paracelular, enquanto que o manitol permeia a célula através da bicamada lipídica da membrana plasmática (FLEMING et al., 1990). Assim, o teste atua como indicador da integridade paracelular e área absorptiva da mucosa, bem como preditor de ruptura e disfunção da mucosa intestinal (HOSSAIN et al., 2016). Na clínica, o teste é usado como principal diagnóstico de enteropatia ambiental, no qual as crianças acometidas apresentam maior razão das taxas de lactulose e manitol que crianças saudáveis (HOSSAIN et al., 2016; LEE et al., 2014; LIMA et al., 2017). Além disso, o teste também é usado para identificar a eficácia de tratamentos para desnutrição e infecções diarreicas (BARBOZA et al., 1999; LIMA et al., 2007; 2014a).

A DBR, no presente estudo, reduziu a permeabilidade paracelular e aumentou a área absorptiva no 7º dia de indução da desnutrição. Krugliak et al. (1994) reportaram que a absorção de manitol se dá de forma passiva, depende da absorção de água e ocorre principalmente no colon. Assim, o teste indica redução de área absorptiva de modo geral nos animais desnutridos por DBR no 7º dia. A avaliação de alterações na área absorptiva total é pouco reportada na clínica e não avaliada em modelos pré-clínicos. Contudo, foi observado redução de área absorptiva em crianças com *kwashiorkor* que apresentavam diarreia (BREWSTER et al., 1997).

A redução de permeabilidade paracelular no 7º dia pode indicar um reajuste na transcrição e expressão de outras proteínas formadoras de junções firmes, apesar da ausência de alterações nos níveis de RNAm de ocludina, claudina-1 e 2. Um estudo recente

demonstrou que modelo agudo de desnutrição por DBR pode ocasionar alterações na permeabilidade intestinal decorrente do aumento nos níveis de transcritos de ocludina e claudina-2, porém sem alterar a expressão das mesmas (SAMPAIO et al., 2016).

As junções firmes são constituídas por mais de 40 proteínas, com função e padrões de expressão diferenciados (SUZUKI, 2013). Alterações na expressão de claudinas formadoras de barreira ou de claudinas formadoras de poros podem estar relacionadas com alterações na permeabilidade. Visto que, claudinas formadoras de barreira podem aumentar a resistência transepitelial, diminuindo a permeabilidade, enquanto que, claudinas formadoras de poros pode reduzir a resistência transepitelial, aumentando a permeabilidade (GUNZEL; YU, 2013). Além disso, estudos de permeabilidade as junções firmes identificaram dois tipos de populações de claudinas formadoras de poros, uma permeável a pequenos íons e solutos neutros e outra permeável a macromoléculas (KNIPP et al., 1997; WATSON; ROWLAND; WARHURST, 2001). Assim, as alterações de permeabilidade paracelular no 7º dia sugerem alterações na expressão proteica de populações específicas de proteínas formadoras de junções firmes.

No 7º dia também foi observado aumento dos níveis de transcritos para os transportadores SGLT-1 e PepT-1. A manutenção da expressão adequada dos transportadores de nutrientes é primordial para o metabolismo, pois desempenham um importante papel na absorção de nutrientes (BOUDRY et al., 2010). Além disso, o requerimento nutricional na infância é maior devido à necessidade de energia para o metabolismo basal, crescimento e atividades cotidianas (KENNAUGH; HAY, 1987), assim distúrbios alimentares neste período da vida é crítico para o desenvolvimento. Corroborando com os achados, Sampaio et al. (2016) ao induzir desnutrição por DBR também observaram aumento dos níveis de transcritos dos transportadores SGLT-1 e PepT-1, apesar da ausência de alterações proteicas na expressão dos mesmos após setes dias de desnutrição.

No 14º dia de desnutrição foi identificado embotamento de vilos e criptas do jejuno, redução dos vilos no íleo, redução da permeabilidade paracelular e área absorptiva. Assim como, observou-se dano na permeabilidade intestinal, redução dos níveis de transcritos de claudina-1 e ocludina e aumento nos níveis de SGLT-1, bem como o aumento nos níveis de expressão proteica de ocludina. A desnutrição proteica grave, na clínica, é responsável por causar o embotamento de vilos e em muitos casos atrofia de criptas (DUQUE et al., 1975),

bem como aumento da permeabilidade intestinal (BREWSTER et al., 1997; WELSH et al., 1998).

Os dados morfológicos sugerem alterações nas taxas de proliferação e apoptose, como reportado na literatura para modelo de DBR (UENO et al, 2011), sem gerar alterações na área absorptiva do jejuno. Em contrapartida, o teste de função aponta redução de área absorptiva total, bem como redução da permeabilidade paracelular, com indicação de dano à integridade intestinal. Crianças desnutridas apresentam danos na mucosa que podem persistir por um longo período, devido à resposta de reparo aos danos estarem afetados, tornando a permeabilidade intestinal destas crianças cronicamente afetadas (LIMA et al., 2005; SULLIVAN et al., 1992). Nenhum dado na literatura mostrou alterações desencadeadas por DBR na arquitetura de microvilosidades e permeabilidade intestinal por um período de 14 dias. Contudo, um modelo semelhante em período mais tardio não encontrou alterações na altura de vilos nas diferentes porções intestinais, apesar de dano na permeabilidade paracelular (BROWN et al., 2015). Assim, o aumento da permeabilidade intestinal no 14º dia, com concomitante redução da massa celular, massa muscular e tecido adiposo, indicam uma redução de reservas energéticas necessárias para resposta de reparo.

A atrofia de vilos e criptas pela DBR ocorreu juntamente com aumento da permeabilidade paracelular no 14º dia e redução dos níveis de RNAm de claudina-1, ocludina, sem alterações nos níveis de transcritos de claudina-2 e aumento da expressão proteica de ocludina. Diversas proteínas constituem as junções firmes intestinais e possuem características de distribuição e regulação complexa (LU et al., 2013; TAMURA et al., 2011; SUZUKI, 2013). A superexpressão da ocludina em células epiteliais *in vitro* desencadeia o aumento da resistência elétrica transepitelial e um aumento inexplicável no fluxo de solutos não carregados (BALDA et al., 1996; MCCARTHY et al., 1996). Em contrapartida, claudina-1 desempenha papel crucial na formação de barreira em diversos órgãos (FURUSE et al., 2002). Furuse et al. (2002) mostraram que camundongos nocautes para esta proteína são responsáveis por desencadear morte devido a desidratação severa. Outro estudo demonstrou que a superexpressão da claudina-1 em células epiteliais *in vitro* aumenta a resistência elétrica transepitelial (INAI; KOBAYASHI; SHIBATA, 1999). Diferente da claudina-2 que desempenha função de poros, sendo indispensável para absorção de Na<sup>+</sup> na infância (TAMURA et al., 2011). Assim, o aumento da expressão proteica de ocludina associada à redução da permeabilidade paracelular, podem indicar um aumento da resistência transepitelial.

