



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

MARIA JOSIANE DA SILVA SANTOS

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E INFLAMATÓRIAS
HEPÁTICAS APÓS DIETA REGIONAL BÁSICA EM CAMUNDONGOS
C57BL6J**

FORTALEZA
2019

MARIA JOSIANE DA SILVA SANTOS

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E INFLAMATÓRIAS
HEPÁTICAS APÓS DIETA REGIONAL BÁSICA EM CAMUNDONGOS
C57BL6J**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Linha de Pesquisa: Patogêneses das doenças imunoinflamatórias.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá

FORTALEZA
2019

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)

S581e Silva Santos, Maria Josiane da.
ESTUDO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E INFLAMATÓRIAS HEPÁTICAS
APÓS DIETA REGIONAL BÁSICA EM CAMUNDONGOS C57BL6J / Maria Josiane da Silva
Santos. – 2019.
79 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

1. Fígado. 2. Desnutrição. 3. Inflamação. 4. Células de Kupffer. I. Título.

CDD 610

MARIA JOSIANE DA SILVA SANTOS

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E INFLAMATÓRIAS
HEPÁTICAS APÓS DIETA REGIONAL BÁSICA EM CAMUNDONGOS
C57BL6J**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Ciências da saúde

Linha de Pesquisa: Patogêneses das doenças imunoinflamatórias.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. José Telmo Valença Júnior
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes
Universidade Estadual do Ceará – UECE

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por ser a força que me ampara e fortalece. Por me mostrar caminhos onde imaginei não existir e por me manter forte diante das inúmeras dificuldades que ultrapassei.

À minha mãe por seu amor, cuidado e zelo. És a maior riqueza que tenho na vida. Meu amor maior.

Ao meu pai, irmão e irmãs, sou grata por tê-los em minha vida.

Ao meu orientador, Reinaldo Barreto Oriá, pela oportunidade dada ao me aceitar como aluna e me inserir no mundo da pesquisa. Sou grata.

À professora Izabel Florindo, pela disponibilidade e por abrir as portas de seu laboratório, sempre solícita na colaboração ao ceder-nos os animais e na realização das análises de RT-qPCR.

Ao meu colega e amigo Ítalo Figueiredo, por seu apoio e carinho, por ser elemento importante na concepção desse estudo. Serei eternamente grata.

À minha colega e amiga Cristhyane Aquino, pela disponibilidade, amizade e força em me ajudar na realização dos procedimentos deste trabalho.

À Josiane, do laboratório de histologia, pela grande ajuda na realização da imunohistoquímica, pela amizade e ajuda que me prestou.

Ao professor Said Gonçalves, pelo auxílio e disponibilidade em nos acolher em seu laboratório para o preparo das rações utilizadas nesse estudo.

À professora Flávia Santos pela ajuda e análises das transaminases e pelas importantes considerações neste trabalho;

Ao professor Telmo Valença, pela realização das análises histopatológicas.

Aos meus colegas e amigos do LABICONTE, por colaborarem com esta minha caminhada, muito além desse trabalho, pelos momentos de amizade e cooperação: Orleânicio, Luís Antônio, Celina Viana, Kildere, Juliana Zani, Juliana, Camila Almeida, Tiê, Carlos Câmara, Davi Gonçalves.

Ao Bruno Bezerra, pela valiosa ajuda na realização do RT-qPCR, pela disponibilidade e empenho em me ajudar.

A todos que conheci no Laboratório de Bioquímica da UECE, obrigada pela acolhida.

À Julyana Maia, Ticiane e Igor pela ajuda que prestaram e pelas análises do qPCR.

Aos alunos de iniciação científica do Labiconte pela ajuda e amizade Amanda Aragão, Priscila Briseno, Anita Mayara, Luciana Vasconcelos, Vicente Souza, Daniel Moreira, Carolina Benício, Jardlon e Amanda Ribeiro. Alguns não estão mais conosco, mais se fazem presentes na juda que prestaram.

À equipe de técnicos e amigos: Rosângela Teixeira, Ricardo Teixeira, Michele Vieira, Gleyde Ane. Grata.

Às secretárias da Pós-graduação em Ciências Médicas, amigas e profissionais competentes: Ivone Mary e Rita de Cássia.

Aos amigos do Instituto de Biomedicina: José Amadeus, Luciana França, Terezinha França, Charliene Melo, Mayara e Kátia, sou grata por tê-los conhecido e por contar com a amizade e carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Às minhas amigas, dentre tantas, especiais: Antoniza Albuquerque, Karla Almeida, Dinara Rute e Larissa Holanda, presentes de Deus.

Aos amigos que estiveram próximo e aos que estiveram distantes fisicamente, mas que sempre se fizeram presentes através do apoio.

“Sou o dono e senhor do meu destino, sou o comandante de minh’alma.”

Trecho do poema *Invictus*, descrito por Nelson Mandela como a inspiração que o levou a lutar e mudar sua história e a história de todo um povo.

RESUMO

A desnutrição ainda é considerada endêmica em muitos países em desenvolvimento, especialmente na África subsaariana e em alguns países da Ásia. No Brasil, a prevalência da desnutrição tem diminuído, contudo, o complexo desnutrição-infecção entérica pode causar efeitos de longo-prazo, incluindo déficits de crescimento e cognitivos, especialmente em crianças que vivem em áreas mais carentes, sem saneamento básico. A dieta básica regional (DBR), produzida para mimetizar as características da dieta do Nordeste Brasileiro (rica em carboidratos e pobre em proteínas), tem sido utilizada em vários modelos experimentais de desnutrição, contudo poucos estudos têm explorado o efeito do tratamento crônico da DBR no fígado, um órgão central no metabolismo do colesterol e da resposta imunoinflamatória. Este trabalho teve como objetivo investigar as alterações histopatológicas e inflamatórias, além do metabolismo reverso do colesterol no fígado de camundongos C57BL6/J alimentados com DBR (grupo desnutrido) por 40 dias, após o desmame, comparado com o grupo nutrido controle, que recebeu uma dieta padrão. Os animais foram pesados diariamente e após 40 dias foi coletado o sangue para a determinação de ALT (alanino amino transferase), um marcador da função hepática, e o fígado para análise histopatológica (escore histopatológico) e para marcadores de inflamação (TNF- α e IL-10 por q-PCR), além da imunohistoquímica para proteína adaptadora do cálcio ionizado-1 (IBA-1), um marcador de célula de Kupffer, e IL-1 β , além do metabolismo reverso do colesterol (apoE, apoA-1 e LCAT). A DBR induziu uma redução do ganho de peso corporal quando comparado ao grupo nutrido ($p < 0,05$). Não foi encontrada diferença estatística nos níveis séricos de ALT entre os grupos experimentais. Nos cortes histológicos, identificamos uma maior marcação e aumento significativo no número de células-IBA-1 positivas no grupo desnutrido quando comparado ao grupo nutrido. Quanto à análise de expressão de citocinas houve um aumento na expressão de TNF- α ($p < 0,0001$) e IL-10 ($p = 0,001$) no grupo desnutrido com DBR, quando comparado ao grupo nutrido. No que se refere às análises da expressão do RNAm de APOE, APOA-1 e LCAT, observou-se aumento significativo ($p = 0,04$) na expressão da apoA no grupo desnutrido, mas não de APOE e LCAT, quando comparado ao grupo nutrido. Conclui-se com este estudo que a desnutrição crônica induzida pela DBR leva a um quadro inflamatório no fígado evidenciado por uma maior marcação de IL-1 β e maior número de células do fígado marcadas com IBA-1, bem como aumento dos transcritos para TNF- α e IL-10. A DBR alterou os níveis de RNAm para ApoA-I, que pode indicar um distúrbio do transporte reverso do colesterol.

PALAVRAS-CHAVE: Fígado. Desnutrição. Inflamação. Células de Kupffer.

ABSTRACT

Malnutrition is still considered endemic in many developing countries, especially in sub-Saharan Africa and some Asian countries. In Brazil, the prevalence of malnutrition has declined; however, the malnutrition-enteric infection complex may cause long-term effects, including growth and cognitive deficits, especially in children living in poor areas without sanitation. The regional basic diet (RBD), produced to mimic the Brazilian Northeastern dietary characteristics (enriched in carbohydrate and with low protein), has been used in several experimental models of malnutrition, but few studies have explored the effect of the chronic RBD treatment on the liver, a central organ involved in the cholesterol metabolism and the immunoinflammatory responses. This study aimed to investigate liver histopathological and inflammatory changes and the reverse cholesterol metabolism of C57BL6/J mice treated with the RBD (undernourished group) for 40 days post-weaning, compared to the nourished control group, receiving a standard chow diet. Animals were weighed daily. After 40 days, blood was drawn to determine the alanine aminotransferase (ALT) serum levels, a marker of liver function, and to assess liver histopathology (histological score) and inflammation (TNF- α and IL-10 by q-PCR). In addition, we analyzed the ionized adapter calcium protein-1 (IBA-1) immunohistochemistry, a marker for Kupffer cells, and IL-1 β . Furthermore, we assessed the reverse cholesterol metabolism (apoE, apoA-1 and LCAT). The RBD induced a decrease in body weight gain compared with the nourished group ($p < 0.05$). There was no statistical difference in serum ALT in the experimental groups. In histological sections, we identified greater IBA-1 immunolabeling and a significant increase in the number of positive-IBA-1 cells in the undernourished group when compared to the control group. Regarding liver cytokine analyses, greater TNF- α ($p < 0.0001$) and IL-10 ($p = 0.001$) mRNA expression was found in RBD-challenged mice. Regarding the reverse cholesterol transport, we found significantly increase in apoA mRNA expression in the undernourished group ($p = 0.04$), but not APOE and LCAT, compared with the control. Altogether our findings suggest that chronic RBD-induced malnutrition leads to an inflammatory condition of the liver, indicated by a stronger IL-1 β immunolabeling and increased number of IBA-1 labeled liver cells, as well as, increased expression of TNF- α and IL-10 transcripts and altered ApoA-I RNAm levels, which may indicate disrupted cholesterol reverse transport.

Key words: Liver. Hyperlipidemia. Malnutrition. Inflammation. Kupffer cells.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação do lóbulo hepático e estruturas do espaço-porta, com drenagem da bile e sangue.....	18
FIGURA 2	Representação esquemática das estruturas lobulares do fígado.....	19
FIGURA 3	Participação das células de Kupffer em processos imunoinflamatórios do fígado.....	20
FIGURA 4	Transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado para ser metabolizado	22
FIGURA 5	Estrutura das lipoproteínas.....	23
FIGURA 6	Representação das formas clínicas da DEP	29
FIGURA 7	Equipamentos utilizados nas análises de qRT-PCR.....	42
FIGURA 8	Realização da imunohistoquímica	45
FIGURA 9	Gráfico de ganho de peso corporal em camundongos C57BL6/J.....	49
FIGURA 10	Escores histopatológicos do fígado de camundongos C57BL6J.....	50
FIGURA 11	Análise sérica de alanina amino-transferase nos grupos experimentais	51
FIGURA 12	Imunomarcção para proteína adaptadora de cálcio ionizado-1 (IBA-1)	52
FIGURA 13	Contagem de células de Kupffer positivas para proteína adaptadora de cálcio ionizado -1 (IBA-1).....	52
FIGURA 14	Imunomarcção para proteína IL-1 β	53
FIGURA 15	Análise de qRt-PCR para TNF- α (β -actina referência)	54
FIGURA 16	Análise de qRt-PCR para IL-10 usando β -actina como referência	55

FIGURA 17	Análise de Rt-PCR para APOA usando RPLP0 proteína ribossomal como referência.....	56
FIGURA 18	Análise de qRt-PCR para APOE usando RPLP0 proteína ribossomal como referência.....	57
FIGURA 19	Análise de qRt-PCR para LCAT usando RPLP0 proteína ribossomal como referência.....	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição centesimal da Dieta Básica Regional.....	37
TABELA 2 - Composição nutricional da Dieta Básica Regional e da Ração comercial padrão.....	38
TABELA 3 - Oligonucleotídeos utilizados nas análises de qRT-PCR	42
TABELA 4 - <i>Primers</i> utilizados no qPCR para IL-10, TNF- α e β -actina	43
TABELA 5 - Escores histopatológicos do fígado de camundongos C57BL6/J.....	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise da variância
ApoA - I	Apolipoproteína da classe A-I
APOA –I	Gene da apolipoproteína A-I
ApoE	Apolipoproteína da classe E
APOE	Gene da apolipoproteína E
AST	Aspartato aminotransferase
BSA	Albumina bovina
CETP	Proteína de transferência do éster de colesterol
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DAB	3,3 – diaminobenzidine-peróxido
DEP	Desnutrição energetico-proteica
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não-alcóolica
DBR	Dieta Básica Regional
EHNA	Esteato Hepatite Não-alcóolica
EPM	Erro padrão da média
ES	Esteatose
FAO	Fundação para a agricultura , saúde e alimentação
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina-eosina
IBA-1	Proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado-1
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina
IL	Interleucina
LLP	Lipase lipoproteica
MCP-1	Proteína quimiotáxica de monócitos-1
NAFLD	Doença hepática gordurosa não alcoólica
ODM	Objetivos de desenvolvimento do milênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salina
PH	Potencial hidrogeniônico

RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNA	Ácido ribonucleico
SR-BI	Receptor <i>scavenger</i> tipo I da classe B
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RPLP0	Proteína ribossomal grande P0
RT- qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real
S-RBP-4	Proteína ligada ao retinol sérico-4
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TGs	Triglicerídios
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alpha
VCAM-1	Molécula de adesão celular-vascular-1
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
WHO	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Alfa
B	Beta
°C	Graus Célsius
G	Gramma
Kg	Quilograma
µg	Micrograma
µL	Microlitro
M	Molar
nM	Nanomolar
Mm	Milímetros
r.p.m.	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Estrutura e função do fígado.....	17
1.2 Transporte reverso do colesterol.....	21
1.3 Apolipoproteínas.....	22
1.3.1 Apolipoproteína E e metabolismo dos lipídios.....	24
1.4 Desnutrição.....	25
1.4.1 Fisiopatologia da desnutrição.....	26
1.4.2 Modelos animais de desnutrição pós-natal e DBR.....	29
1.4.3 Desnutrição e alterações no fígado.....	31
2 JUSTIFICATIVA	33
3 HIPÓTESE	33
4 OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo Geral.....	34
4.2 Objetivos Específicos.....	34
5 MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1 Animais.....	35
5.2 Equipamentos.....	36
5.3 Fármacos, Kits, anticorpos, soluções, líquidos e corantes utilizados...	36
5.4 Rações utilizadas nos protocolos.....	37
5.4.1 Dieta Básica Regional.....	37
5.4.1.1 Alimentos utilizados na confecção da Dieta Básica Regional..	37
5.4.1.2 Protocolo de confecção da Dieta Básica Regional.....	38
5.4.2 Ração padrão.....	38
5.4.3 Composição nutricional da Dieta Básica Regional e da ração comercial padrão Purina LABINA.....	38
5.5 Desenho experimental.....	39
5.5.1 Indução da desnutrição.....	39
5.5.2 Manejo dos grupos.....	39
5.5.3 Coleta de amostras.....	40
5.5.4 Estudos bioquímicos.....	40
5.5.5 Análises dos componentes do transporte reverso do colesterol por RT- qPCR	40

5.5.5.1 Extração do RNA total hepático e síntese de DNA (cDNA).....	40
5.5.5.2 Análise por PCR em tempo real do RNAm hepático	41
5.5.6 Análise da expressão das citocinas TNF- α e IL-10 por RT-qPCR.....	43
5.5.6.1 Expressão Gênica.....	43
5.5.6.2 Síntese do cDNA.....	43
5.5.6.3 PCR em tempo real (qPCR)	44
5.5.7 Imunohistoquímica para detecção da proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (IBA-1)	44
5.5.8 Análise histopatológica do fígado.....	45
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
7. RESULTADOS	49
7.1 Ganho de peso corporal.....	49
7.2 Escore histopatológico.....	50
7.3 Análise sérica da alanina aminotransferase (ALT).....	51
7.4 Imunomarcção para proteína adaptadora de cálcio ionizado-1 (IBA-1) e contagem de células IBA-1-positivas.....	51
7.5 Imunomarcção para Interleucina 1- β (IL-1 β)	52
7.6 Análise de marcadores inflamatórios pela atividade de transcrição do RNAm para TNF- α por qPCR.....	54
7.7 Análise do transporte reverso do colesterol pela atividade de transcrição do RNAm para APOA, APOE e LCAT por qRT-PCR.....	55
8 DISCUSSÃO.....	58
9. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estrutura e função do fígado

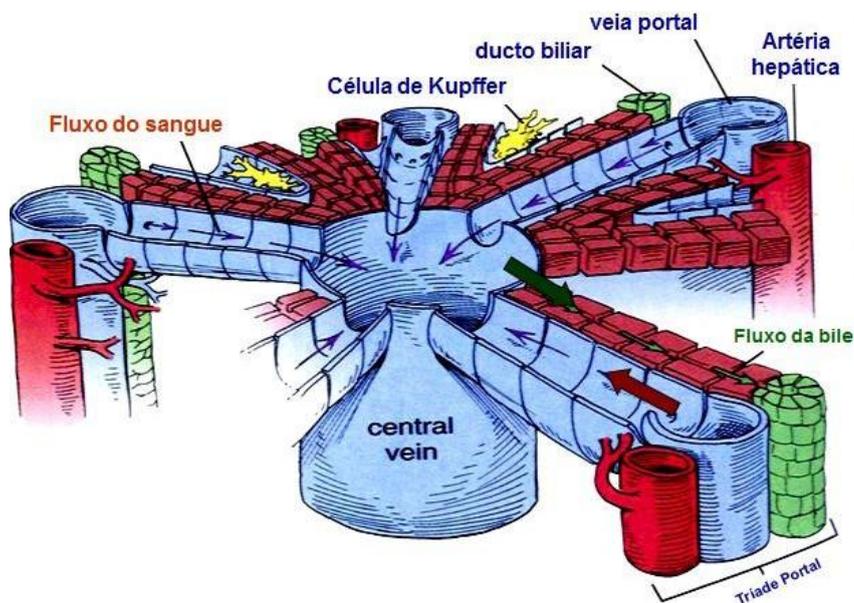
O fígado é um dos maiores órgãos sólidos do corpo humano, apresentando uma massa de cerca de 1,5 kg. Cerca de 80% de seu volume é composto pelos hepatócitos e o restante do órgão é constituído de células não parenquimais, incluindo células endoteliais, células de Ito, células de Kupffer e linfócitos (GAO *et al.*, 2008; NEMETH *et al.*, 2009).

Este órgão é responsável pela síntese de proteínas séricas, metabolismo de aminoácidos, lipídeos e carboidratos, secreção de bile e desintoxicação de compostos xenobióticos. Estudos consideram que o fígado é também um componente importante do sistema imunológico representando a principal fonte de muitos componentes da resposta imune inata, como as proteínas do sistema complemento e da fase aguda, bem como citocinas inflamatórias e quimiocinas (MACKAY, 2002; GERSHWIN *et al.*, 2003). Este órgão desempenha papel fundamental na manutenção da homeostasia de um organismo saudável (RACANELLI & REHERMANN, 2006; GAO *et al.*, 2008; DUNCAN *et al.*, 2009; ISHIBASHI *et al.*, 2009; JOSEFOWICZ *et al.*, 2012; MEDZHITOV *et al.*, 2012).

O fígado consiste de quatro lobos pouco definidos, recebe sangue de dois vasos sanguíneos: a veia porta que transporta sangue proveniente do trato digestório, baço e pâncreas. Convém ressaltar que pela veia porta chega ao fígado todo material absorvido pelo intestino com exceção dos lipídios, que são transportados por via linfática. O outro vaso mencionado é a artéria hepática, um ramo do tronco celíaco que fornece 20-25% do sangue oxigenado para o fígado através das artérias interlobar e interlobular (GUYTON, 2011). O sangue dos ramos da veia porta e da artéria hepática se mistura nos capilares sinusoides de onde converge para a veia central do lóbulo hepático. As veias centrais convergem para formar as veias sublobulares e o sangue retorna ao coração pela veia cava inferior, seguindo veias coletoras e veias hepáticas (EIPPEL *et al.*, 2010).

A unidade funcional básica do fígado é um compartimento microanatômico hexagonal de 1 a 2 mm, o lóbulo hepático, pouco delimitado em humanos, o qual é orientado em torno de uma veia central com espaços porta na periferia. Os hepatócitos formam placas em torno da veia central (ou centrolobular) em uma ou duas camadas. O espaço-porta contém três estruturas anatômicas, um ramo da artéria hepática, um ramo da veia portal e o ducto biliar que drena a bile dos lóbulos (GUZMAN, 2008; BARATTA *et al.*, 2009) (Figura 1).

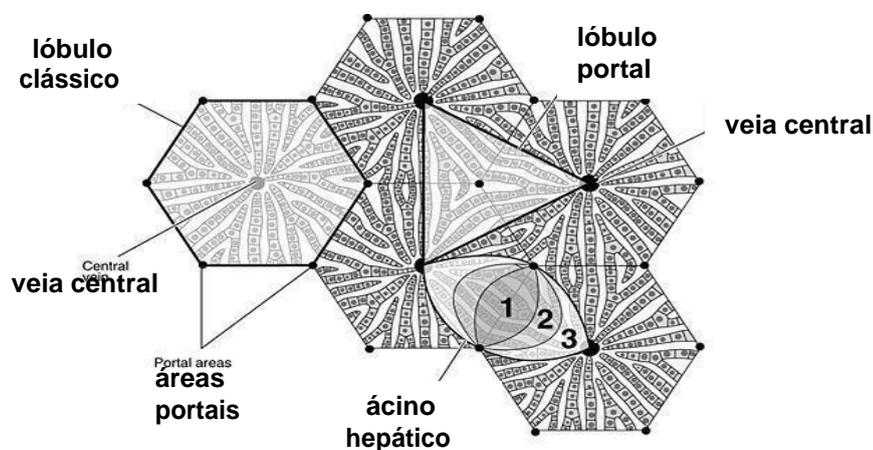
Figura 1. Representação do lóbulo hepático e estruturas do espaço-porta, com drenagem da bile e sangue.



Fonte: Adaptado de Ross, M. H., *Histology: text and atlas*, 2003.

Além do lóbulo clássico, também são descritas outras estruturas hepáticas, incluindo o lóbulo portal e o ácino hepático, esse último muito importante para estudar as alterações patológicas do fígado, já que é dividido em zonas (zonas 1, 2 e 3) com diferentes níveis de oxigenação e acesso a nutrientes, sendo a zona 3 mais pobre em oxigênio e nutrientes, sendo um sítio comum das alterações de esteatose (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2012) (Figura 2)

Figura 2. Representação esquemática das estruturas lobulares do fígado.



Fonte: <http://www.imaios.com/br/e-anatomy/torax/online>

Os hepatócitos são as células funcionais exócrinas e endócrinas do lobulão hepático. São células epiteliais, relativamente homogêneas, com aproximadamente 30 μm de diâmetro. Eles formam placas espessas de células que se anastomosam limitando os capilares sinusoides. Entre os hepatócitos e o sinusóide sanguíneo está presente o espaço de Disse (ALVES & MELLO, 2006).

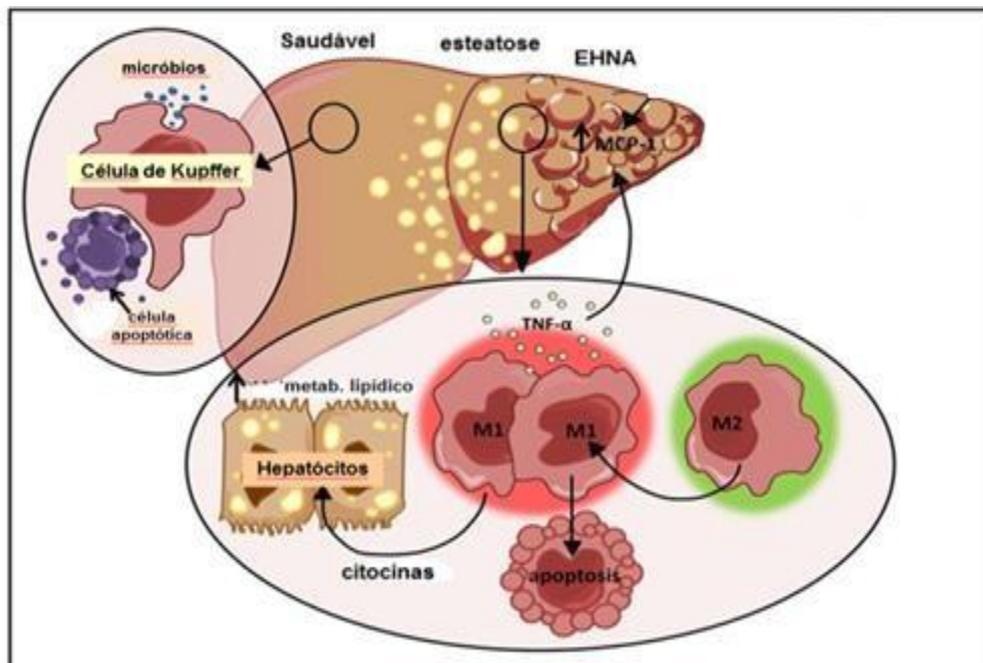
O hepatócito possui dois domínios celulares: um basolateral e um apical. O domínio basolateral está voltado para o espaço de Disse, participando na absorção de substâncias vindas do sangue e na secreção de proteínas plasmáticas. O domínio apical também contém microvilosidades e forma os canalículos biliares onde é secretada a bile (KIERSZENBAUM, 2004).

Dentre as células sinusoidais estão as células endoteliais e as células de Kupffer. As células endoteliais formam a parede do sinusóide e apresentam poros que permitem a troca de fluidos e partículas entre o sangue e o espaço de Disse. As células de Kupffer são macrófagos que residem no lúmen dos sinusoides. Diversos estímulos, como por exemplo, as infecções, levam à

hipertrofia e hiperplasia dessas células, que passam a realizar endocitose e secretar várias substâncias, como citocinas e várias enzimas. No espaço de Disse estão presentes as células de Ito, também chamadas de células estreladas, que participam do metabolismo e do acúmulo de vitamina A (ALVES & MELLO, 2006; GUZMAN, 2008; MCCUSKEY, 2008; ISHIBASHI *et al.*, 2009, HEYMANN *et al.*, 2015).

Em condições patológicas as células de Kupffer podem se transformar em miofibroblastos, os quais secretam laminina e vários tipos de colágeno, podendo levar à fibrose (ISHIBASHI *et al.*, 2009). Além disso, as células de Kupffer podem ter um importante papel imunoinflamatório nos processos de esteatohepatite, atuando na fagocitose de bactérias e de células apoptóticas (Figura 3).

Figura 3: Participação das células de Kupffer em processos imunoinflamatórios do fígado



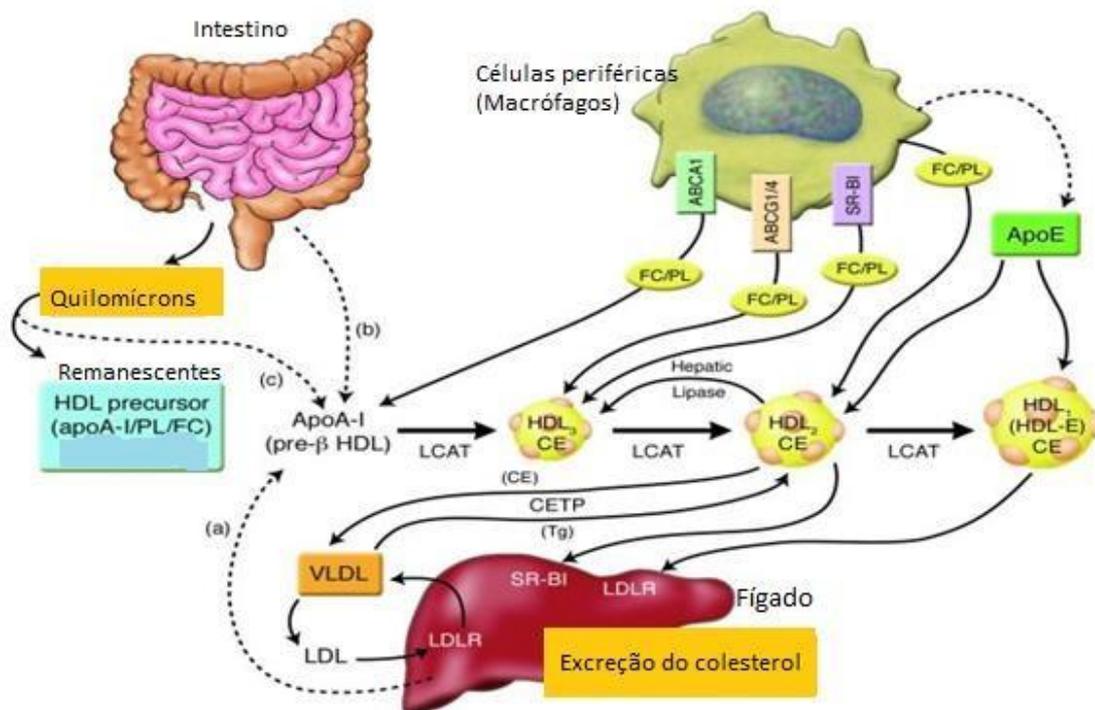
Fonte: Adaptado de Day, A. *Frontiers in Immunology*, 2015.

1.2 Transporte reverso do colesterol

Um número de transportadores de lipídios celulares e receptores e um espectro de intermediários de HDL participam do movimento do colesterol periférico. As partículas apoA-I (pobres ou livres de lipídios) referidas como pré-HDL. Essas partículas são secretadas pelo fígado ou são geradas pelo material da superfície de quilomícrons parcialmente lipolisados (quilomícrons são produzidos no epitélio intestinal e drenados pela circulação linfática) ou de HDL₂ na periferia pela ação da proteína de transferência do éster de colesterol (CETP), lipase hepática, ou proteínas de transferência de fosfolipídios transferidas via de transportador cassete ligante de ATP-A1 (ABCA-1) nas células periféricas, originando lipoproteínas discoides contendo apoA-1. O colesterol não esterificado (colesterol livre) é esterificado pela enzima lecitina-colesterol acetiltransferase (LCAT) (ISHIDA *et al.*, 1987; KUNITAKE 1985; UEHARA *et al.*, 2015). (**Figura 4**).

O colesterol esterificado é então empacotado no centro hidrofóbico dessa partícula discoide, convertendo em um HDL₃ esférico. O HDL₃ pode continuar aceitando colesterol não esterificado e fosfolipídios do receptor *scavenger* tipo I da classe B (SR-BI). A partir da ação continuada da LCAT, o núcleo se expande e o tamanho da partícula aumenta, formando o HDL₂. Embora a principal apolipoproteína componente do HDL₃ e HDL₂ é a apoA-I, a HDL₂ também contém quantidades significativas de apoE (MAHLEY *et al.*, 2006).

Figura 4: Transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado para ser metabolizado.