Na literatura, diferentes modelos de consumo de deficiência nutricional apresentaram diferentes modulações nos níveis de transcritos e expressão de junções firmes. A desnutrição induzida por DBR pós-desmame acarretou na redução nos níveis de RNAm de ZO-1 e aumento nos níveis de claudina-2 em período mais crônico do que o presente estudo (BROWN et al., 2015). Diferente de um estudo de desnutrição em neonatos induzida pela DBR que desencadeou aumento na expressão proteica de claudina-3, mas não na expressão de claudina-1, ocludina e ZO-1 (UENO et al., 2011). Em contraste, a privação severa de proteínas é reportada por diminuir a expressão proteica da claudina-1, porém sem alteração na expressão de ocludina no intestino delgado de ratos neonatais (LI et al., 2004). Logo, estes dados mostram que a transcrição de RNAm e expressão de proteínas formadoras das junções firmes são altamente dinâmicas, complexas e dependentes de diversas condições.

Além disso, no presente estudo, a oferta de uma dieta rica em carboidratos e pobre em proteína ocasionou no 14º dia o aumento dos níveis de RNAm do transportador SGLT-1, ausência de alterações nos níveis de PepT-1, bem como ausência de alteração na expressão proteica dos mesmos. Os níveis de transportadores SGLT-1 são altamente correlacionados com a quantidade de carboidratos alimentares (DYER; BARKER; SHIRAZI-BEECHEY, 1997). Estudos apontam que a absorção de glicose aumenta no prazo de 1 a 3 dias após início da ingestão de uma dieta rica em carboidratos, relacionadas com o aumento da expressão e dos níveis de transcritos de SGLT-1 (DYER; BARKER; SHIRAZI-BEECHEY, 1997; FERRARIS, 2001). Enquanto que, dietas hipoproteicas estimulam o aumento de expressão de transportadores de aminoácidos essenciais, visando o custo benefício (FERRARIS; CAREY, 2000; GILBERT; WONG; WEBB KE, 2008). Contudo, deficiência proteica na DBR no presente estudo não foi capaz de alterar a transcrição e expressão proteica de PepT-1, apesar dos dados apontarem tendência de níveis de RNAm semelhantes aos níveis de SGLT-1.

O aumento nos níveis de RNAm de SGLT-1 e ausência de alteração nos níveis de PepT-1, no presente estudo, ocorreram sem alterações na expressão proteica dos mesmos. Sampaio et al. (2016) identificaram aumento dos níveis de SGLT-1 e PepT-1 após sete dias de consumo de DBR, porém também observaram ausência de alterações na expressão proteica dos mesmos. Além disso, os níveis de RNAm nem sempre estão correlacionados diretamente com a expressão proteica, devido aos mecanismos de regulação da pós-transcrição e tradução (VOGEL; MARCOTTE, 2012). A ausência de alterações na expressão proteica dos transportadores SGLT-1 e PepT-1 no 14º dia sugerem uma tentativa de manutenção da absorção de glicose e proteína, necessárias para manutenção do metabolismo. Visto que, neste

período há redução de reservas energéticas corporais, redução de massa celular, da área absorptiva e indicativo de dano à integridade intestinal.

A desnutrição é conhecida por causar alterações progressivas na permeabilidade intestinal (COUTINHO et al, 2008) e na integridade da mucosa, levando em última instância a vilosidades e criptas hipoplásicas e à ruptura de suas propriedades biomecânicas (COUTINHO et al, 1992). Contudo, no 21º dia de desnutrição observamos uma manutenção da altura do vilos e aumento da razão vilos/cripta no jejuno, com redução da cripta e ausência de alterações na permeabilidade paracelular e área absorptiva, além da redução dos níveis de RNAm de claudina-2, ocludina e SGLT-1, sem alterações na expressão proteica das junções firmes e transportadores.

Diferentes modelos de desnutrição por DBR repercutiram em diferentes respostas à morfologia intestinal. O modelo de desnutrição por DBR em neonatos acarreta a atrofia verdadeira da mucosa intestinal em períodos mais tardios (UENO et al., 2011). No entanto, a desnutrição por DBR em período pós-desmame gerou redução de vilos e aumentou a altura da cripta no 21º dia, decorrente da redução das taxas de proliferação e apoptose no eixo cripta-vilos, bem como redução da massa celular com aumento da borda em escova (QUEIROZ et al., 2014). Todavia, a ingestão de uma dieta multideficiente em camundongos recém-desmamados nem sempre promove alterações na arquitetura intestinal (BROWN et al., 2015). Song et al. (2009) sugeriu que a cinética das mucosas intestinais mudam com a idade, com redução das taxas de apoptose e consequente aumento da massa celular na mucosa, sugerindo que a atrofia induzida pela fome diminui com o envelhecimento. Logo, as modificações desencadeadas pela DBR no 21º dia na morfologia do jejuno sugerem que as taxas de proliferação e apoptose permanecem alteradas, apesar da recuperação da altura do vilos e aumento da área intestinal.

Diferente de dados da literatura, o presente estudo não encontrou alterações na permeabilidade intestinal, com ausência de alterações tanto na área absorptiva como no indicativo de dano à integridade intestinal, apesar de haver uma tendência ao aumento da permeabilidade paracelular. Na clínica, crianças desnutridas apresentam maior permeabilidade intestinal (LIMA et al., 2005, 2007), bem como modelos experimentais crônicos de desnutrição apontam danos a permeabilidade paracelular (BROWN et al., 2015; UENO et al., 2011). Contudo, ausência de alterações na função intestinal no presente estudo pode ser

decorrente do retorno da taxa metabólica, indicada pela ausência de alterações nos fluídos intracelulares.

A ausência de alterações na permeabilidade intestinal foi seguida de reduções nos níveis de transcritos de claudina-2, ocludina, sem alterações na expressão proteica dos mesmos. Ueno et al. (2011) associaram o dano a permeabilidade paracelular no modelo de desnutrição em neonato com o aumento da expressão proteica de claudina-3, responsável pela função de barreira. Diferente do reportado para o consumo de DBR por um período de 21 dias, no qual se observou dano à permeabilidade paracelular associada com redução de transcritos para ZO-1 e aumento de claudina-2 (BROWN et al., 2015). Todavia, a manutenção das junções firmes é um mecanismo complexo que envolve diversas vias de sinalização (SUZUKI, 2013), dependente de uma variedade de proteínas com padrões de expressão diferentes (LU et al., 2013).

Além disso, as alterações morfológicas e funcionais podem promover efeitos benéficos ou prejudiciais no transporte de nutrientes e íons, decorrentes de um mecanismo adaptativo a desnutrição (FERRARIS; CAREY, 2000). A regulação da expressão gênica dos transportadores é complexa e também podem ser alteradas em diversas condições (BOUDRY et al., 2010). Em acréscimo, a manutenção apropriada das JF, principalmente de claudinas-2 e -15, é importante para absorção adequada de nutrientes como glicose, peptídeos e lipídeos (WADA et al., 2013).