Precusores de HDL (pré-HDL) são produzidos pelo fígado e intestino (apoA-I/PL/FC) ou derivados do material da superfície dos quilomícrons depois das etapas (a, b, c). Pré-HDL, HDL₃, and HDL₂ podem captar o colesterol para o transporte reverso. A apoE faz com que as partículas se expandam pelo acréscimo de ésteres de colesterol (EC) no seu núcleo depois que a LCAT converte o colesterol livre para CE. Moléculas maiores de HDL com apoE (HDL₂ ou HDL₁) podem transportar o colesterol para o fígado diretamente via o receptor LDL. FC=colesterol livre; HDL-E= HDL com apoE; LDLR= receptor LDL; PL=fosfolípido; SR-BI= receptor *scavenger* tipo I classe B; Tg= triglicerídios. ABCA1= transportador cassette ligante de ATP-A1; LCAT= lecitina-éster-colesterol acetil transferase.

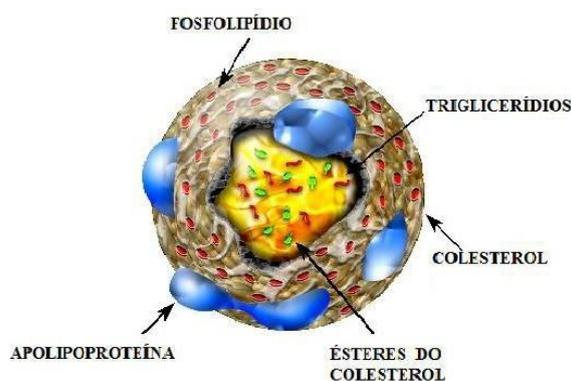
Fonte: MAHLEY *et al.*, (2006).

1.3 Apolipoproteínas

Lipoproteínas são vesículas transportadoras de lipídios que promovem a solubilidade dos lipídios em líquidos biológicos. As lipoproteínas são constituídas de um núcleo não polar contendo triglicerídios e ésteres do colesterol, envolvidos por uma única camada de fosfolípídios. As apolipoproteínas podem agir como cofatores em reações enzimáticas durante o metabolismo lipídico ou podem atuar como ligantes para receptores celulares, os quais medeiam o influxo de lipoproteínas para seu metabolismo (LADU *et al.*, 2000; MAHLEY; RALL, Jr., 2000). As apolipoproteínas se apresentam como o componente proteico das lipoproteínas (EICHNER *et al.*, 2002).

A apolipoproteína E é a melhor caracterizada, considerando suas propriedades estruturais e funcionais. Em geral, as apolipoproteínas servem para regular o metabolismo das lipoproteínas e controlar o transporte e redistribuição do colesterol nos tecidos. É sintetizada e secretada principalmente no fígado e no cérebro, mas é também sintetizada nos tecidos periféricos, como nas adrenais, testículos, pulmões, linfonodos mesentéricos e rins (LADU *et al.*, 2000; MAHLEY; RALL, Jr., 2000).

Figura 5. Estrutura das lipoproteínas mostrando a superfície polar onde encontramos os fosfolípídios, o colesterol e as apolipoproteínas e também o núcleo apolar, onde encontramos ésteres do colesterol e triglicerídios.



Fonte: High density lipoprotein (*fitnessmedicals.es- on line*)

Embora a função primária da apoE seja facilitar o transporte lipídico para dentro das células através do receptor de LDL, é reconhecido que apoE modula uma variedade de importantes funções biológicas (DEMARCHI *et al.*, 2005).

Trabalhos recentes seguem a linha de investigação sobre o papel da apoE na maturação intestinal e adaptação após a desnutrição pós-natal em camundongos. Os dados de apoE com camundongos nocautes têm sugerido efeitos sinérgicos de apoE e IGF-1 na recuperação da barreira intestinal (ORÍÁ *et al.*, 2007).

A apolipoproteína E facilita a apresentação de antígenos de lipídios por células apresentadoras de antígenos, tais como as células dendríticas e células B, através de um processo que envolve a endocitose de um complexo apoE-lipídio-antígeno através do receptor de LDL (LDLR) (VAN DEN ELZEN *et al.*, 2005; TAKACH *et al.*, 2010).

1.3.1 Apolipoproteína E e metabolismo dos lipídios

A apoE é responsável pelo transporte de colesterol das células para o fígado para ser metabolizado, portanto, desempenhando um papel crítico no metabolismo de lipídios (MAHLEY; RALL, Jr., 2000), sendo encontrada além do fígado em outros tecidos, como o cérebro (JOFRE-MONSENY; MINIHANE; RIMBACH, 2008).

A apolipoproteína E é uma das principais lipoproteínas que regulam o metabolismo dos lipídios e está associada com as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) ou com lipoproteínas de alta densidade (HDL) e possuem um papel no transporte reverso do colesterol (colesterol dos tecidos periféricos é transportado para o fígado – diretamente através da apoE ligada à HDL ou pela transferência dos ésteres de colesterol para partículas maiores) (DE-ANDRADE *et al.*, 2000) (MAHLEY, 1978; CHUANG; LEUNG; HSU; HARRIS, 2011). A apoE medeia a ligação de alta afinidade entre as partículas de lipoproteína contendo apoE ao receptor LDL (lipoproteína de baixa densidade), portanto é responsável pela captação celular dessas partículas (CHARLTON-MENYS; DURRINGTON, 2008).

A apolipoproteína E também representa a principal proteína constituinte dos quilomícrons, sintetizados no intestino e com a função de transportar o colesterol e triglicerídios da dieta. Os quilomícrons, quando sintetizados e liberados no intestino, não possuem apoE, mas à medida que circulam e são processados, adquirem apoE de outras classes de lipoproteínas. Isso resulta no desvio da distribuição da apoE no plasma para os remanescentes. Os quilomícrons remanescentes são removidos do plasma por um processo mediado pela apoE. Os seres humanos que apresentam deficiência de apoE e

camundongos transgênicos desenvolvem uma grave retenção dos quilomícrons remanescentes no plasma.

Consistente com esta função, elevações dos níveis de colesterol no plasma são observadas em indivíduos com falta de apoE, que apresentam deficiência familiar de apoE ou que possuem defeitos genéticos no receptor de LDL. O aumento de seu RNAm no tecido hepático nas dislipidemias é observado, podendo ser resultado de uma adaptação metabólica (GOLDSTEIN; MASCITELLI; PEZZETTA, 2010; PENDSE *et al.*, 2009).

1.4 Desnutrição

A desnutrição infantil caracteriza-se como um sério problema de saúde pública no mundo, principalmente devido as suas consequências no desenvolvimento, crescimento e sobrevivência das crianças afetadas (DE ONIS *et al.*, 2012). A desnutrição afeta com maior intensidade crianças, idosos, gestantes e lactantes, descritos como as faixas etárias mais vulneráveis (GOPALAN, 2000), sendo considerada como o fator de risco mais importante para doença e morte a nível mundial e está associada a quase 50% de todas as mortes em crianças jovens (MULLER *et al.*, 2005; CAULFIELD *et al.*, 2004).

A África lidera as estatísticas sobre desnutrição, segundo o Fundo das nações unidas para a infância (UNICEF), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Banco Mundial, dos 161 milhões de menores de cinco anos desnutridos mundialmente em 2013, mais de um terço residiam na África (UNICEF, WHO, 2013).

Crianças desnutridas possuem maior probabilidade de óbito por doenças infecciosas, e estima-se que a desnutrição é a causa subjacente de 45% das mortes globais em crianças abaixo de 5 anos de idade (PELLETIER *et al.*, 1995; BLACK *et al.*, 2013). Desnutrição pode levar a comprometimento da função imunológica, este é um fator importante para o aumento da susceptibilidade às infecções (WATERLOW, 1992; AIKEN *et al.*, 2011).

De acordo com o UNICEF as principais causas da desnutrição na infância podem ser categorizadas em três principais fatores subjacentes que são; insegurança alimentar das famílias, cuidado inadequado, ambiente doméstico insalubre e ausência de serviços de saúde (UNICEF, 2012). Estes fatores, por sua vez, são afetados pela renda, pobreza, emprego, moradia, bens, pensões e transferências que são também determinados por fatores sócio-econômicos e políticos (TETTE *et al.*, 2015).

No intuito de reverter esse quadro, as Nações Unidas incluíram nos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM) a meta de reduzir pela metade a percentagem de pessoas desnutridas até o ano de 2015. Com base no mais recente relatório das Nações Unidas: “O Estado da Insegurança Alimentar no Mundo” (FAO, 2014), ocorreu uma redução da fome nos países em desenvolvimento, sinalizando ser possível atingir esta meta ou chegar o mais próximo desse objetivo. Até à data de publicação do referido relatório, 63 países em desenvolvimento atingiram a meta dos ODM, e mais seis estavam próximos de alcançá-la em 2015. Ainda segundo esse relatório o Brasil reduziu em 82% a população em situação de subalimentação entre os anos de 2002 e 2012. Estas informações confirmam que o Brasil está dentro da meta esperada (FAO, 2014).

Apesar de estudos demonstrarem uma redução gradativa do panorama de desnutrição no Brasil, por conta da melhoria das condições socioeconômicas e da melhor assistência em saúde, principalmente no nível primário de atenção, a desnutrição ainda permanece como um desafio para as políticas públicas de assistência e de saúde (MONTEIRO *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2010; FIGUEROA PEDRAZA; MENEZES, 2015).

1.4.1 Patogênese da desnutrição

A literatura médica define desnutrição como, estado nutricional em que um ou mais nutrientes essenciais estão ausentes ou estão presentes em quantidades insuficientes. No ano de 1975 a FAO/WHO adotou o termo

desnutrição energético-proteica (DEP), para designar essa síndrome (CARRAZZA; MARCONDES, 1991).

A desnutrição energético-proteica (DEP) resulta do consumo inadequado de proteínas e calorias, ou pode ser uma consequência de deficiências na digestão ou absorção desses nutrientes, levando a perda de tecido gorduroso e tecido muscular, perda de peso, letargia e também fraqueza generalizada (WATERLOW, 1997; GURMINI *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2011).

DEP não é considerada uma síndrome de deficiência simples, podendo ser complicada por uma deficiência de micronutrientes, associada ao quadro, basicamente todos os processos do organismo entram em uma redução funcional adaptativa, como uma estratégia no intuito de garantir a sobrevivência (KUMAR *et al.*, 2011).

As alterações iniciais são fisiopatológicas, configurando um prejuízo funcional, no avançar das alterações surgem os danos bioquímicos e físicos, sendo a perda de peso o sinal clínico inicial mais evidente nesse processo. Com a cronicidade ocorre estagnação no crescimento corporal. As lesões descritas na literatura são inespecíficas, sendo as principais alterações patológicas a deficiência de crescimento, insuficiência na formação de colágeno, atrofia das glândulas endócrinas (testículos e ovários), atrofia do timo e dos tecidos linfoides, redução da atividade dos osteoblastos; anemia; edema por hipoproteinemia e degeneração gordurosa no fígado (WATERLOW, 1997; GURMINI *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2011).

As manifestações mais importantes da DEP são o marasmo nutricional e o *Kwashiorkor* (BERGELLOUN, 1990; WATERLOW, 1997; GURMINI *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2011).

O marasmo nutricional caracteriza-se por um déficit proteico e energético global, assim o indivíduo passa a metabolizar os próprios tecidos para suprir a demanda nutricional. No jejum prolongado, a somatotrofina,

glucagon, e glicocorticoides mobilizam os ácidos graxos do tecido adiposo e os aminoácidos do tecido muscular, ocorre a liberação de aminoácidos musculares para serem utilizados pelos órgãos nobres como o fígado, pâncreas e o intestino, desta forma o organismo consegue manter os níveis normais de proteínas plasmáticas. Os estoques de glicogênio são consumidos rapidamente, então o organismo passa a produzir glicose por meio de aminoácidos livres e glicerol proveniente dos ácidos graxos, aumentando a gliconeogênese. Mecanismo este que ocorre, principalmente como uma adaptação ao jejum prolongado. Por conta da alta ativação dessas vias alternativas de produção de glicose e redução crescente dos estoques de macronutrientes, ocorre um quadro de hipoglicemia. Em contrapartida, a redução dos estoques de glicose e utilização de vias alternativas de produção, ocorre diminuição na síntese de insulina e aumento de glucagon, epinefrina e cortisol. A elevação do cortisol promove aumento da liberação de ácidos graxos livres, decorrentes da lipólise e da menor atividade da lipase lipoproteica, gerando aumento da resistência à insulina e também hiperglicemia (TRINDADE; NÓBREGA; TONETE, 1986; GOLDEN; RAMDATH, 1987; GUIMARÃES *et al.*, 2007).

Déficit no crescimento e no desenvolvimento físico são observados, contudo, as funções orgânicas essenciais são, dentro do possível, preservadas incluindo a função hepática. Não são comuns as alterações como: edema, esteatose, lesões de pele e cabelo nesse quadro (TRINDADE; NÓBREGA; TONETE, 1986; GOLDEN; RAMDATH, 1987; GUIMARÃES *et al.*, 2007).

Na forma *Kwashiorkor* da DEP há aporte energético suficiente, porém observa-se uma carência proteica. O nível de cortisol permanece aumentado, porém em escala inferior a observada no marasmo nutricional. A mobilização dos ácidos graxos do tecido adiposo e aminoácidos dos músculos também ocorre em menor extensão, levando à lesão hepática acompanhada de edema. No *Kwashiorkor* estará presente uma diminuição de aminoácidos no plasma, principalmente a hipoalbuminemia, o que levará ao estado edematoso presente nesta condição. Na literatura outras teorias se contrapõem a relação entre edema e hipoalbuminemia, propondo que o edema resulte provavelmente de

lesões causadas por radicais livres nas paredes dos vasos capilares e membranas celulares. São frequentemente descritas as lesões de pele e alterações de cabelo. O edema é considerado sinal patognomônico do *Kwashiorkor* (TRINDADE; NÓBREGA; TONETE, 1986; GOLDEN; RAMDATH, 1987; GUIMARÃES *et al.*, 2007; DULGER *et al.*, 2002).

Figura 06: Representação das formas clínicas da DEP



Marasmo

Kwashiorkor

Fonte: RYTTER *et al.*, (2014).

1.4.2 Modelos animais de desnutrição pós-natal e Dieta Regional Básica

Na literatura vários métodos de desnutrição são descritos, dentre os mais utilizados podemos citar: a restrição alimentar pelo afastamento da mãe durante o período de lactação (CASTRO *et al.*, 2012, FLORIAN, NUNES, 2011), o ajuste da ninhada (LADD *et al.*, 2010), a indução da desnutrição através do uso de dietas hipoproteicas (SOUZA *et al.*, 2009). Independente da técnica utilizada, a desnutrição induz a um déficit de peso corporal.

Trabalhos utilizando animais de laboratório alimentados com dietas contendo baixa concentração de proteínas têm sido muito úteis no estudo dos efeitos da desnutrição, fornecendo informações a respeito dos mecanismos envolvidos na imunodeficiência e na maior susceptibilidade a infecções (COSTA *et al.*, 2012).

A Dieta Básica Regional (DBR), elaborada após estudos de frequência do consumo alimentar realizada pelo setor de Nutrição Humana da Universidade Federal de Pernambuco (TEODÓSIO *et al.* 1990), foi utilizada em estudos que avaliaram a morfometria cardíaca de ratos expostos indiretamente à desnutrição e ao etanol durante o período perinatal (ARAÚJO-FILHO *et al.*, 2007), na avaliação do efeito da desnutrição intra-uterina na progressão da resposta inflamatória aguda e subcrônica (BARRETO *et al.*, 2012) e para verificar o efeito da desnutrição no perfil de ácidos graxos do leite materno e do crescimento e desenvolvimento de ratos jovens (SOUZA *et al.*, 2009).