No presente estudo, o consumo de DBR resultou na redução dos níveis de RNAm de SGLT-1, sem alteração nos níveis de transcritos de PepT-1 e ausência de alterações proteicas para ambos os transportadores no 21º dia. Na literatura, a restrição proteica na prole de ratas grávidas resulta no aumento da transcrição e da expressão proteica dos transportadores SGLT-1 e PepT-1 no duodeno, mas não no jejuno ou íleo (PINHEIRO et al., 2013). Diferente do observado para remoção luminal de nutrientes em ratos que aumentou os níveis de RNAm de PepT-1 na região distal do intestino delgado (HOWARD et al., 2004). Assim como, um modelo de desnutrição por DBR em período agudo também observou aumento dos níveis de RNAm de PepT-1 e SGLT-1 no íleo, apesar da ausência de alterações proteicas dos transportadores (SAMPAIO et al., 2016). Em contrapartida, um estudo sobre a desnutrição materna mostrou que leitões recém-nascidos e pós-desmame não apresentavam alteração da expressão do RNAm para SGLT1 e PepT-1 (CAO et al., 2014). À vista disto, os dados

destacam o quanto a regulação destes transportadores é complexa e variam de acordo com o tipo de restrição alimentar e segmento intestinal.

Além disso, a redução dos níveis de transcritos de SGLT-1 e ausência de alterações para a expressão proteica de SGLT-1 ocorreram mesmo com o aumento da área absorptiva do jejuno no 21º dia. Dyer et al. (1997) identificaram que pode haver modulação da expressão de SGLT-1 decorrentes do consumo de dietas ricas em carboidratos, independente das diferenças na morfologia intestinal. Em contrapartida, Lescale-Matys et al. (1993) observaram que uma dieta rica em carboidrato induz mudanças principalmente na abundância de proteínas SGLT-1. Também vale ressaltar que, fatores de segurança permitem um equilíbrio em relação ao custo-benefício da síntese de transportadores (WEISS; LEE; DIAMOND, 1998). Logo, a redução dos níveis de RNAm de SGLT-1 no 21º dia podem ser reflexo de um mecanismo de *feedback* para posterior redução do aporte de gastos energéticos não necessários na expressão proteica, visto que a dieta é rica em carboidrato.

Estudos *in vivo* também permitiram identificar que íons, como  $\text{Cl}^-$ , geram uma força eletromotriz para o retorno passivo de  $\text{Na}^+$  ao lúmen através da via paracelular, com consequente secreção de fluídos (FERRARIS; CAREY, 2000). Visto isso, ao avaliarmos os níveis de transcritos de CFTR, um canal iônico de cloreto, observou-se a redução destes no período de 21 dias, mas não em 14 dias. Sampaio et al. (2016) também reportaram ausência de alterações nos níveis de transcritos de CFTR em modelo de desnutrição por DBR mais agudo. Assim, os resultados de transcrição para CFTR podem indicar uma menor expressão proteica, com uma possível redução de excreção de  $\text{Cl}^-$ , assim como retorno de  $\text{Na}^+$  para o lúmen. Todavia, é importante uma análise de função intestinal para melhor compreender o papel desse canal iônico na desnutrição desencadeada por DBR. Uma vez que, estudos reportaram uma mudança do transporte basal de íons no intestino delgado, alterando o estado intestinal de absorção de fluídos para um estado secretório na desnutrição (CAREY; HAYDEN; TUCKER, 1994; DARMON et al, 1996; 1997).

Em suma, a DBR foi capaz de alterar de forma dinâmica a morfologia e função intestinal de modo agudo a crônico, associada ao déficit de desenvolvimento, redução de reservas energéticas e atrofia de fluídos extracelulares. Em estágio inicial, a DRB reduziu a área absorptiva e gerou atrofia da cripta no jejuno, com redução da área absorptiva total, permeação paracelular e aumento dos níveis de RNAm de importantes transportadores relacionados com absorção de peptídeos e glicose. Em tempo intermediário, a falta de

nutrientes essenciais desencadeou maiores danos à função e morfologia intestinal, com atrofia de vilos e cripta no jejuno, atrofia das vilosidades no íleo e dano à integridade da mucosa intestinal. Neste estágio, as alterações morfológicas e funcionais foram acompanhadas de redução da transcrição das proteínas formadoras de junções firmes e redução dos níveis de RNAm do transportador de glicose. No entanto, o consumo por período mais crônico ocasionou um retorno da função intestinal mesmo com atrofia da cripta e aumento da área intestinal do jejuno, bem como redução dos níveis de transcritos de claudina-2, ocludina, SGLT-1 e CFTR. Assim, o presente estudo identificou modificações dinâmicas desencadeadas pela DBR na barreira morfofuncional, associada com alterações na composição e estrutura corporal, esclarecendo as alterações fisiológicas desencadeadas por uma dieta multideficiente, pontuando estágios críticos de alterações na função intestinal.

Contudo, o presente estudo teve como limitação a quantificação indireta da expressão proteica das junções firmes e transportadores transmembranas por meio do método de imunohistoquímica. Além disso, a dosagem de eletrólitos a nível plasmático que permitiriam melhor compreender as alterações de fluídos extracelulares, água corporal total e consumo hídrico desencadeado pela DBR. Bem como, a avaliação da expressão e níveis de transcritos de claudina-15 e GLUT juntamente com a aplicação de teste como o de tolerância oral à glicose e dosagem do perfil de aminoácidos sanguíneos permitiriam identificar modificações na absorção intestinal de nutrientes e assim reforçariam as alterações identificadas para os transportadores. Em acréscimo, testes funcionais como câmaras de Ussing associada com microscopia eletrônica de varredura poderiam melhor explicar as alterações eletrofisiológicas e distribuição das proteínas formadoras de junções firmes a nível paracelular desencadeadas pela DBR na barreira epitelial intestinal.

## 7 CONCLUSÃO

A DBR retarda o ganho de peso, atrasa o desenvolvimento físico dos animais e altera a composição corporal em curto período de tempo. Além disto, esta dieta multideficiente desencadeia uma resposta dinâmica na função intestinal e morfologia do jejuno, associada principalmente com alterações nos níveis de transcritos de junções firmes e transportadores intestinais, no qual o maior dano a barreira morfofuncional ocorre em período intermediário e é ligado ao aumento da expressão da proteína formadora de junção firme. Assim, o presente estudo proporcionou acompanhamento das principais alterações morfofuncionais decorrentes da introdução de uma dieta multideficiente em fase crítica de desenvolvimento físico, possibilitando o entendimento dos efeitos agudos a crônicos decorrentes da desnutrição e sugerindo mecanismos adaptativos em períodos tardios, tanto na função como na morfologia intestinal.

## REFERÊNCIAS

ACF INTERNATIONAL. Taking Action Nutrition for Survival, Growth & Development. **White Paper**, p. 1–52, 2010.

ACOSTA, A. M. et al. The MAL-ED study: A multinational and multidisciplinary approach to understand the relationship between enteric pathogens, malnutrition, gut physiology, physical growth, cognitive development, and immune responses in infants and children up to 2 years of. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, p. 193–206, 2014.

ACUÑA, K.; CRUZ, T. Avaliação do estado nutricional de adultos e idosos e situação nutricional da população brasileira. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 48, n. 3, p. 345–361, 2004.

AGÊNCIA BRASIL. Região Norte tem mais que o dobro de desnutrição do Sul, segundo o IBGE. 2010. Disponível em: < <http://saude.estadao.com.br/noticias/geral,regiao-norte-tem-mais-que-o-dobro-de-desnutricao-do-sul-segundo-o-ibge,601417>> . Acessado em: 28 de mai de 2017. 2010.

AGOSTI, M. et al. Nutritional and metabolic programming during the first thousand days of life. **La Pediatria Medica e Chirurgica**, v. 39, n. 2, p. 57–61, 2017.

ALMEIDA, A. C. D. et al. Quantitative ultrastructural evidence of myelin malformation in optic nerves of rats submitted to a multideficient diet, **Nutritional Neuroscience**, v. 8, n.2, p. 91-99, 2005.

AL-SADI, R. et al. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 300, n. 6, p. G1054–G1064, 2011.

ALVES, A. P et al. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 3, p. 264–271, 2008.

ANDERSON, J, M.C.; ITALLIE, M. V. I. Physiology and Function of the Tight Junction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 2, p. a002584, 2009.

ARAÚJO, T. S. et al. Desnutrição infantil em um dos municípios de maior risco nutricional do Brasil: estudo de base populacional na Amazônia Ocidental Brasileira. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 19, n. 3, p. 554–566, 2016.

ATTIA, S. et al. Mortality in children with complicated severe acute malnutrition is related to intestinal and systemic inflammation : an observational. **Am J Clin Nutr**, v. 104, p. 1441-1449, 2016.

BALDA, M.S. et al Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutante tight junction membrane protein. **J Cell Biol**, v. 134, p. 1031–1049, 1996.

BARBOZA, M. S. et al. Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 12, p. 1499–1504, 1999.

BARKER, D. J. et al. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease is more closely related to neonatal and maternal. **Bmj**, v. 298, p. 564–567, 1989.

BARKER, D.J. et al. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. **Diabetologia**, v. 36, p. 62–67, 1993a.

BARKER, D. J. et al. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. **BMJ**, v. 307, n. 6918, p. 1524–7, 1993b.

BARKER, D. J. Fetal programming of coronary heart disease. **Trends Endocrinol Metab**, v. 13, p. 364–368, 2002.

BARRETO, G. S. C. et al. Impact of malnutrition on cardiac autonomic modulation in children. **Jornal de Pediatria**, v. 92, n. 6, p. 638–644, 2016.

BARROS, K. M. F. T. et al. A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. **Nutritional neuroscience**, v. 9, n. 1–2, p. 99–104, 2006.

BARTZ, S. et al. Severe acute malnutrition in childhood: hormonal and metabolic status at presentation, response to treatment, and predictors of mortality. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 99, p. 2128–2137, 2014.

BAVDEKAR, A., et al. Insulin resistance syndrome in 8-year-old Indian children: small at birth, big at 8 years, or both? **Diabetes. Dec**, v. 48, p. 2422–2429, 1999.

BEHRENS, R.H. et al. Factors affecting the integrity of the intestinal mucosa of Gambian children. **Am J Clin Nutr**, v. 45, p. 1433–1441, 1987.

BEEMAN, N.; WEBB, P. G.; BAUMGARTNER, H. K. Occludin is required for apoptosis when claudin–claudin interactions are disrupted. **Cell Death and Disease**, v. 3, n. 2, p. e273, 2012.

BLACK, R. E. et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. **The Lancet**, v. 382, n. 9890, p. 427–451, 2013.

BOLICK, D. T. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* strain in a novel weaned mouse model: Exacerbation by malnutrition, biofilm as a virulence factor and treatment by nitazoxanide. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART6, p. 896–905, 2013.

BOUDRY, G. et al. Role of Intestinal Transporters in Neonatal Nutrition: Carbohydrates, Proteins, Lipids, Minerals, and Vitamins. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 380–401, 2010.

BREWSTER, D. R. et al. Intestinal permeability in kwashiorkor. **Archives of Disease in Childhood**, v. 76, n. 3, p. 236–241, 1997.

- BRIEND, A.; KHARA, T.; DOLAN, C. Wasting and stunting-similarities and differences: Policy and programmatic implications. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 36, n. 1, p. S15–S23, 2015.
- BREY, E. M. et al. Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. **J Histochem Cytochem**, v. 51, p. 575–84, 2003.
- BROWN, E. M. et al. Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model. **Nature Communications**, v. 6, p. 7806, 2015.
- BROWN, J.L; POLLITT, E. Malnutrition, poverty and intellectual development. **Scientific American**, p. 38-43, 1996.
- BRUNSER, O. M. D.; CASTILHO, C. M. D.; ARAYA, M. M. D. Fine structure of the small intestinal mucosa in infantile marasmic malnutrition. **Gastroenterology**, v. 70, p. 495-507, 1976.
- BURMAN, D. The jejunal mucosa in Kwashiorkor. **Arch. Dis. Chil**, v. 40, p. 526-531, 1965.
- BHUTTA, Z. A. et al. Evidence-based interventions for improvement of maternal and child nutrition: What can be done and at what cost? **The Lancet**, v. 382, n. 9890, p. 452–477, 2013.
- BUTSCH, W. S.; HEIMBURGER, D. C. Malnutrition and Disease Outcomes. Org. In: **Gastroenterology, Nutrition and Gastrointestinal Disease**. Totowa: Humana Press Inc., p 31-57, 2008.
- CAHILL, G. F. Fuel Metabolism in Starvation. **Annual Review of Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 1–22, 2006.
- CAREY, H.V.; HAYDEN, U.L.; TUCKER, K.E. Fasting alters basal and stimulated ion transport in piglet jejunum. **Am. J. Physiol**, v. 267, p. 156–163, 1994.
- CARLE, M. S. **Validation of bioimpedance spectroscopy by assessing**. Tese (Mestrado em Ciências) - The University of Alabama, Birmingham, Alabama, 2010.
- CHEEK, D. B. et al. Malnutrition in infancy: changes in muscle and adipose tissue before and after rehabilitation. **Pediatric research**, v. 4, n. 2, p. 135–44, 1970.
- CAO, M. et al. Effects of maternal over- and undernutrition on intestinal morphology, enzyme activity, and gene expression of nutrient transporters in newborn and weaned pigs. **Nutrition**, v. 30, n. 11–12, p. 1442–1447, 2014.
- CENEVIVA, R. Equilíbrio hidroeletrólítico e hidratação no paciente cirúrgico. **Medicina**, v. 41, n. 3, p. 287–300, 2008.
- CHIBA, H. et al. Transmembrane proteins of tight junctions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1778, n. 3, p. 588–600, 2008.
- CORREIA, L. L. et al. Prevalence and determinants of child undernutrition and stunting in semiarid region of Brazil. **Revista de Saude Publica**, v. 48, n. 1, p. 19–28, 2014.
- CORTÉS-BARBERENA, E. et al. Effects of moderate and severe malnutrition in rats on

splenic T lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry. **Clin Exp Immunol**, v. 152, p. 585-92, 2008.