Em outro estudo de Oliveira e col. (2011), investigou-se a desnutrição precoce por DBR na resposta inflamatória crônica, e sua influência na resposta farmacológica à indometacina. Neste estudo concluiu-se que a subnutrição precoce atenuou a resposta inflamatória crônica e o efeito anti-inflamatório de indometacina (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A DBR também foi utilizada para verificar seus efeitos sobre a expectativa de vida e crescimento de filhotes de ratos Sprague-Dawley cujas mães foram alimentadas com DBR desde a fecundação (LAGO *et al.*, 1997). Barros e col. (2006), investigaram os efeitos da desnutrição, induzida pela DBR, sobre o desenvolvimento motor de filhotes de ratas alimentadas com DBR durante a lactação. Os animais desnutridos apresentaram um atraso na maturação do reflexo e na evolução da atividade locomotora. Confirmando os efeitos deletérios da desnutrição induzida por DBR sobre o desenvolvimento e a maturação somática do sistema nervoso.

Ainda são descritos estudos empregando esse modelo de desnutrição, demonstrando os efeitos deletérios da DBR sobre a gestação e a lactação (PESSOA *et al.*, 2000), e o desenvolvimento de alguns órgãos (PESSOA, 1997; ROCHA DE MELO; GUEDES, 1997).

1.4.3 Desnutrição e alterações no fígado

Dentre as alterações que a desnutrição causa no fígado destacam-se: diminuição da massa do órgão, hipoplasia e atrofia dos hepatócitos, degeneração gordurosa, fibrose, necrose e degeneração hidrópica (KUMAR, 2011; FRANÇA *et al.*, 2009).

No fígado pode-se desenvolver um estado de esteatose, que consiste na infiltração gordurosa do fígado, que é tanto mais intensa quanto maior o grau de desnutrição, sendo mais frequente e intensa no *kwashiorkor* do que no marasmo. Quando a desnutrição se corrige, a esteatose desaparece e as células passam a apresentar temporariamente estado de depleção protéica. O infiltrado celular linfocitário e fibrose podem estar presentes, levando a uma diminuição da síntese de sais biliares e de sua conjugação por conta dessas alterações. Em estágios mais avançados, ocorre infiltrado celular, aumento do depósito de gordura e fibrose em torno dos ácinos atrofiados que podem apresentar-se dilatados (DUTRA, 1998).

Em condições nutricionais normais, de boa alimentação e metabolismo, não há acúmulo de triglicérides no hepatócito. Uma vez que estes, os hepatócitos, sintetizam e exportam os lipídios para o tecido adiposo, onde são armazenados. No entanto, podem ocorrer situações em que exista excesso de oferta de ácidos graxos ao fígado, por meio da chegada de ácidos graxos livres provenientes do tecido adiposo, excedendo a capacidade do hepatócito de processá-los e reexportá-los. Este mecanismo pode ser observado no jejum, no diabetes descompensado e na desnutrição, uma vez que estas condições causam intensa mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo. A ativação da lipase hormônio-sensível é excessiva devido principalmente à falta de insulina. Quando não há ingestão adequada de alimentos, como na desnutrição, a insulina não é produzida em quantidades adequadas. A quantidade de ácidos graxos que chegam ao fígado é maior que a capacidade de metabolização pelos hepatócitos, ou de síntese de VLDL. Ocorre então, esterificação e acúmulo no citoplasma dos hepatócitos na forma de triglicérides levando a

esteatose. A deficiência na produção de lipoproteínas, basicamente do tipo VLDL pelos hepatócitos dificulta a exportação de triglicérides do fígado para outros tecidos. Isto pode ocorrer por conta da diminuição na síntese de proteínas ou diminuição na síntese de fosfolípidos.

Na desnutrição pode ocorrer tanto a falta de aminoácidos, como de colina na dieta. A colina é indispensável para síntese de fosfolípidos, estando presente na 'cabeça' polar da molécula. A colina pode ser sintetizada no organismo, mas isto exige uma reação de transmetilação envolvendo a metionina, que é um aminoácido essencial. Portanto, a falta de metionina se traduz em deficiência de colina. Como os triglicérides não podem ser empacotados em VLDL, não podem ser exportados e acumulam no hepatócito, e dependendo do grau de acúmulo pode levar a esteatose (DUTRA, 1998).

Joshi e col. (2003) observaram em seu estudo que o peso do fígado de animais desnutridos era menor em comparação ao grupo controle, no entanto, o peso relativo de lipídios do fígado de animais alimentados com dietas de restrição proteica foi maior quando comparada com os animais do grupo controle normonutrido. Sugerindo assim, alterações na composição do fígado destes animais. Em humanos a restrição proteica resulta em um quadro descrito popularmente como “fígado gordo”, quadro este semelhante ao descrito em crianças com desnutrição do tipo *kwashiorkor*. Filhotes de ratas submetidos a desnutrição proteica apresentaram altos níveis de colesterol hepático (JOSHI *et al.*, 2003).

Ratos *Wistar* recebendo uma dieta com baixos níveis de proteína por quatro semanas apresentaram déficit de crescimento, alopecia, edema, esteatose hepática e acidose metabólica, que são características do *Kwashiorkor* humano, essas alterações foram revertidas após a inserção de dieta rica em proteína (ETUKUDO *et al.*, 1999).

2. JUSTIFICATIVA

Mesmo diante da crescente mudança de perfil nutricional que presenciamos atualmente, a desnutrição se mostra ainda prevalente como uma condição que pode potencializar inflamações. Esta mudança de padrão nas características dietéticas da população, pode ocasionar graus variados de alteração histopatológica do fígado que merecem ser melhor estudados e elucidados. Dentre as alterações que a desnutrição causa no fígado destacam-se: diminuição da massa do órgão, hipoplasia e atrofia dos hepatócitos, degeneração gordurosa, fibrose, necrose e degeneração hidrópica (KUMAR, 2011; FRANÇA *et al.*, 2009).

A dieta básica regional (DBR), tem sido utilizada em vários modelos experimentais de desnutrição, contudo poucos estudos têm explorado o efeito do tratamento crônico da DBR no fígado, um órgão central no metabolismo do colesterol e resposta imunoinflamatória.

Este estudo justifica-se pelo fato de pretender-se avaliar a desnutrição ocasionada pela dieta característica da região nordestina brasileira, a DBR, e suas possíveis alterações no fígado, contribuindo com novos conhecimentos a cerca da temática.

3. HIPÓTESE

Esse trabalho tem como hipótese que uma dieta crônica (40 dias) em camundongos C57BL6J, pela dieta regional básica irá ter algum grau de alteração do metabolismo transverso do colesterol e induzir uma resposta inflamatória tecidual no fígado, com maior expressão de citocinas inflamatórias e imunomarcção para macrófagos hepáticos (células de Kupffer).

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Analisar as alterações hepáticas, inflamatórias e do metabolismo do colesterol induzidas por exposição crônica (por 40 dias) a uma dieta de desnutrição em camundongos C57BL6J após o desmame.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

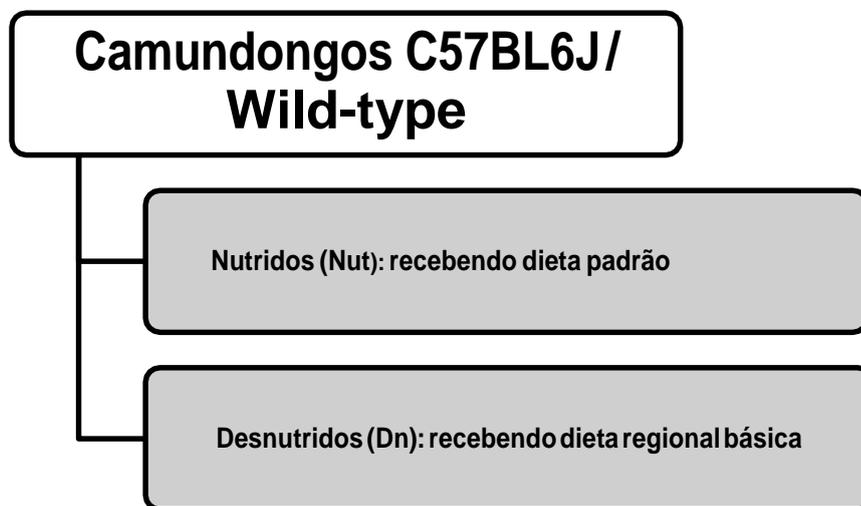
- Desenhar curva de peso ponderal dos grupos em estudo;
- Analisar o grau de comprometimento do parênquima hepático através da realização de escore histopatológico;
- Avaliar a função hepática pela análise sérica da alanina aminotransferase (ALT);
- Realizar imunohistoquímica para proteína adaptadora do cálcio ionizado-1 (IBA-1), um marcador de célula de Kupffer; além da citocina pró-inflamatória IL-1 β ;
- Avaliar a resposta inflamatória no fígado a partir da análise da expressão de citocinas: TNF- α e IL-10 por qPCR;
- Avaliar a expressão dos genes dos componentes envolvidos no metabolismo hepático do colesterol (ApoA- I, ApoE e LCAT), através de RT-qPCR.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL6J de ambos os gêneros, após desmame, provenientes da sala de experimentação de animais do biotério da Universidade Estadual do Ceará (UECE), alojados em estantes ventiladas em sala de experimentação do laboratório da Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes. A Profa. Izabel tem colaboração com o Prof. Dr. Reinaldo Oriá através do Núcleo do Tratamento da Obesidade, Metabolismo e Aterosclerose do Semiárido Brasileiro (NUTROMAIS). Os animais foram armazenados em caixas de polipropileno (19x30cm) e mantidos em grupos de no máximo cinco animais por caixa, contendo suporte para bebedouro e divisória interna separando o bebedouro da ração. Foi respeitado o ciclo de claro-escuro de 12 horas, temperatura entre 20 e 28°C, com livre acesso a ração e água.

Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos, como demonstrado no esquema abaixo:



Todos os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Estadual do Ceará – UECE, protocolo nº 6500582/2015.

5.2 Equipamentos

Durante o curso dos experimentos, foram usados diversos aparelhos e instrumentos, os quais são citados a seguir:

- Balança digital eletrônica para pesagem dos animais – FILIZOLA®;
- Eppendorfs;
- Pipetas;
- Ponteiras;
- Almofariz;
- Becker;
- Criotubos;
- Batedeira planetária;
- Geladeira e Freezer Thermo scientific® (-80°C);
- Homogenizador de tecidos Bio-GEN series PRO200 (ProScientific®);
- Instrumental cirúrgico (pinças, bisturis, tesouras, agulhas, etc);
- Micrótomo Leica;
- Microscópio
- Espectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific®)
- Termociclador (Swift Spectrum 96, ESCO®)

5.3 Fármacos, Kits, anticorpos, soluções, líquidos e corantes utilizados

- Anticorpo primário de cabra anti - IBA1(ABICAN®); Anticorpo secundário de cabra biotilado IgG (SANTA CRUZ®)
- Formol 10% (Reagen)
- Kit extração de RNAm (RNeasy Mini Kit, Qiagen®)
- DNase I (Life Technologies®)
- Transcriptase reversa M-MuLV (New England Biolabs Inc.®)
- Master Mix (SYBR Green Real-Time PCR Master Mix, Life Technologies®)
- Kit Ensaio Colorimétrico – Alanina amino-transferase LABTEST®/ Ref #53-200
- Xilazina®
- Ketamina®
- Nitrogênio líquido

5.4 Rações utilizadas nos protocolos deste estudo

5.4.1 Dieta Básica Regional (DBR)

A ração utilizada neste estudo foi confeccionada no Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Federal do Ceará (UFC), com a colaboração do Prof. Said Gonçalves.

5.4.1.1. Alimentos utilizados na confecção da Dieta Básica Regional:

- Batata-doce - *Iponea batatas*
- Feijão mulatino - *Phaseolus vulgaris*
- Farinha de mandioca - *Manihot esculenta*
- Carne seca (carne bovina salgada e prensada)
- Gordura da própria carne

Utilizou-se como ingredientes: batata-doce (*Iponea batatas*), feijão mulatino (*Phaseolus vulgaris*), farinha de mandioca (*Manihot esculenta*), carne seca (carne bovina salgada e prensada) e gordura da própria carne (TEODOSIO; LAGO; ROMANI; GUEDES, 1990; MEDEIROS *et al.*, 2008).

Segue abaixo a composição centesimal da DBR:

Tabela 1: Composição centesimal da Dieta Básica Regional

Dieta	Ingredientes	g(%)	Composição centesimal					
			Proteína	Carboidratos	Gorduras	Cinza	Fibras	kcal%
DBR	Feijão	18,34	3,99	10,66	0,24	0,57	1,09	60,76
	Farinha de mandioca	64,81	0,84	48,59	0,12	0,43	5,64	198,8
	Carne seca	3,74	2,72	0	0,06	0,06	0	11,5
	Gordura da carne seca	0,35	0	0	0,35	0	0	3,15
	Batata doce	12,76	0,30	9,99	0,03	0,20	0,48	41,43
	Total	100	7,87	69,24	0,80	1,26	7,21	315,64

Fonte: BARROS *et al.*, 2006

5.4.12 Protocolo de confecção da Dieta Básica Regional

Os ingredientes, exceto a farinha de mandioca, foram cozidos e em seguida desidratados em estufa com circulação de ar (50-60°), durante 48 horas. Em seguida, moídos e homogeneizados, acrescentando-se também a gordura do charque, retirada antes do cozimento da carne. Desse modo, a carne foi cozida, seca e moída com o menor conteúdo possível de tecido adiposo. A gordura foi derretida e acrescentada na proporção preconizada pela fórmula. A massa obtida foi então prensada, para obtenção de pequenos pedaços (*pellets*). Os *pellets* permaneceram em estufa com circulação de ar (50°C-60°C) por 24 horas até a sua secagem e solidificação (TEODOSIO; LAGO; ROMANI; GUEDES, 1990).

5.4.2 Ração padrão

O grupo normonutrido foi alimentado com a ração comercial padrão Purina® respeitando-se as mesmas quantidades disponibilizadas para o grupo DBR.

5.4.3 Composição nutricional da Dieta Básica Regional e da ração comercial padrão Purina (LABINA®)

Ao se fazer um comparativo entre a composição da DRB e da ração comercial (Purina®), estas apresentam em sua composição, respectivamente, a seguinte composição nutricional: proteínas (9,35% e 20,3%), carboidratos (70,6% e 56%), e gorduras (0,36% e 3,33%).

Tabela 2. Composição nutricional da DBR e da ração comercial padrão.

Componentes	DBR	Ração PURINA ®
Proteínas	9,35%	20,3%
Carboidratos	70,6%	56%
Gorduras	0,36%	3,33%

Fonte: Análise bromatológica realizada na Fundação Núcleo de Tecnologia industrial do Ceará (NUTEC)

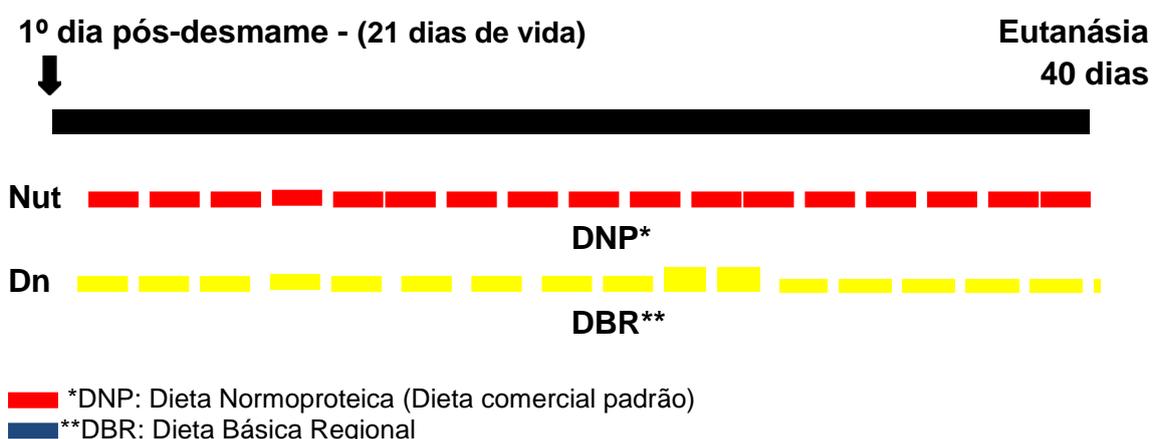
5.5. Desenho experimental

5.5.1 Indução da Desnutrição

No vigésimo primeiro dia de vida, 40 animais foram desmamados e separados em grupos aleatoriamente. A desnutrição foi induzida com o uso da Dieta Básica Regional (DBR), enquanto o grupo normonutrido (controle) recebeu a ração padrão Purina®. Os animais de ambos os grupos tiveram livre acesso à água, à ração padrão e à DBR durante os 40 dias do experimento.

5.5.2 Manejo dos grupos

Segue abaixo a representação esquematizada do manejo dos grupos.



Os animais foram diariamente monitorados para observação do ganho de peso. Para a obtenção dos pesos, os animais foram pesados diariamente, no mesmo horário, para desenho da curva de peso ponderal.

Os animais foram sacrificados no 40º dia de experimento, sendo previamente anestesiados com solução de Ketamina® (8mg/100g de peso) e Xilazina® (0,8mg/100g de peso), seguiu-se as instruções de acordo com o Manual Técnico do curso de Manipulação de Animais de Laboratório da Fiocruz (FIOCRUZ, 2005).

5.5.3. Coleta de Amostras

Após a eutanásia, realizou-se a laparotomia com uso de material cirúrgico autoclavado. Fragmentos do fígado foram imersos imediatamente em nitrogênio líquido e estocados em freezer a -80°C até o uso.

Outro fragmento foi lavado em tampão fosfato salina (PBS) e colocado em cassete plástico e imersos em formol tamponado por 18h. Em seguida foram inseridos em álcool 70% por um período de 24-48h e então incluídos em parafina, seguiu-se realizando corte em micrótomo e confecção de lâminas, as quais foram coradas e utilizadas em ensaios de imunohistoquímica, bem como para estudo da morfologia do tecido hepático e para a construção de escore histopatológico para avaliação da presença de esteatose hepática.

5.5.4 Estudos bioquímicos

O sangue obtido por decapitação foi transferido para tubo *ependorf* e deixado para coagular em temperatura ambiente. O tubo com soro foi centrifugado (12.000 r.p.m.) a 4°C por 3 minutos para separar melhor o soro dos debris do coágulo. Em seguida o soro foi estocado em freezer a -20°C até análise sérica da alanina aminotransferase (ALT), um marcador da função hepática. Utilizamos o método de Reitman e Frankel para análise (Kit para ensaio colorimétrico – LABTEST®).

5.5.5 Análises dos componentes do transporte reverso do colesterol por RT-qPCR

5.5.5.1 Extração do RNA total hepático e síntese de DNA complementar (cDNA)

Uma alíquota de aproximadamente 30 mg de tecido hepático foi macerado em tampão RLT do kit comercial (RNeasy Mini Kit, Qiagen®) com um homogeneizador Pro200 (Procientific®, USA). Após a maceração, o RNA total

foi extraído conforme instruções do fabricante do kit comercial *RNeasy Mini kit*[®]. O RNA total obtido foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop 2000, *Thermo Scientific*[®]) e feita a análise qualitativa de sua integridade por eletroforese em gel de agarose.

Volume equivalente a 1 µg de RNA total foi submetido a tratamento com DNase I (*Life Technologies*[®]) e, posteriormente, empregado na síntese de cDNA, utilizando a transcriptase reversa M-MuLV (*New England Biolabs Inc.*[®]) e primers randômicos (300 130 ng/ µL – *Life Technologies*[®]). O cDNA obtido foi diluído em água ultra-pura (1:5) e armazenado a -20 °C. A execução de todos os procedimentos aqui descritos seguiram as recomendações dos protocolos dos respectivos fabricantes.

5.5.5.2 Análise por PCR em tempo real do RNAm hepático

Para a quantificação relativa do RNA mensageiro de cada proteína selecionada (ApoA1, ApoE, LCAT e, como referência, RPLP0), foram utilizados por reação: 10 µL de Master Mix (SYBR Green Real-Time PCR Master Mix, *Life Technologies*[®]), 5 µL de cDNA, 2 µL de oligonucleotídeos e 3 µL de água ultrapura. Todas as reações foram realizadas em triplicatas.

Os oligonucleotídeos utilizados foram sintetizados (*Life Technologies*[®]) a partir de sequências depositadas em base de dados específica (LEFEVER *et al.*, 2009), ou a partir de sequências de referências depositadas em base de dados online (Genbank, NCBI). Nesse último caso, fez-se uso de software online para a obtenção das sequências dos oligonucleotídeos (UNTERGRASSER *et al.*, 2012). As 145 sequências dos oligonucleotídeos utilizados são descritos a seguir.

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados nas análises de RT-qPCR

Gene	Função		Oligonucleotídeos	Fragmento amplificado	Referência Genbank
APOE	Captação de lipoproteínas pelo fígado	F	CTTCTGGGATTACCTGCGCTGG	239 pb	NM_009696
		R	GTAGATCCTCCATGTCCGGCT		
APOA-1	Principal apolipoproteína do HDL	F	TCAAAGACAGCGGCAGAGAC	293 pb	NM_009692
		R	CACCTTCTGGCGGTAGAGCTC		
LCAT	Esterificação do colesterol livre	F	CTGGCTCCTCAATGTGCTCTTC	140 pb	NM_008490
		R	AGGCCGTGTGTGGTTACTGAGT		
RPLPO (gene de referência)	Codifica fosfoproteína ribossômica	F	GCTTCATTGTGGGAGCAGACA	101 pb	RTPrimerDB ID 1261
		R	CATGGTGTCTTGCCCATCAG		

Fonte: Laboratório de Bioquímica Humana – UECE, 2014

O termociclador utilizado (Swift Spectrum 96, ESCO®) foi programado da seguinte maneira: 1x (95°C/5'), 40x (95°C/30"; 60°C/30"; 72°C/40") e 1x (72°C/2'), sendo a reação de amplificação sucedida por uma curva de melting para avaliar a ocorrência de 149 amplificações inespecíficas

Figura 7: Equipamento utilizado nas análises de RT-qPCR



Fonte: Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia – UECE, 2015.

5.5.6 Análise da expressão das citocinas TNF- α e IL-10 por RT-qPCR

5.5.6.1 Expressão Gênica

O tecido (30 mg) foi macerado no reagente Trizol (Invitrogen[®]) com o auxílio do *Tissueruptor* (Qiagen[®]). Para a extração do RNA total foram seguidas as instruções do fabricante. A quantificação do RNA foi feita no equipamento Nanodrop (Thermo[®]) e a qualidade foi avaliada em eletroforese em gel de agarose 1%.

O grau de pureza das amostras foi considerado adequado. A quantificação de cada amostra foi realizada em triplicata, sendo que a expressão de cada RNAm foi normalizada em relação a expressão do gene endógeno β -actina. O RNA foi armazenado a -80°C para uso posterior.

5.5.6.2 Síntese do cDNA

Para a confecção do cDNA foi utilizado 1 μ g do RNA total, tratado com DNase (Ambion[®]). Foram utilizados iniciadores oligo (dT), dNTPs e a enzima Super Script III seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen[®]). As reações de qPCR foram realizadas com três repetições biológicas para cada tratamento. Foram investigados os genes do TNF- α e IL-10 sendo utilizados os *housekeeping* β -actina e auxílio dos iniciadores, conforme descritos na tabela abaixo:

Tabela 4: Origem dos *Primers* utilizados no qPCR para IL-10, TNF- α e β -actina.

Gene	Forward	Reverse	Nºacesso
IL-10	AAAGCAAGGCAGTGGAGCAG	TCAAACCTCATTTCATGGCCTTGT	NM_012854
TNF-α	TCGAGTGACAAGCCCGTAGC	CTCAGCCACTCCAGCTGCTC	HQ 201305.1
β-actina	CCCTGGCTCCTAGCACCA T	GAGCCACCAATCCACACAGA	NM_031144.3

Fonte: XAVIER *et al.*, 2013.

5.5.6.3 PCR em Tempo Real (qPCR)

A qPCR foi realizada no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems®), com a seguinte programação: ativação da enzima Taq DNA polimerase por 5 min a 94°C, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 60°C e extensão a 72°C por 30 s, com a coleta dos dados de fluorescência a cada ciclo. A eficiência de amplificação da PCR foi calculada a partir da inclinação da reta (*slope*) da equação de regressão linear obtidos pelo software de análise, de acordo com a seguinte equação: $E = 10^{(-1/slope)}$. Os dados de expressão gênica, representativos das três repetições biológicas independentes para cada tratamento, foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas a 5% de probabilidade. Todas as reações foram realizadas em duplicata e com normalização pelo fluoróforo de *threshold*. Os valores de CT foram normalizados pelo nível de expressão de β -actina.

Este é um método sensível e rápido, que permite o registro e quantificação da acumulação de amplicons ao longo da PCR. Como sonda utilizou-se o SYBR Green, uma sonda fluorescente que se liga inespecificamente ao DNA de dupla cadeia. A especificidade do produto de PCR pode ser efetuada por análise de curva de melting e a quantificação do alvo por comparação com os níveis de fluorescência obtidos a partir de um alvo controle. Foram realizados dois ensaios independentes, cada um correspondente a distintas extrações de RNA efetuadas em simultâneo para as concentrações em estudo (0 nM, 5 nM, 10 nM e 15 nM). A especificidade dos *primers* foi verificada em uma reação de PCR convencional inicial. Para avaliar a eficiência dos protocolos das reações de PCR em tempo real criaram-se curvas padrão a partir de diluições das amostras de cDNA.

5.5.7 Imunohistoquímica para detecção da proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (IBA-1).

A imunohistoquímica para IBA-1 α , foi realizada utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). Os tecidos foram desidratados em álcool sendo, então, incluídas em parafina. Após este procedimento, foram feitos cortes seriados de 4 μ m em micrótomo apropriado

e colocados em lâminas de L-polilisina, apropriadas para a realização de imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0), sob aquecimento em banho maria, por 20 minutos para a recuperação antigênica a 65 °C. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (20 minutos). Em seguida foi feito bloqueio de proteína com BSA 5% (albumina bovina) por 40 minutos. Os cortes foram incubados *overnight* com anticorpo primário de cabra anti-IBA1(ABICAN[®]) diluído 1:100, diluído em *antibody* diluente, de acordo com as instruções do fabricante. Após a lavagem em PBS, foi feita a incubação com secundário (de detecção) biotilado IgG cabra diluído 1:400 (Santa Cruz[®]), por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estreptoavidina peroxidase conjugada (complexo ABC Santa Cruz[®]) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3'diaminobenzidine- peróxido (DAB), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5%.

Figura 8. Representação da metodologia realizada na imunohistoquímica



Fonte: Laboratório de Histologia – UFC. Acervo da autora, 2015

5.5.8 Análise histopatológica do fígado

Para a realização da análise histopatológica, as amostras de fígado foram fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas e armazenadas em álcool 70%. Os fragmentos foram desidratados em banhos de concentrações progressivas de álcool, de modo a substituir a água pelo álcool absoluto. Posteriormente foi feita a diafanização, com banho em xilol, para promover clarificação e substituição do álcool por um solvente miscível com a parafina. Por fim, foi feita a inclusão em parafina, corte em micrótomo e montagem das lâminas. A parafina foi retirada com o uso do xilol que, por sua vez, foi substituído por álcool em concentrações decrescentes, e por último, o tecido foi reidratado e corado em hematoxilina-eosina (H&E), sendo devidamente posicionado em lâmina com lamínula sobreposta. A H&E permite completa análise estrutural do parênquima e estroma hepáticos e dos infiltrados inflamatórios.

Para avaliar se a desnutrição crônica induzida pela DBR pode induzir alterações de EHNA, foram empregados os critérios de grau e estágio propostos por Brunt et al. (1996) e pelo *Pathology Subcommittee of the NASH Clinical Research Network* (KLEINER et al., 2005).

O grau da esteatose hepática foi avaliada e classificada, semiquantitativamente, através do percentual do parênquima envolvido, em: grau 1 (presença de depósitos de 5-33%); grau 2 (presença de depósitos entre 33 e 66%); e grau 3 (presença de depósitos > de 66%), ver quadro abaixo:

Tabela 5: Escore histopatológico do grau de comprometimento do parênquima hepático.

Grau	Comprometimento do parênquima
0	Ausente até 5%
1	Leve (5%-33%)
2	Moderada (>33%-66%)
3	Severa (>66%)

Fonte: Adaptada pela autora de KLEINER et al. (2005)

O grau de inflamação lobular foi avaliado através da detecção de focos inflamatórios (observados em aumento de 200X), seguindo os seguintes escores: escore 0, sem focos; escore 1, <2 focos; escore 2, 2 a 4 focos; escore 3, >4 focos.

O balonismo hepatocelular foi avaliado pelos seguintes escores: escore 0, nenhum; escore 1, poucas células balonizadas; escore 2, muitas células balonizadas/balonização proeminente. As análises foram realizadas por um patologista experiente, sem conhecimento prévio de qual grupo pertenciam as lâminas analisadas.

6 Análise estatística

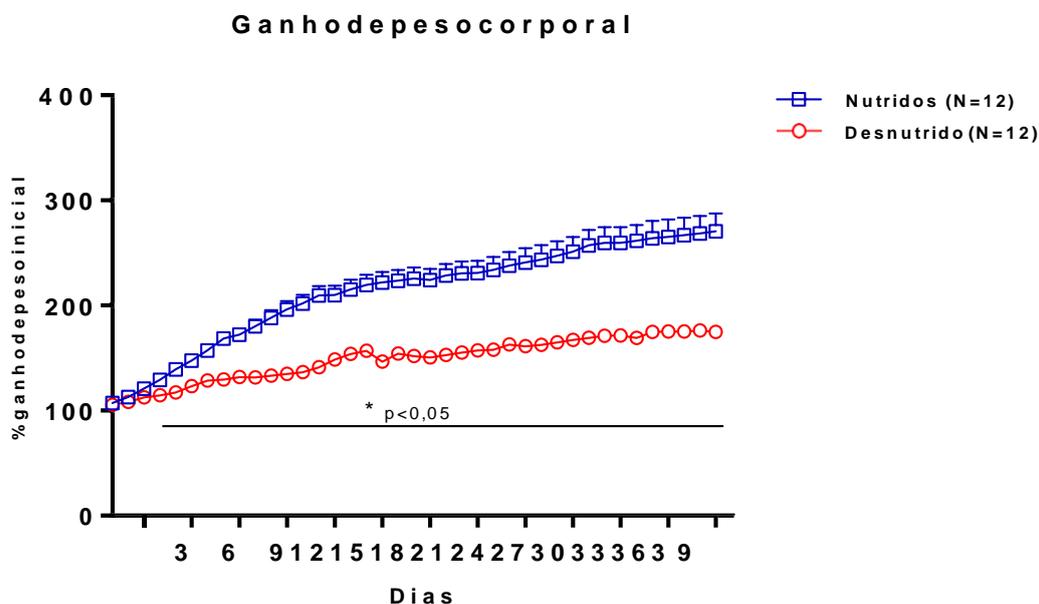
Os resultados foram expressos como média \pm SEM. O teste *t* de Student não pareado foi utilizado. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as medianas no escore histopatológico. O valor de $p < 0,05$ foi usado para indicar diferenças significativas.