COUTINHO, E. M.; DE FREITAS, L. P.; ABATH, F. G. The influence of the regional basic diet from northeast Brazil on health and nutritional conditions of mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, n. 1, p. 13–20, 1992.

COUTINHO, B.P. et al. Cryptosporidium infection causes undernutrition and, conversely, weanling undernutrition intensifies infection. **J Parasitol**, v. 94, p. 1225–1232, 2008.

COULTHARD, G. M. Oedema in kwashiorkor is caused by hypoalbuminaemia. **Paediatrics and International Child Health**, v. 35, n. 2, p. 83–89, 2015.

CROSNIER, C.; STAMATAKI, D.; LEWIS, J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 5, p. 349–359, 2006.

CROZIER, S. J. et al. Molecular Mechanisms of Pancreatic Dysfunction Induced by Protein Malnutrition. **Gastroenterology**, v. 137, n. 3, p. 1093–1101, 2009.

DARMON, N. et al. Anaphylactic intestinal response to milk proteins during malnutrition in guinea pigs. **Am. J. Physiol**, v. 270, p. 442–48, 1996.

DARMON, N. et al. 1997. Zinc and intestinal anaphylaxis to cow's milk proteins in malnourished guinea pigs. **Pediatr. Res.**, v. 42, p. 208–213, 1997.

DESAI, M. et al. Organspecific growth in the offspring of protein-restricted mothers. **Br J Nutr**, v. 76, p. 591–603, 1996.

DEBOER, M. D. et al. Early childhood growth failure and the developmental origins of adult disease: do enteric infections and malnutrition increase risk for the metabolic syndrome? **Nutr. Rev**, v. 70, p. 0642–653, 2012.

DU, D. et al. The Tight Junction Protein, Occludin, Regulates the Directional Migration of Epithelial Cells. **Developmental Cell**, v. 18, n. 1, p. 52–63, 2010.

DUQUE, E. et al. Enteropathy in adult protein malnutrition: light microscopic findings. **Am J Clin Nutr**, v.28, p.901–913, 1975.

DYER, J.; BARKER, P. J.; SHIRAZI-BEECHEY, S. P. Nutrient regulation of the intestinal Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter (SGLT1) gene expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 230, p. 624–629, 1997.

EARTHMAN, W. H. et al. Body cell mass change in HIV infection A comparison of bioimpedance methods for detection of A comparison of bioimpedance methods for detection of body cell mass change in HIV infection. **J Appl Physiol Journal of Applied Physiology by guest on**, v. 88, p. 944–956, 2000.

EDELBLUM, K. L. et al. Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium. **Inflammatory bowel diseases**, v. 12, n. 5, p. 413–424, 2006.

- FALL, CH. Developmental origins of cardiovascular disease, type 2 diabetes and obesity in humans. In: Wintour E, Owens J, eds. **Early life origins of health and disease**. New York: Springer Science, 2006.
- FERNÁNDEZ-RIEJOS, P et al. Role of leptin in the activation of immune cells. **Mediators Inflamm**, v. 2010, p. 1-8, 2010.
- FERRARIS, R. P. Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. **The Biochemical journal**, v. 360, n. 2, p. 265–276, 2001.
- FERRARIS, R. P.; CAREY, H. V. and M Alnutrition. **Comparative and General Pharmacology**, v. 20, p. 195–219, 2000.
- FLEMING, S. C. et al. Rapid and simultaneous determination of lactulose and mannitol in urine, by HPLC with pulsed amperometric detection, for use in studies of intestinal permeability. **Clinical Chemistry**, p. 36, p. 797-799, 1990.
- FOGARTY, J.; LOUGHREY, C. Hyponatraemia in hospitalised adults: A guide for the junior doctor. **Ulster Medical Journal**, v. 86, n. 2, p. 84–89, 2017.
- FURUSE, M. et al. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. **Journal of Cell Biology**, v. 123, n. 6 II, p. 1777–1788, 1993.
- FURUSE, M. et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: A lesson from claudin-1-deficient mice. **Journal of Cell Biology**, v. 156, n. 6, p. 1099–1111, 2002.
- FRIEDMAN, J. F. et al. Progression of stunting and its predictors among school-aged children in western Kenya. **Eur J Clin Nutr**, v. 59, p. 914–22, 2005.
- FRENHANI, P. B.; BURINI, R. C. Mecanismos de ação e controle da digestão de proteínas e peptídeos em humanos. **Arq Gastroenterol.**, v. 36, n. 3, p.139-147, jul./set. 1999.
- GALLER, J. R. et al. Infant Malnutrition Is Associated with Persisting Attention Deficits in Middle Adulthood. **Journal of Nutrition**, v. 142, n. 4, p. 788–794, 2012.
- GALLER, J. R. et al. Malnutrition in the first year of life and personality at age 40. **Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines**, v. 54, n. 8, p. 911–919, 2013.
- GARENNE, M. et al. Incidence and duration of severe wasting in two African populations. **Public health nutrition**, v. 12, n. 11, p. 1974–1982, 2009.
- GARTNER, A. et al. Change in body water distribution index in infants who become stunted between 4 and 18 months of age. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, n. 9, p. 1097–1106, 2003.
- GERUDE, M.F. et al. **Terapia Nutricional**. São Paulo: Atheneu, 2002.
- GIASSI, L. J. et al. Expanded CD34+ human umbilical cord blood cells generate multiple lymphohematopoietic lineages in NOD-scid IL2r gamma (null) mice. **Exp Biol Med**, v. 233, p. 997-1012, 2008.

GILBERT, E.R.; WONG, E.A.; WEBB, K.E. Peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health. **J Anim Sci**, v. 86, p. 2135–55, 2008.

GOUVEIA, C. L. E. **Nutrição, Saúde & Comunidade**. Rio de Janeiro: 2 ed., Revinter, p. 241, 1999.

GRANTHAM-MCGREGOR, S. et al. Child development in developing countries 1 Developmental potential in the first 5 years for children in. **Lancet**, v. 369, p. 60–70, 2007.

GUERRANT, R. L. et al. Diarrhea as a cause and an effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 47, p. 28–35, 1992.

GUERRANT, R. L. et al. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. **Nutr Rev**, v. 66, p. 487–505, 2008.

GUERRANT, R. L. et al. The impoverished gut—a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 4, p. 220–229, 2013.