7. RESULTADOS

7.1. Ganho de peso corporal

A DBR induziu uma redução do ganho de peso corporal (não houve perda de peso significativa, mas redução da velocidade do ganho de peso), quando comparado ao grupo normonutrido controle ($p < 0,05$), já a partir do quarto dia de dieta (25 dias de vida) nos camundongos alimentados com a DBR e por todo o período do protocolo experimental. Dessa forma, a DBR induziu uma desnutrição crônica nos animais (**Figura 9**).

Figura 9– Gráfico de percentual de ganho de peso ponderal em camundongos C57BL6J, alimentados *ad libitum*, durante quarenta dias. Os resultados são expressos em Média \pm EPM. As análises foram feitas utilizando o test *t* de Student.



7.2. Escore histopatológico

Na análise histopatológica, não foi observado diferença estatística significativa nos parâmetros analisados (marcadores de esteatose, balonização do hepatócito e inflamação) entre os grupos experimentais estudados, ver **figura 10**.

Figura 10: Escores histopatológicos do fígado de camundongos C57BL6J, alimentados *ad libitum*, durante quarenta dias com a dieta padrão e DBR.

Grupos	N	Escore			
		Esteatose		Inflamação	Balonização
		Macrovesicular	Microvesicular		
Nutrido	3	0 (0)	0 (0-1)	1 (0-1)	1 (1)
Desnutrido	6	0 (0-1)	2 (0-3)	0,5 (0-3)	1 (1-2)

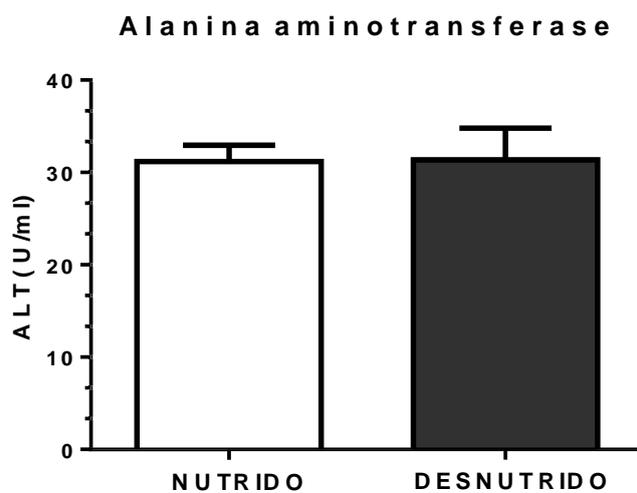
Teste de Mann-Whitney

Dados expressos em mediana (valor máximo e mínimo).

7.3. Análise sérica da alanina aminotransferase (ALT)

Não foi encontrada diferença estatística nos níveis séricos de ALT nos grupos experimentais (**Figura 11**).

Figura 11: Análise sérica dos níveis alanina aminotransferase (ALT) nos grupos experimentais. Os resultados são expressos em Média \pm EPM. As análises foram feitas utilizando o test *t* de Student e one-way ANOVA.

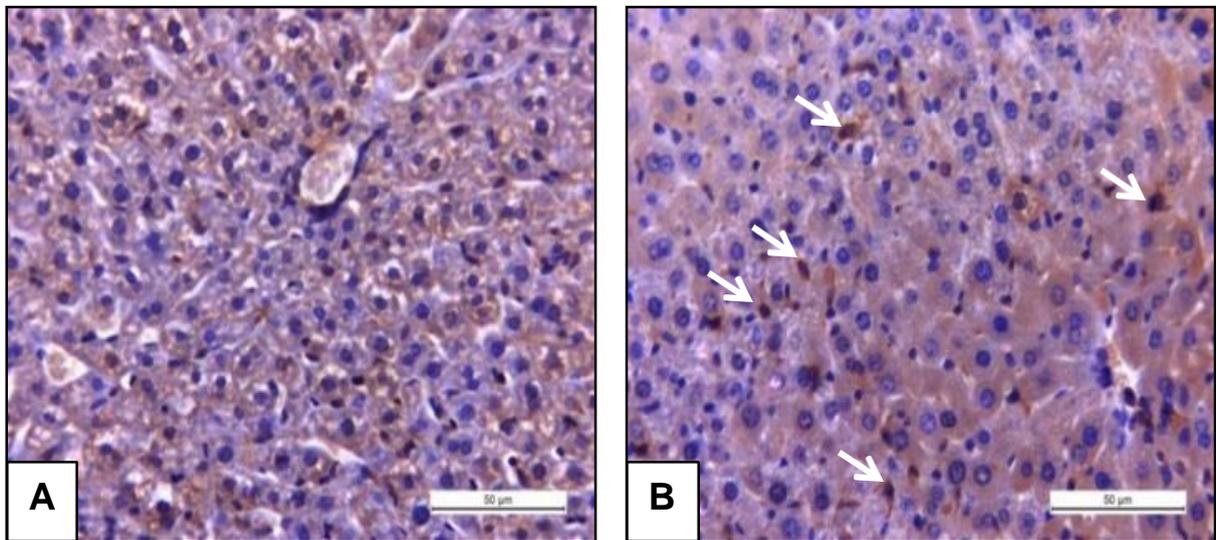


7.4. Imunomarcção para proteína adaptadora de cálcio ionizado-1 (IBA-1) e contagem de células IBA-1-positivas.

Nos cortes histológicos de lâminas imunomarcadas para IBA-1, observamos que as células de Kupffer (macrófagos do fígado) foram bem marcadas, especialmente no grupo desnutrido (vistas com marcação marrom nessas células), (**Figura 12**).

Na contagem de células de Kupffer IBA-1-positivas por campo no fígado, identificamos um aumento do número dessas células no grupo desnutrido ($p < 0,001$), (**Figura 13**).

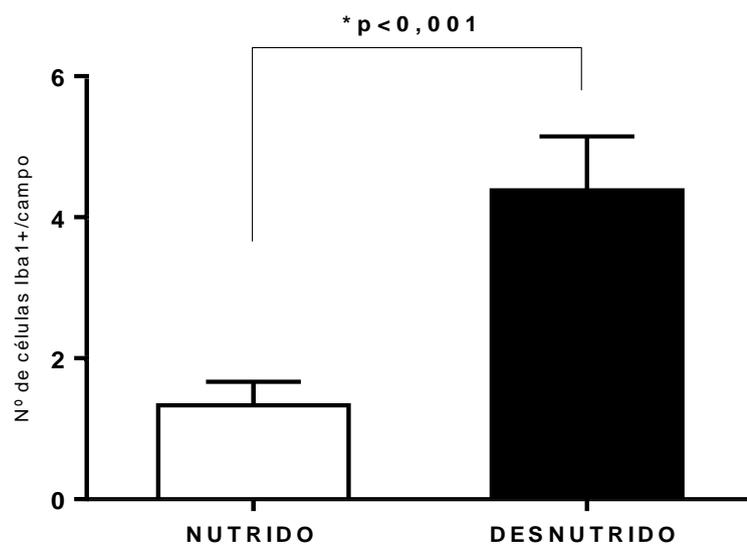
Figura 12. Imunomarcção para proteína adaptadora de cálcio ionizado-1 (IBA-1).



A= grupo nutrido; B=grupo desnutrido

As setas indicam células marcadas pelo IBA-1 no grupo desnutrido.

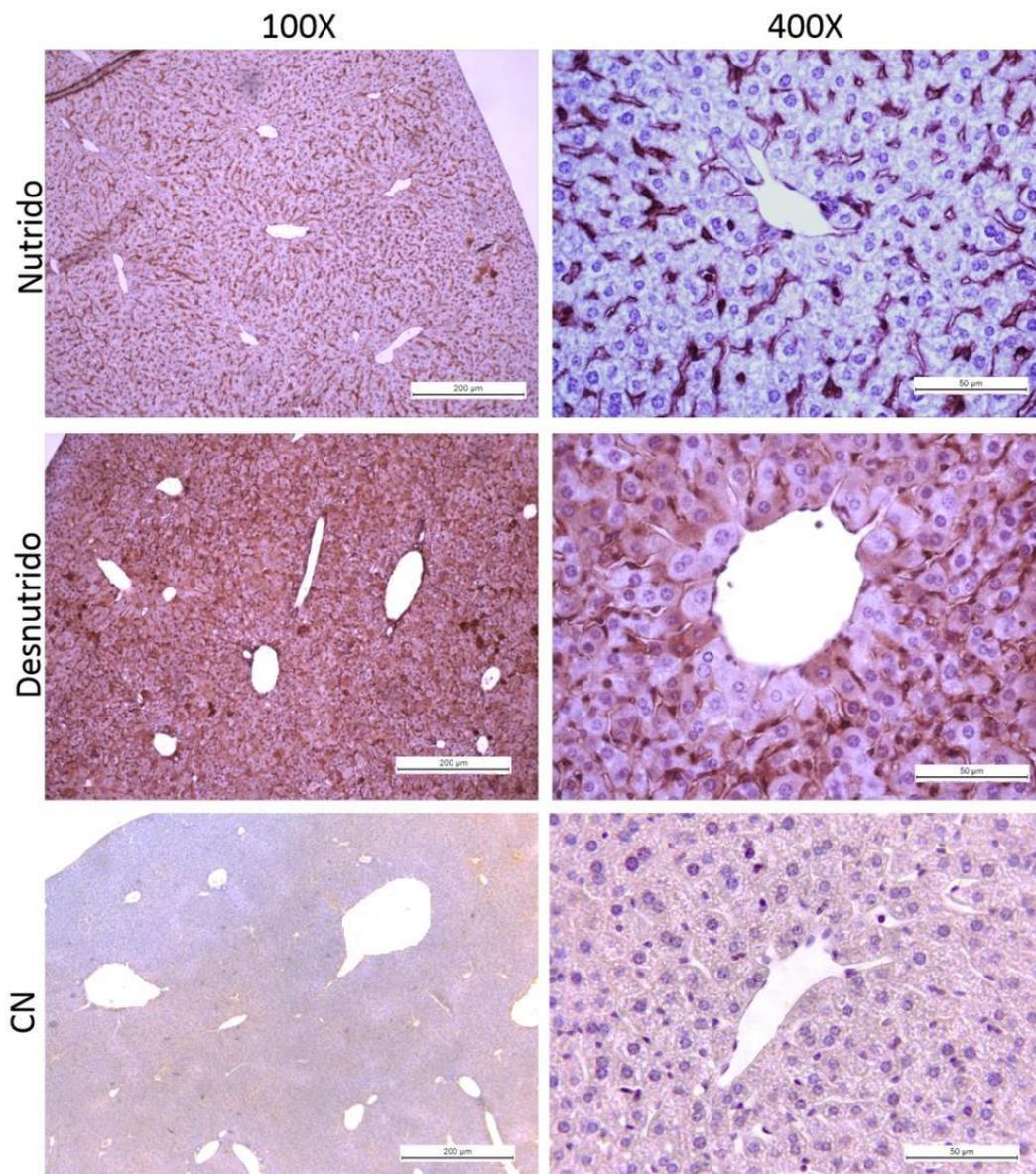
Figura 13. Contagem de células de Kupffer positivas para proteína adaptadora de cálcio ionizado-1 (IBA-1) no tecido hepático. Os resultados são expressos em Média \pm EPM. N=6 para cada grupo. As análises foram feitas utilizando o test *t* de Student.



7.5. Imunomarcção para Interleucina 1- β (IL-1 β)

Uma maior imunomarcção de IL-1 β foi observada no fígado dos animais que receberam a DBR quando comparado com o grupo nutrido controle. Ocorreu uma maior imunomarcção no parênquima hepático, incluindo os hepatócitos (**Figura 14**).

Figura 14: Painel representativo da imunomarcção de IL-1 β no tecido hepático dos grupos experimentais em pequeno (X100) e grande aumento (X400).

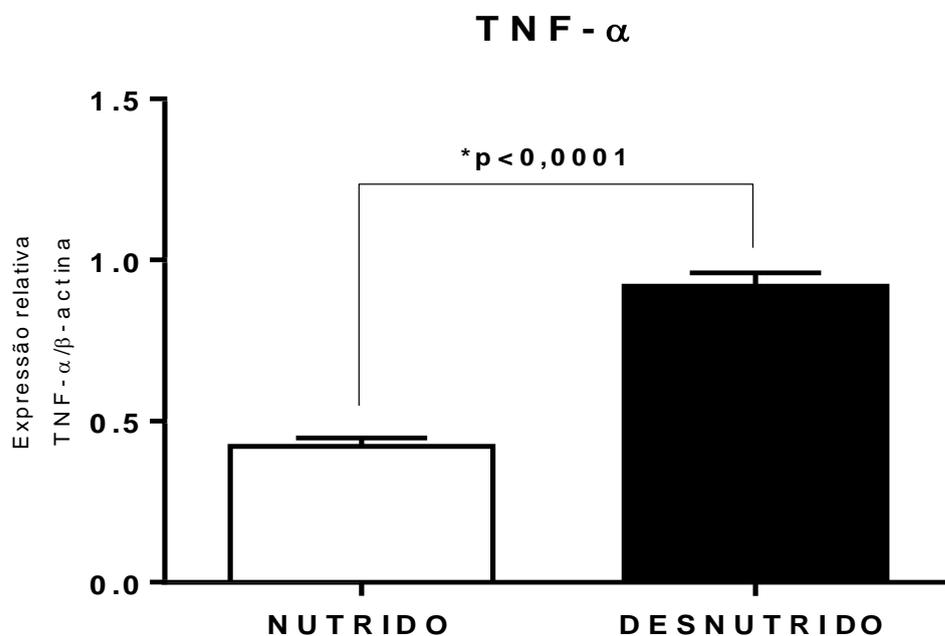


CN= controle negativo (sem o anticorpo primário)

7.6 Análise de marcadores inflamatórios pela atividade de transcrição do RNAm para TNF- α e IL-10 por qRT-PCR

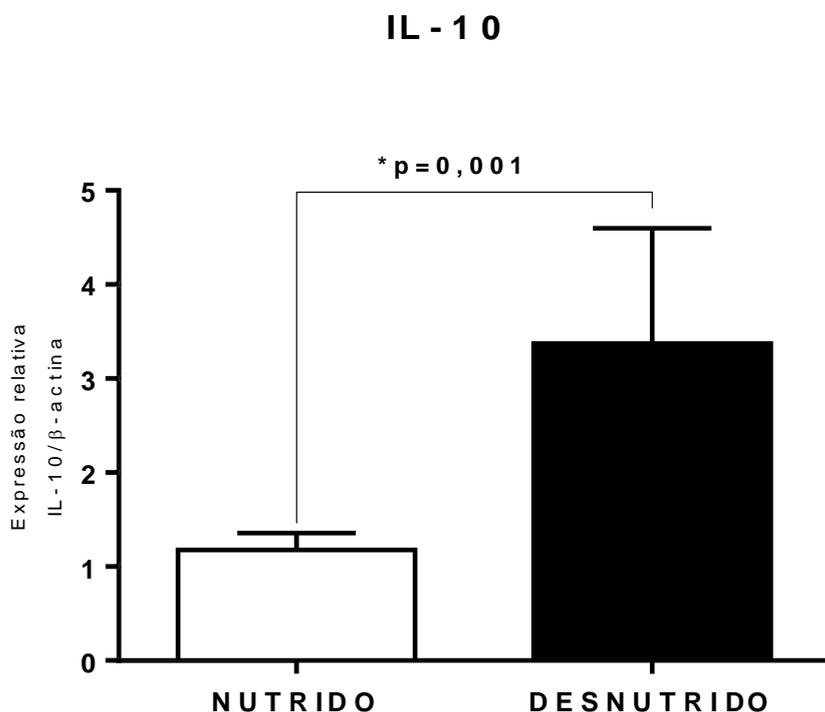
A dieta crônica com DBR causou aumento marcante nos níveis do transcrito para TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, quando comparado ao grupo que recebeu a dieta padrão (grupo nutrido) ($p < 0,0001$) (**Figura 15**).