GUERRANT, R. L. et al. Biomarkers of environmental enteropathy, inflammation, stunting, and impaired growth in children in northeast Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–20, 2016.

GUNZEL, D.; YU, A. S. L. Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. **Physiol Rev**, v. 93, p. 525–569, 2013.

HAGEMANN, R.F.; STRAGAND, J. J. Fasting and refeeding: cell kinetic response of the jejunum, ileum and colon. **Cell Tissue Kinet**, v. 10, p. 3-14, 1977.

HEER, M. et al. High dietary sodium chloride consumption may not induce body fluid retention in humans. **American journal of physiology Renal physiology**, v. 278, n. 4, p. F585–F595, 2000.

HERMISTON, M. L.; GORDON, J. I. In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. **J. Cell Biol**, v. 129, p. 489–506, 1995.

HODDINOTT, J. et al. Effect of a nutrition intervention during early childhood on economic productivity in Guatemalan adults. **Lancet**, v. 371, p. 411-416, 2008.

HOEST, C. et al. Evaluating associations between vaccine response and malnutrition, gut function, and enteric infections in the MAL-ED cohort study: Methods and challenges. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. Suppl 4, p. S273–S279, 2014.

HOSSAIN, M. I. et al. Undernutrition, vitamin A and iron deficiency are associated with impaired intestinal mucosal permeability in young Bangladeshi children assessed by lactulose/mannitol test. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1–10, 2016.

HOWARD, A. et al. Increased expression of specific intestinal amino acid and peptide transporter mRNA in rats fed by TPN is reversed by GLP-2. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 11, p. 2957–2964, 2004.

INAI, T.; KOBAYASHI, J.; SHIBATA, Y. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. **Eur J Cell Biol**, v. 78, p. 849–855, 1999.

ISANAKA, S. et al. Estimates of the duration of untreated acute malnutrition in children from niger. **American Journal of Epidemiology**, v. 173, n. 8, p. 932–940, 2011.

ITOH, M. et al. The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 121, n. 3, p. 491–502, 1993.

JACOBI, S. K. et al. Acute effects of rotavirus and malnutrition on intestinal barrier function in neonatal piglets. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 31, p. 5094–5102, 2013.

JAFAR, T. H. et al. Rise in childhood obesity with persistently high rates of undernutrition among urban school-aged Indo-Asian children. **Arch Dis Child May**, v. 93, p. 373–378, 2008.

KARCZEWSKI, J et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 298, p. 851–859, 2010.

KELLETT, G. L. The facilitated component of intestinal glucose absorption. **Journal of Physiology**, v. 531, n. 3, p. 585–595, 2001.

KIM, H.-R. et al. Comparative gene expression profiles of intestinal transporters in mice, rats and humans. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 56, n. 3, p. 224–236, 2007.

KIMMICH, G. A.; RANGLES, J. Sodium-sugar coupling stoichiometry in chick intestinal cells. **Am. J. Physiol**, v. 247, p. 74– 82, 1984.

KENNAUGH, J. M.; HAY, W. W. Jr. Nutrition of the fetus and newborn. **West J Med**, v. 147, p. 435–48, 1987.

KNIPP, G.T. et al. Paracellular diffusion in Caco-2 cell monolayers: effect of perturbation on the transport of hydrophilic compounds that vary in charge and size. **J Pharm Sci**, v. 86, p. 1105–1110, 1997.

KOEPPEN, M. B.; STANTON, B. A. **Berne & Levy Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 864p.

KRUGLIAK, P. et al. Mechanisms and sites of mannitol permeability of small and large intestine in the rat. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 39, n. 4, p. 796–801, 1994.

LEE, G. O. et al. Lactulose. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 59, n. 4, p. 544–550, 2014.

LESCALE-MATYS, L. et al. Regulation of the ovine intestinal Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter (SGLT1) is dissociated from mRNA abundance. **Biochem. J.**, v.291, p. 435–440, 1993.

LI, N. et al. Effects of protein deprivation on growth and small intestine morphology are not improved by glutamine or glutamate in gastrostomy-fed rat pups. **J Pediatr Gastroenterol**

**Nutr**, v. 39, p. 28–33, 2004.

LIMA, A.A et al. Intestinal barrier function and weight gain in malnourished children taking glutamine supplemented enteral formula. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 40, p. 28 – 35, 2005.

LIMA, N. L. et al. Wasting and intestinal barrier function in children taking alanyl-glutamine-supplemented enteral formula. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 44, n. 3, p. 365–374, 2007.

LIMA, A. et al. Effects of glutamine alone or in combination with zinc and vitamin A on growth, intestinal barrier function, stress and satiety-related hormones in Brazilian shantytown children. **Clinics**, v. 69, n. 4, p. 225–233, 2014a.

LIMA, A. A. M. et al. Geography, population, demography, socioeconomic, anthropometry, and environmental status in the MAL-ED cohort and case-control study sites in Fortaleza, Ceara, Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, p. S287–S294, 2014b.

LIMA, A. A. et al. Determinant Variables, Enteric Pathogen Burden, Gut Function, and Immune-Related Inflammatory Biomarkers Associated with Childhood Malnutrition. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 1, p. 1, 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**; v. 25, p. 402–408, 2001.

LU, Z. et al. Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases. **Tissue barriers**, v. 1, n. 3, p. e24978, 2013.

MADARA, J. L. Functional morphology of epithelium of the small intestine. **Handbook of Physiology**, v. 4, p. 83–120, 1991.

MCCARTHY, K. M. et al. Occludin is a functional component of the tight junction. **Journal of cell science**, v. 109, n. 9, p. 2287–2298, 1996.

MCDADE, T. W. et al. Prenatal undernutrition, postnatal environments, and antibody response to vaccination in adolescence. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 543–548, 2001.

MCDONALD, C. M. et al. The effect of multiple anthropometric deficits on child mortality : meta-analysis of individual data in 10 prospective studies from. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 97, n. 2, p. 896–901, 2013.

MENZIES, I.S.; LAKER, M.F.; POUNDER, R. Abnormal permeability to sugars in villous atrophy. **Lancet**, v. 8152, p. 1107–1109, 1979.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de atendimento da criança com desnutrição grave em nível hospitalar*. Brasília: Ministério da Saúde, Normas e Manuais Técnicos, 2005, 144p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saúde e Estado Nutricional de Crianças Menores de Cinco Anos. 2007. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/pnds/saude\\_nutricional.php](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/pnds/saude_nutricional.php)>. Acessado em: 20 de Mai de 2017. 2007.