Figura 15: Análise de qRt-PCR para TNF- α usando β -actina como referência. As análises foram realizadas utilizando-se o teste t de Student. Os resultados são expressos em Média \pm EPM. N=6 para cada grupo.



A dieta crônica com DBR causou aumento significativo nos níveis do transcrito para IL-10, uma citocina anti-inflamatória, quando comparado ao grupo que recebeu a dieta padrão (grupo nutrido) ($p=0,001$) (**Figura 16**).

Figura 16: Análise de qRt-PCR para IL-10 usando β -actina como referência. As análises foram realizadas utilizando-se o teste t de Student. Os resultados são expressos em Média \pm EPM. N=6 para cada grupo.



7.7 Análise do transporte reverso do colesterol pela atividade de transcrição do RNAm para APOA, APOE e LCAT por qRt-PCR

Em relação à análise dos componentes do transporte reverso do colesterol por qRt-PCR, foi observado um aumento da expressão de APOA no grupo desnutrido quando comparado ao grupo nutrido ($p=0,04$) (**Figura 17**). A proteína ribossomal RPLP0, foi utilizada como referência. Ao analisarmos APOE (**Figura 18**) e LCAT (**Figura 19**), não foram observadas alterações na expressão do RNAm desses marcadores.

Figura 17: Análise de qRt-PCR para APOA usando RPLP0 proteína ribossomal como referência. As análises foram realizadas utilizando-se o teste *t* de Student. Os resultados são expressos em Média \pm EPM. N=6 para cada grupo.

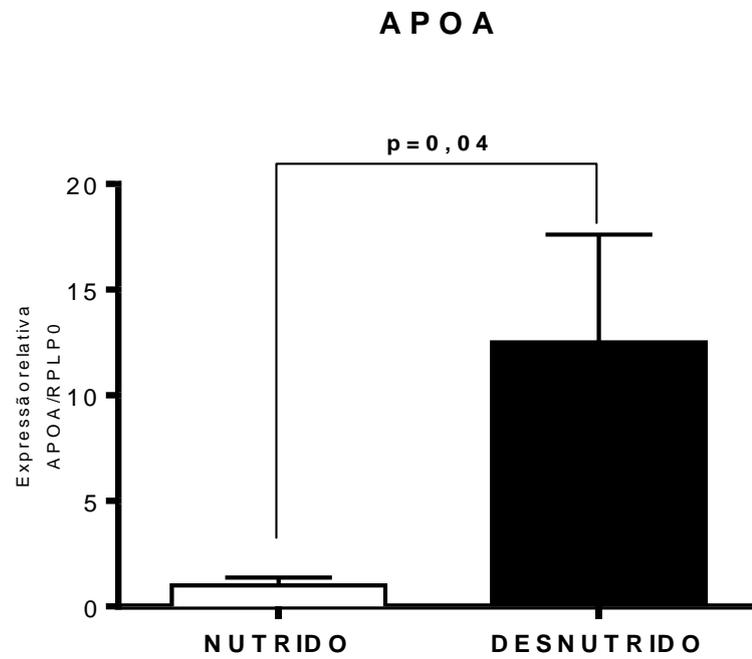


Figura 18: Análise de qRt-PCR para APOE usando RPLP0 proteína ribossomal como referência. As análises foram realizadas utilizando-se o teste *t* de Student. Os resultados são expressos em Média \pm EPM. N=6 para cada grupo.

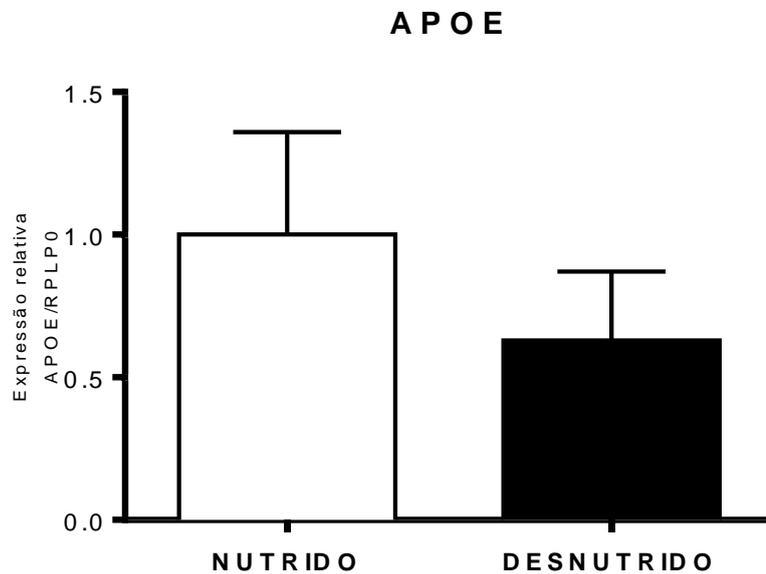
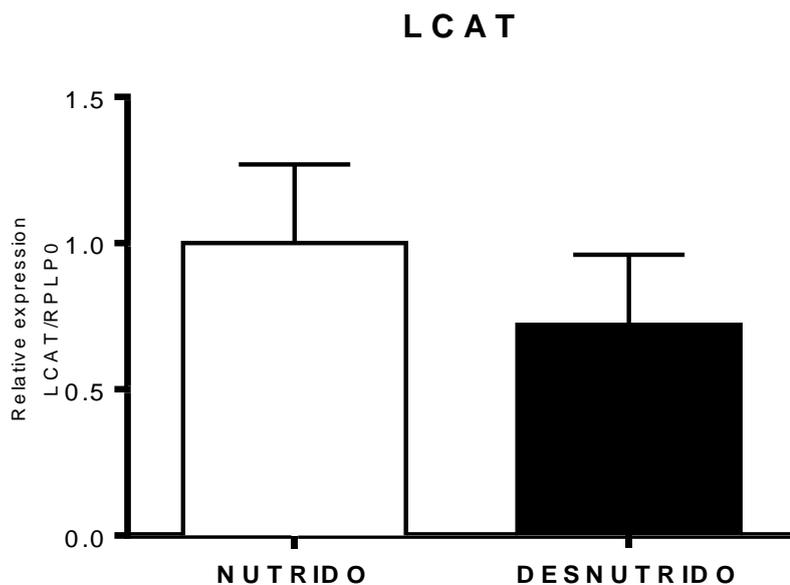


Figura 19: Análise de qRt-PCR para ApoE usando RPLP0 proteína ribossomal como referência. As análises foram realizadas utilizando-se o teste *t* de Student. Os resultados são expressos em Média \pm EPM. N=6 para cada grupo.



8. DISCUSSÃO

Na literatura vários métodos de desnutrição são descritos. Dentre os mais utilizados podemos citar: a restrição alimentar pelo afastamento da mãe durante o período de lactação (CASTRO *et al.*, 2012, FLORIAN, NUNES, 2011), o ajuste do tamanho da ninhada (LADD *et al.*, 2010), a indução da desnutrição através do uso de dietas hipoproteicas (SOUZA *et al.*, 2009). Independente da técnica utilizada, a desnutrição crônica em geral induz a um déficit do ganho do peso corporal.

A Dieta Básica Regional (DBR) elaborada após inquérito de frequência de consumo alimentar, realizada pelo setor de Nutrição Humana da Universidade Federal de Pernambuco (TEODÓSIO *et al.*, 1990), tem sido utilizada na avaliação do efeito da desnutrição intra-uterina na progressão da resposta inflamatória aguda e subcrônica (BARRETO *et al.*, 2012) e para verificar o efeito da desnutrição no perfil de ácidos graxos do leite materno e no crescimento e desenvolvimento de ratos jovens (SOUZA *et al.*, 2019). Embora a DBR tenha sido utilizada em vários trabalhos, nenhum destes pesquisou as possíveis alterações que esta dieta pode ocasionar no fígado.

Em nosso estudo foi observado uma redução significativa do ganho de peso corporal nos animais submetidos à Dieta Básica Regional a partir do 4º dia de consumo, sustentando um déficit de ganho de peso, quando comparado ao grupo normonutrido. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por de Queiroz (2014), que induziu desnutrição em ratos Wistar com a DBR por 14 dias, pós-desmame. De Queiroz e col. identificaram uma redução significativa do ganho de peso já no terceiro dia nos animais recebendo a DBR quando comparado com o controle nutrido. No trabalho de de Queiroz, a suplementação com zinco (500 mg/L) na água de beber não foi suficiente para melhorar o ganho de peso dos animais desnutridos (de QUEIROZ *et al.*, 2014).

Em outro trabalho utilizando a DBR foram pesquisadas fêmeas de camundongos C57BL6J, lactantes. Após 21 dias de nascidos, os filhotes destas fêmeas foram desmamados e inseridos na mesma dieta administrada

ao grupo das fêmeas que os amamentaram. Assim, observou-se que filhotes desmamados das fêmeas do grupo DBR, mantiveram-se abaixo do peso e atrofiados em relação aos controles nutridos, fato que foi observado até a morte destes (UENO *et al.*, 2011).

Pessoa e col. (2005) avaliaram em 159 ratos Sprague Dawley, os efeitos cumulativos da DBR sobre o crescimento corporal e o desenvolvimento de órgãos em três gerações sucessivas destes animais. Neste estudo constatou-se redução acentuada do ganho de peso e comprometimento de órgãos nos grupos de gerações submetidos à desnutrição hipoproteica (PESSOA *et al.*, 2005).

O trabalho de Preides e col. (2014) identificou alterações metabólicas importantes em camundongos desnutridos, submetidos à separação materna neonatal (portanto com desnutrição calórico-proteica devido à restrição de leite), incluindo evidência de catabolismo do tecido muscular e adiposo, além de alterações hepáticas e biliares, anomalias do metabolismo do ácido biliar, estresse oxidativo e inflamação (PREIDES *et al.*, 2014). Achados que suportam que desnutrição pode levar a importantes alterações da função hepática.

Estudos correlacionam elevação moderada de níveis da TGO/TGP à injúria hepática (CARVALHEIRA *et al.*, 2006). Em nosso estudo a dosagem de TGP não se mostrou alterada. No trabalho de Burlamaque e col. que induziu a esteatose em ratos Wistar, foi observado que, embora o fígado tenha sido submetido a uma situação possivelmente indutora de inflamação, em animais que apresentaram esteatose ao tratamento, não foram observadas alterações dos níveis de TGO/TGP (BURLAMAQUE *et al.*, 2011). Possivelmente em nosso estudo, bem como no estudo de Burlamaque, a inflamação não foi severa o suficiente para alterar este parâmetro.

Na análise da imunomarcação de células IBA-1 positivas, observamos que as células de Kupffer mostraram-se bem marcadas no grupo desnutrido. Foi observado também, um maior número na contagem de células de Kupffer-

IBA-1 positivas neste grupo quando comparado ao grupo controle nutrido, sugerindo a participação dessas células no quadro inflamatório.

Durante a DEP há estímulo constante do sistema imunológico em decorrência da perda da integridade da barreira epitelial intestinal podendo ocasionar translocação bacteriana, levando à produção de citocinas inflamatórias, dentre elas TNF- α , IL-1 β e IL-6, as quais atuam para inibir a expressão de IGF-1 no músculo esquelético e no fígado. Este mecanismo ainda não está completamente explicado na literatura (BROUSSARD et al., 2003; COONEY; SHUMATE, 2006).

Identificamos uma maior imunomarcagem de IL-1 β no fígado dos animais que receberam a DBR quando comparado com o grupo nutrido controle. Ocorreu uma maior imunomarcagem no parênquima hepático, incluindo os hepatócitos. No trabalho de de Queiroz, a DBR induziu o aumento dos níveis teciduais no jejuno de TNF- α , IL-1 β e IL-10, quando comparado ao grupo nutrido. A suplementação de zinco foi capaz de reduzir os níveis de TNF- α e IL-10, mas não IL-1 β quando comparado com o grupo desnutrido com DBR sem tratamento com zinco (de QUEIROZ *et al*, 2014). No trabalho de Fock e col. (2007), camundongos machos com 60 dias de vida, desafiados com dieta hipoproteica (dieta a 4% em comparação a dieta padrão a 20%) e desafiados com LPS, apresentaram menor síntese de IL-1 (FOCK *et al.*, 2007).

Ferreira e col., (2011), realizaram estudo utilizando ratos Swiss machos, com idades de 7 e 8 semanas, os quais foram alimentados com dieta com alto teor de carboidratos (64% de carboidratos, 19% de proteína e 11% de gordura), ou dieta hipercolesterolêmica (45% de carboidratos, 17% de proteína e 38% de gordura), os quais foram comparados com o grupo controle alimentado com a dieta padrão. A dieta rica em carboidratos foi capaz de aumentar o nível de TNF- α no fígado. Achado que se assemelha ao encontrado em nosso estudo, onde a DBR, dieta que apresenta teor elevado de carboidratos (70,6%), em comparação a ração padrão (56%), foi capaz de aumentar a expressão do RNAm de TNF- α no fígado dos animais que receberam DBR, sugerindo uma

maior produção desta citocina nos animais submetidos a dieta com teor elevado de carboidratos também em nosso estudo.

O TNF- α é uma citocina produzida, principalmente, por macrófagos, no fígado, as células de Kupffer são macrófagos residentes (BORGES *et al.*, 2008; CLAUSS *et al.*, 2001; SPRAGUE & KHALIL, 2009; MANKAN *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2014). A maior expressão de TNF- α no fígado dos animais que receberam DBR (animais apresentando desnutrição), provavelmente correlaciona-se com o número aumentado de células de Kupffer neste grupo, demonstradas por maior número na contagem de células hepáticas IBA-1 positivas e maior marcação com IBA-1, evidenciando a ativação destas células na produção de TNF- α no quadro de DEP.

Giovambattista e col.,(2005) observaram níveis séricos de TNF- α aumentados em crianças com desnutrição energético-proteica quando comparado com crianças nutridas. Não foi encontrado aumento dos níveis de corticotrofina plasmática e cortisol sérico nas crianças desnutridas. Outro estudo que evidenciou este achado foi o realizado por Dewan e col. (2009) o qual avaliou o perfil imune de oitenta crianças, com idade de um a cinco anos que apresentavam quadro de desnutrição desde moderada até desnutrição severa. Nestas crianças os níveis séricos das citocinas TNF- α e IL-10 estavam aumentados (DEWAN *et al.*, 2009).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória importante na regulação da resposta inflamatória, isso se dá por meio de vários mecanismos, dentre eles: a diminuição da secreção de IL-2 pelas células T, redução da expressão do antígeno de leucócito humano II (HLA classe II) e a redução de IL-1 β , TNF- α e IL-8 pelos monócitos e macrófagos que são ativados durante a inflamação (LEIJA *et al.*, 2007).

Em um estudo com camundongos recém-desmamados que receberam dieta hipoproteica a 0,6%, foram observados níveis elevados de IL-10 no soro, quando comparado aos controles (dias 3 e 14 do protocolo experimental). Os níveis séricos de IL-10 foram mantidos nos grupos desnutridos, apesar do

fornecimento inadequado de nutrientes, fato observado mesmo durante a progressão da perda de peso (MONK *et al.*, 2009).

Em nosso estudo, no grupo DBR (desnutrido) houve um aumento da expressão do RNAm da IL-10, uma citocina anti-inflamatória, ao mesmo tempo em que houve também um aumento do RNAm de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória. Sabe-se que as citocinas possuem a capacidade de autorregulação, as interleucinas IL-10 e IL-4 quando produzidas em resposta as citocinas pró-inflamatórias podem suprimir a produção de outras citocinas pró-inflamatórias. Fato observado quando ocorre uma resposta excessiva de citocinas pró-inflamatórias (Síndrome da resposta inflamatória sistêmica – SIRS) esta é ajustada pela Síndrome de resposta anti-inflamatória compensatória (CARS) levando a um aumento da produção de IL-10 e IL-4 (MOSMANN *et al.*, 1986; MAYATEPEK *et al.*, 1993). Esta dinâmica compensatória na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias pode explicar nossos achados, onde houve aumento expressivo do RNAm da IL-10 e de TNF- α no grupo DBR desnutrido.