- MOLINARI, L.M. et al. NADH-diaphorase positive myenteric neurons of the aglandular region of the stomach of rats (*Rattus norvegicus*) subjected to desnutrition. **Rev. Chil. Anato.**, v. 20, p. 19-23, 2002.
- MOORE, S. E. et al. Birth weight predicts response to vaccination in adults born in an urban slum in Lahore, Pakistan. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 2, p. 453–459, 2001.
- MOORE, S. R. et al. Murine weanling undernutrition reveals sexual dimorphisms in weight faltering, small intestinal transcriptome, and dysbiosis. **Gastroenterology**, v. 146, n. 5, p. S-13, 2014.
- MORNON, J.P. et al. Full-open and closed CFTR channels, with lateral tunnels from the cytoplasm and an alternative position of the F508 region, as revealed by molecular dynamics. **Cell Mol Life Sci**, v.72, p. 1377–1403, 2015.
- MUST, A.; ANDERSON, S. E. Body mass index in children and adolescents: considerations for population-based applications. **International Journal of Obesity**, v. 30, n. 4, p. 590–594, 2006.
- NEYESTANI, T. R.; WOODWARD, B. Blood concentrations of Th2-type immunoglobulins are selectively increased in weanling mice subjected to acute malnutrition. **Exp Biol Med**, v. 230, p.128-34, 2005.
- OLOFIN, I. et al. Associations of suboptimal growth with all-cause and cause-specific mortality in children under five years: a pooled analysis of ten prospective studies. **PloS One**, v. 8, p. e64636, 2013.
- ONU. ONU: 16 mil crianças morrem diariamente, revela novo relatório sobre mortalidade infantil. 2015. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/onu-16-mil-criancas-morrem-diariamente-revela-novo-relatorio-sobre-mortalidade-infantil1/>>. Acesso em: 17 de mai de 2017.
- PAIXÃO, A. D. O. et al. Regional Brazilian diet-induced pre-natal malnutrition in rats is correlated with the proliferation of cultured vascular smooth muscle cells. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 302–309, 2005.
- PETERSON, C. T. et al. Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 179, n. 3, p. 363–377, 2015.
- PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 141–153, 2014.
- PILEGI, H. M. C.; ARAÚJO, E. J. A.; SANT’ANA, D. M. G. Efeito da desnutrição protéico-energético sobre o comprimento e o peso do duodeno de ratos. **ANAIS do 3º Encontro de Iniciação Científica**, 3º Fórum de Pesquisa, p. 75-76, 2004.
- PINHEIRO, D. F. et al. Maternal protein restriction affects gene expression and enzyme activity of intestinal disaccharidases in adult rat offspring. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 3, p. 281–289, 2013.
- PIRES, G. L. A. et al. Estudo morfométricos e estereológico digital da mucosa do intestino delgado de crianças eutróficas e desnutridas com diarreia persistente. **Jornal de Pediatria**, v.

79, p. 329-336, 2003.

POMEROY, E. et al. Trade-offs in relative limb length among Peruvian children: extending the thrifty phenotype hypothesis to limb proportions. **PloS One**, v. 7, p. 51795, 2012.

PITCHER, J. B.; HENDERSON-SMART, D. J.; ROBINSON, J. S. Prenatal Programming of Human Motor Function. In: **Early Life Origins of Health and Disease**. Australia: Springer, p. 41–57, 2006.

PRATA, M. M. G. et al. Comparisons between myeloperoxidase, lactoferrin, calprotectin and lipocalin-2, as fecal biomarkers of intestinal inflammation in malnourished children. **J Transl Sci**, v. 2, p. 134–139, 2016.

PRENTICE, A. M. et al. Critical windows for nutritional interventions against stunting. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 97, n. 5, p. 911–918, 2013.

PSAKI, S. et al. Household food access and child malnutrition: results from the eight-country MAL-ED study. **Population Health Metrics**, v. 10, n. 1, p. 24, 2012.

QUARENTEI, G. **Contribuição ao estudo da recuperação nutricional na má-nutrição protéico-energética primária da criança. Análise de alguns dados antropométricos, bioquímicos, funcionais e histológico**. 1983. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983.

QUEIROZ, C. A. et al. Zinc treatment ameliorates diarrhea and intestinal inflammation in undernourished rats. **BMC Gastroenterology**, v. 14, n. 1, p. 136, 2014.

RAMACHANDRAN, A.; MADESH, M.; BALASUBRAMANIAN, K.A. Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 15, p. 109-120, 2000.

RADTKE, F; CLEVERS. Self-Renewal and Cancer of the Gut: Two Sides of a Coin. **Science**, v. 307, n. 5717, p. 1904–1909, 2005.

RAHNER, C.; MITIC, L. L.; ANDERSON, J. M. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. **Gastroenterology**, v. 120, n. 2, p. 411–422, 2001.

REEDS, P.J.; FJELD, C.R.; JAHOR, F. Do the differences between the amino acid compositions of acute-phase and muscle proteins have a bearing on nitrogen loss in traumatic states? **J Nutr**, v. 124, p. 906–910, 1994.

ROEDIGER, W. E. W. Metabolic basis of starvation diarrhea: implications for treatment. **Lancet**, v. 1, p. 1082-1084, 1986.

ROSEBOOM, T. J. et al. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. **Mol. Cell Endocrinol**, v. 185, p. 93–98, 2001.

ROWLAND, M. G. M; COLE, T. J; WHITEHEAD, R. G. A quantitative study into the role of infection in determining nutritional status in Gambian village children. **Br J Nutr**, v. 37, p. 441–450, 1977.

- ROWLAND, M. G. M.; ROWLAND, S. G. J. G.; COLE, T. J. Impact of infection on the growth of children from 0 to 2 years in an urban West African community. **Am J Clin Nutr**, v. 47, p. 134–138, 1988.
- RUBIO-ALIAGA, I.; DANIEL, H. Peptide transporters and their roles in physiological processes and drug disposition. **Xenobiotica**, v. 38, p. 1022–104, 2008.
- SAMPAIO, I. C. et al. Impact of acute undernutrition on growth, ileal morphology and nutrient transport in a murine model. **Braz J Med Biol Res**, v. 49, n. 10, p. 1–10, 2016.
- SARNI, R. O. S. et al. Anthropometric evaluation, risk factors for malnutrition, and nutritional therapy for children in teaching hospitals in Brazil. **Jornal de Pediatria**, v. 85, n. 3, p. 223–228, 2009.
- SAWAYA, A. L. et al. Association between chronic undernutrition and hypertension. **Matern Child Nutr**, v. 1, n. 3, p. 155–163, 2005.
- SAVINO, W. The thymus gland is a target in malnutrition. **Eur J Clin Nutr**, v. 2, p. 46–49, 2002.
- SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. E. Malnutrition and infection: Complex mechanisms and global impacts. **PLOS Med**, v. 4, n. 5, p. 0806–0812, 2007.
- SCHNEEBERGER, E. E.; LYNCH, R. D. The tight junction: A multifunctional complex. **Am J Physiol-Cell Physiol**, v. 286, p. 1213–1228, 2004.
- SCHEEPERS, A.; JOOST, H. G.; SCHURMANN, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. **J Parenter Enteral Nutr**, v. 28, p. 364–371, 2004.
- SCHORLING, J. B. et al. Malnutrition is associated with increased diarrhoea incidence and duration among children in an urban Brazilian slum. **Int J Epidemiol**, v. 19, n. 3, p. 728–735, 1990.
- SCHULZKE, J. D. et al. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. **Biochim Biophys Acta**, v. 1669, n. 1, p. 34–42, 2005.
- SESSO, R. et al. Malnutrition is associated with increased blood pressure in childhood. **Nephron - Clinical Practice**, v. 97, n. 2, p. 61–67, 2004.
- SILVA-GUSMAN, A. M. Recuperação da desnutrição em ratos mediante rações adicionadas ou não de suplemento alimentar e de vitaminas e minerais durante o período de crescimento. **Rev Nutr**, v. 17, n. 1, p. 59–69, 2004.
- SHIZGAL, H. M. Nutritional assessment with body composition measurements by multiple isotope dilution. **Infusiontherapie 17, Suppl**, v. 3, p. 9–17, 1990.
- SOETERS, P. et al. Defining malnutrition: A plea to rethink. **Clinical Nutrition**, v. 36, p. 896–901, 2017.
- SONG, J. et al. Starvation-Induced Proximal Gut Mucosal Atrophy Diminished With Aging. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 33, n. 4, p. 411–416, 2009.

SOUZA, E. P. et al. Efeitos da desnutrição no trato gastrointestinal. In: **Sistema digestório: integração básico-clínica**. São Paulo: Blucher, p. 719-730, 2016.

SOUSA, P.; OLINDA, R. A. DE; PEDRAZA, D. F. Prevalence of stunting and overweight /obesity among Brazilian children according to different epidemiological scenarios : systematic review and meta-analysis. **São Paulo Medical Journal**, v. 134, n. 3, p. 251–262, 2016.

SRIVASTAVA, D. et al. Comparison of cardiac autonomic activity between malnourished and healthy children. **Indian J Physiol Pharmacol**, v. 56, n. 3, p. 222–228, 2012.

STANFIELD, J. P.; HUTT, M. S.; TUNNICLIFFE, R. Intestinal biopsy in Kwashiorkor. **The Lancet**, v. 2, p. 519-523, 1965.

SULLIVAN, P. B. et al. Chronic diarrhea and malnutrition: histology of the small intestinal lesion. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 12, p. 195-203, 1991.

SULLIVAN, P. B. et al. Persistent diarrhoea and malnutrition: the impact of treatment on small bowel structure and permeability. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.14, p.208–215, 1992.

SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 4, p. 631–659, 2013.

TAMURA, A. et al. Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na<sup>+</sup> deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. **Gastroenterology**, v. 140, n. 3, p. 913–923, 2011.

TANNER, S et al. The consequences of linear growth stunting: influence on body composition among youth in the Bolivian Amazon. **Am J Phys Anthropol**, v. 153, p. 92–102, 2014.

TEIXEIRA, O. A. Efeito de dieta simples e complexa sobre a morfo-fisiologia gastrointestinal de leitões até 35 dias de idade. **Rev Bras Zootec**, v. 32, p. 926-934, 2003.

TEODÓSIO, N. R. et al. A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 40, n. 4, p. 533–547, 1990.

TOBI, E. W. et al. DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. **Hum. Mol Genet.**, v. 18, p. 4046–4053, 2009.

TSUKITA, S. et al. Roles of ZO-1 and ZO-2 in establishment of the belt-like adherens and tight junctions with paracellular permselective barrier function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1165, p. 44–52, 2009.

TSUKITA, S.; FURUSE, M.; ITOH, M. Multifunctional strands in tight junctions. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 2, n. 4, p. 285–293, 2001.

TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 11, p. 799–809, 2009.

UENO, P. M. et al. Alanyl-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis in vitro

and in a murine model of weanling undernutrition. **AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 301, n. 4, p. G612–G622, 2011.

ULLUWISHEWA, D. et al. Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components. **Journal of Nutrition**, v. 141, n. 5, p. 769–776, 2011.

UMEDA, K. et al. Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. **J Biol Chem**, v. 279, p. 44785–44794, 2004.

UNICEF; WHO; WORLD BANK. Levels and trends in child malnutrition. **Joint Child Malnutrition Estimates**, p. 1–8, 2016.

UTEPPERGENOV, D. I.; FANNING, A.S.; ANDERSON, J. M. Dimerization of the scaffolding protein ZO-1 through the second PDZ domain. **J Biol Chem**, v.281, p. 24671–7, 2006.

VAN DEN BROECK, J.; EECKELS, R.; HOKKEN-KOELEGA, A. Fatness and muscularity as risk indicators of child mortality in rural Congo. **Int J Epidemiol**, v. 27, p. 840–844, 1998.

VEENING, M. A.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A. Glucose Tolerance, Insulin Sensitivity, and Insulin Secretion in Children Born Small for Gestational Age. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 10, p. 4657–4661, 2002.

VELA, D. Características histológicas y funcionales de la mucosa gástrica em desnutridos. **Med. Clin. North Amer**, v. 58, p. 1487, 1974.

VICTORA, C. G. et al. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. **The Lancet**, v. 371, n. 9609, p. 340–357, 2008.

VICTORA, C. G. et al. Maternal and child health in Brazil: Progress and challenges. **The Lancet**, v. 377, n. 9780, p. 1863–1876, 2011.

VIDUEIROS, S.M. et al. Nutrition disorder and immunologic parameters: study of the intestinal villi in growing rats. **Nutrition**, v. 24, p. 575-81, 2008.

WADA, M. et al. Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na + flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition. **Gastroenterology**, v. 144, n. 2, p. 369–380, 2013.

WATSON, C.J.; ROWLAND, M.; WARHURST, G. Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 281, p. C388 –C397, 2001.

WATERLOW, J.C. **Protein Energy malnutrition**. London: 2<sup>a</sup> ed, Hodder&Stouton, 1992.

WEISS, S. L.; LEE, E. A.; DIAMOND, J. Evolutionary matches of enzyme and transporter capacities to dietary substrate loads in the intestinal brush border. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, 2117–2121, 1998.

WELLS, J. C. K.; CORTINA-BORJA, M. Different associations of subscapular and triceps skinfold thicknesses with pathogen load: An ecogeographical analysis. **American Journal of Human Biology**, v. 25, n. 5, p. 594–605, 2013.

WELSH, F. K. et al. Gut barrier function in malnourished patients. **Gut**, v. 42, n. 3, p. 396–401, 1998.

WHO. Child Growth Standards. **Acta Paediatr**, v. 95, p. 1-302, 2006.

WHO. Global Database on Child Growth and Malnutrition. **Based on Child Growth Standards**, p. 1–5, 2012.

WHO. Child growth indicators and their interpretation. Disponível em:  
<<http://www.who.int/nutgrowthdb/about/introduction/en/index2.html>>. Acesso em 20 de mai de 2017.

WORLD BANK. **From Agriculture to Nutrition**. Washington: World Bank, p. 1-83, 2007.