Estudos citam relações entre a desnutrição e as concentrações de colesterol e suas frações, triglicérides e metabolismo de lipídeos no *kwashiorkor* (FLORES *et al.*, 1970), no entanto, poucos estudos descrevem a relação das apolipoproteínas na DEP. Dentre os estudos que realizaram este enfoque podemos citar o de Feillet *et al.*, (1993) o qual avaliou alguns índices de lipídios plasmáticos, incluindo colesterol total, HDL, e LDL; triglicerídeos; e as apolipoproteínas A-I, A-II, B, C-III, e E, bem como partículas de lipoproteínas contendo apoAI, ApoAI e A-II (Lp AI: A-II), em 39 crianças no norte da Mauritania, com idades entre 9 a 44 meses, apresentando quadro de Marasmo e comparadas com crianças normonutridas.

No estudo de Feillet *et al.*, (1993), foi observado que não houve diminuição da apoAI, o que concorda com a capacidade de absorção preferencial do colesterol no presente grupo. Ao fazer um comparativo apoAI / apoA-II não diferiram entre os indivíduos do grupo controle, mas apoAI / Lp AI: A-II (AI- AII: fração de HDL) foi significativamente maior nas crianças

apresentando marasmo do que em indivíduos do grupo controle ($P < 0,01$). Estudos relatam que a proporção apoA-I é de aproximadamente 50% nas HDL A-I e HDL A-I/A-II (SEGREST, 2000; WANG, 2004). Em nosso estudo evidenciou-se uma maior expressão do RNAm de apoA-I no grupo desnutrido quando comparado ao grupo controle, sugerindo uma mobilização do colesterol dos tecidos para o fígado. Acreditamos que novos estudos onde seja realizado a concentração de HDL poderiam elucidar melhor este achado.

A LCAT é a enzima responsável pela esterificação do colesterol livre captado pela HDL, tendo sua atividade regulada por apoA-I. Os mecanismos que regulam a sua transcrição gênica ainda não estão bem descritos na literatura, (NG, 2004; STAELS *et al.*, 1992), possibilitando apenas especular se os fatores que levaram ao aumento da transcrição de apoA no grupo desnutrido de nosso estudo, a longo prazo, também poderiam levar ao aumento da expressão de LCAT.

Lamry e col. (1995), estudaram os efeitos de dietas hipoproteicas na composição da HDL e sua correlação com a atividade da LCAT em ratos durante o período de crescimento. Neste estudo foram utilizadas duas dietas hipoproteicas diferentes, uma contendo 2% de caseína e outra com 5% de glúten, administradas durante 28 dias, seguido pela realimentação de uma dieta equilibrada, contendo 15% de caseína durante 14 dias. O grupo controle foi alimentado com a dieta equilibrada durante 42 dias. Foi observado que o consumo de ambas as dietas hipoproteicas diminuíram a atividade da LCAT. No final do período de desnutrição, a atividade da LCAT foi de apenas 22% (no grupo caseína) e 13% (no glúten), após três dias de reinserção da dieta normoproteica, os valores de ambos os grupos retornou ao parâmetro similar aos valores do grupo controle. Apesar da redução na atividade da LCAT nos grupos de dietas com depleção de proteínas, o metabolismo da HDL não foi prejudicado de forma significativa. Os autores atribuíram que possivelmente este achado poderia ser, em parte, devido à manutenção dos níveis de ApoA-I. A atividade de LCAT reduzida poderia também, ser atribuída à redução da síntese da LCAT no fígado durante o protocolo de ambas as dietas com depleção de proteína (LAMRY *et al.*, 1995).

9. CONCLUSÃO

- No presente estudo observou-se que a DBR uma dieta hipoproteica, administrada por 40 dias, causou uma redução do ganho de peso corporal, a partir do 4º dia de experimento, nos animais do grupo DBR em comparação ao grupo normonutrido, fato que perdurou durante todo o percurso do protocolo. Assim, conclui-se que neste protocolo com a DBR os animais desenvolveram um quadro de desnutrição.
- A análise da imunohistoquímica para a proteína adaptadora do cálcio ionizado-1 (IBA-1), um marcador de macrófagos, observou-se maior imunomarcação, bem como maior quantitativo de células IBA-1 positivas no grupo desnutrido- DBR.
- A análise da imunohistoquímica da citocina $1L-\beta$ demonstrou maior imunomarcação de $IL-1\beta$ no fígado dos animais que receberam a DBR, quando comparado com o grupo nutrido controle. Ocorreu uma maior imunomarcação no parênquima hepático, evidenciando um quadro inflamatório neste grupo.
- Foi observado no grupo desnutrido-DBR um aumento da expressão da citocina pró-inflamatória $TNF-\alpha$ e também da citocina $IL-10$ (anti-inflamatória), indicando a presença de um quadro inflamatório no fígado.
- No presente estudo ao analisarmos a expressão de alguns dos componentes envolvidos no transporte reverso do colesterol (LCAT, ApoA-I e ApoE), observamos uma maior expressão do RNAm da ApoA-I, no grupo DBR-desnutrido, sugerindo que a desnutrição em decorrência da ingestão da DBR pode levar algum grau de alteração do metabolismo do colesterol.
- Esse estudo sugere que a alteração observada no transcrito de ApoA-I pode ter sido induzida pelo processo inflamatório, afetando o metabolismo reverso do colesterol, que pode ter implicações para doenças cardiovasculares.

REFERÊNCIAS

AIKEN, A. M.; MTURI, N.; NJUGUNA, P.; MOHAMMED, S.; BERKLEY, J. A. Risk and causes of paediatric hospital-acquired bacteraemia in Kilifi District Hospital, Kenya: a prospective cohort study. **Lancet**. 378: 2021–2027, 2011.

ALMEIDA, S. S.; TONKISS, J.; GALLER, J. R. Malnutrition and Reactivity to Drugs Acting in the Central Nervous System. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 20, n. 3, p. 389–402, jan. 1996.

ALVES, V.A.F. & MELLO, E.S. (2006). Fígado e sais biliares 731-791.

ARAÚJO-FILHO, J.L.S.; DE MELO-JÚNIOR, M.R.; VEIGA, R. K. A.; MARCOS, C.F.P.M.; PATU, V.J.R.M.; DE PONTES-FILHO, N.T. Análise histomorfométrica do coração de ratos expostos indiretamente ao etanol e à desnutrição crônica durante o período perinatal. **R Cien. Méd. Biol.** Salvador, v.6, n.1., p17-25, jan/abr., 2007.

BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cad Saúde Pública**;19 (sup 1): S181-S191, 2003.

BARRETO, R.R.; FRANCO, E.S.; BRASILEIRO, C.F.; DE OLIVEIRA, A.P.; DIMECH, G.S.; MALTA, D.J.; CAZUZO, J.S.; LEITE, A.C.; DA SILVA, T.G.; MAIA, M.B. Early undernutrition is associated with attenuated inflammatory response and alteration in pharmacological efficacy of indomethacin in rats. **Eur. J. Pharm. Sci.**, V. 46, p. 56-63, 2012.

BARATTA, J.L.; NGO, A.; LOPEZ, B.; KASABWALLA, A.; LONGMUIR, K.J. & ROBERTSON, R.T. Cellular organization of normal mouse liver: a histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis. **Histochem Cell Biol** 131:713– 726., 2009.

BARROS, K.M.F.T.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; DE SOUZA, S.L.; MATOS, R.J.B.; DEIRO, T.C.B.; CABRAL-FILHO, J.; CANON, F. A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. **Nutritional neurosciences**, Feb/ Apr., 99-104, 2006.

BLACK, R.E.; VICTORA, C.G.; WALKER, S.P.; BHUTTA, Z.A.; CHRISTIAN, P. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. **Lancet**. 382: 427–451, 2013.

BROUSSARD, S. R. *et al.* Cytokine-hormone interactions: tumor necrosis factor alpha impairs biologic activity and downstream activation signals of the insulin-like growth factor I receptor in myoblasts. **Endocrinology**, v. 144, n. 7, p. 2988–96, jul. 2003.

CASTRO, I.C.; OLIVEIRA, B.B.; SLOWIKOWSKI, J.J.; COUTINHO, B.P.; SIQUEIRA, F.J.; COSTA, L.B.; SEVILLEJA, J.E.; ALMEIDA, C.A.; LIMA, A.A.; WARREN, C.A.; ORIA, R.B.; GUERRANT, R.L. Arginine decreases *Cryptosporidium parvum* infection in undernourished suckling mice involving nitric oxide synthase and arginase. **Nutrition**, v. 28, p. 678-685, 2012.

CAULFIELD, L.E.; DE ONIS, M.; BLOSSNER, M.; BLACK, R.E. Undernutrition as an underlying cause of child deaths associated with diarrhea, pneumonia, malaria, and measles. **Am J Clin Nutr**. 80(1):193–8. 2004.

CARVALHEIRA, J.B.; SAAD, M.J. Insulin resistance/hyperinsulinemia diseases not included in the metabolic syndrome. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. Apr; 50(2):360-7. May, 2006.

CARRAZZA, F. R.; MARCONDES, E. Desnutrição energético-protéica. In: **Nutrição clínica em pediatria**. São Paulo-SP: Sarvier. p. 265–287, 1991.

CHARLTON-MENYS, V.; DURRINGTON, P.N. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. **Exp. Physiol**, v.93, p.27-4257, 2008.

CHUANG, K.I.; LEUNG, B.; HSU, N.; HARRIS, H.W. Heparin protects against septic mortality via apoE-antagonism. **Am. J. Surg.**, v.202, p.325-335, 2011.

CLAUSS, M; SUNDERKÖTTER, C; SVEINBJÖRNSSON, B; HIPPENSTIEL, S; WILLUWEIT, A; MARINO, M. A permissive role for tumor necrosis factor in vascular endothelial growth factor-induced vascular permeability. **Blood**;97:1321–9, 2001.

DE QUEIROZ, C.A.; FONSECA, S.G.; FROTA, P.B.; FIGUEIREDO, I.L.; ARAGÃO, K.S.;MAGALHÃES; DE CARVALHO, C. B.; LIMA, A. A.; RIBEIRO R.A.; GUERRANT, R.L.; MOORE, S.R.; ORIÁ, R.B. Zinc treatment ameliorates diarrhea and intestinal inflammation in undernourished rats. **BMC Gastroenterol.** 5;14:136. doi: 10.1186/1471-230X-14-136. Aug., 2014.

DE-ANDRADE, F.M.; LARRANDABURU, M.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; GASTALDO, G.; HUTZ, M.H. Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, p.529-537, 2000.

DEWAN, P.; KAUR, I.R.; FARIDI, M.M.; AGARWAL, K.N. Cytokine response to dietary rehabilitation with curd (Indian dahi) & leaf protein concentrate in malnourished children. **Indian J.Med. Res.**, v.130, p.31-36, 2009.

DE OLIVEIRA, D. C.; HASTREITER, A. A.; MELLO, A. S.; BELTRAN, J. S. O.; SANTOS, W. C. O. S.; BORELLI, P.; FOCK, R. A.. The effects of protein malnutrition on the TNF-RI and NF-jB expression via the TNF-a signaling pathway. **Cytokine.** 218–225, 2014.

DE ONIS, M.; BLÖSSNER M.; BORGHI, E. Prevalence and trends of stunting among pre-school children, 1990-2020. **Public Health Nutr.**;15:142-8,. 2012.

DEMARCHI, D.A.; SALZANO, F.M.; ALTUNA, M.E.; FIEGENBAUM, M.; HILL, K.; HURTADO, A.M.; TSUNETTO, L.T.; PETZL-ERLER, M.L.; HUTZ, M.H. APOE polymorphism distribution among Native Americans and related populations. **Ann Hum Biol.** May-Jun;32(3):351-65. 2005.

DUNCAN, A.W.; DORRELL, C. & GROMPE, M. Stem cells and liver regeneration. **Gastroenterology.** 137:466–481, 2009.

DUTRA, O. Ciências Nutricionais. **Ed. Sarvier**, São Paulo, 1998.

DURGEN, H.; ARIK, M.; SEKEROGLU, M. R.; TARAKÇIOGLU, M.; NOYAN, T.; CESUR, Y.; BALAHOROGLU, R. Pro-unflamatory cytokines in Turkshi children with protein-energy malnutrition, **Taylor e Francys Helthsciences**, 363-365, 2002.

EIPEL, C.; ABSHAGEN, K. & VOLLMAR, B. Regulation of hepatic blood flow: The hepatic arterial buffer response revisited. **World J Gastroenterol** 16(48): 6046- 6057. 2010.

EICHNER, J.E.; DUNN, S.T.; PERVEEN, G.; THOMPSON, D.M.; STEWART, K.E.; STROEHLA, B.C. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. **Am. J. Epidemiol.**, v.155, p.487-495, 2002.

ETUKUDO, M.; AGBEDANA, O.; AKANG, E.; OSIFO, B. Biochemical changes and liver tissue pathology in weanling Wistar albino rats with protein-energy malnutrition (PEM). **Afr J Med Med Sci.** Mar-Jun; 28(1-2):43-7. 1999.

FAO. The State of Food Insecurity in the World (SOFI) 2014 | **FAO** | Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy: [s.n.]. 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/publications/sofi/2014/en/>>.

FERREIRA, A.V.; MARIO, E.G.; PORTO, L.C.; ANDRADE, S. P.; BOTION, L.M. Hidro-carbohydrate diet selectively induces tumor necrosis factor-alpha production in mice, **Inflammation**, v. 34, p.139-145, 2011.

FRANÇA, T.G.D.; ISHIKAWA, L.L.W.; ZORZELLA-PEZAVENTO, S.F.G.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; DA CUNHA, M.L.R.S. & SARTORI, A. Impact of malnutrition on immunity and infection. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.** 15 (3): 374-390, 2009.

FIOCRUZ. **Curso de manipulação de Animais de Laboratório. Fundação Oswaldo Cruz**, Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz. Salvador, 2005.

FIGUEROA PEDRAZA, D; MENEZES, T. N. Caracterização dos estudos de avaliação antropométrica de crianças brasileiras assistidas em creches. **Rev Paul Pediatr.**..2015.

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

FLORIAN, M.L.; NUNES, M.L. Effects of intra-uterine and early extra-uterine malnutrition on seizure threshold and hippocampal morphometry of pup rats. **Nutr. Neurosci.**, v.14,p.151-158, 2011.

FLORES, H.; NELLY, P.; MACCIONI, A.; MONCKEBERG, F. Lipid transport in kwashiorkor. **Br J Nutr**;24:1005-11. 1970

GAO, B.; JEONG, W. & TIAN, Z. Liver: an organ with predominant innate immunity. **Hepatology** 47:729-736, 2008.

GERSHWIN, M.E.; VIERLING, J.M.; MANNS, M. P. **Liver immunology. Philadelphia: Hanley & Belfus; 2003.**

GIOVANBATTISTA, A.; SPINEDI, E.; SAANJURJO, A.; CHISARI, A.; RODRIGO, M.; PEREZ, N. Circulating and mitogen-induced tumor necrosis

fator (TNF) in malnourished children. *Medicina (B. Aires)*, v. 60, p.339-342, 2000.

GOLDEN, M. H.; RAMDATH, D. Free radicals in the pathogenesis of kwashiorkor. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 46, n. 1, p. 53–68, fev. 1987.

GOLDSTEIN, M.R.; MASCITELLI, L.; PEZZETTA, F. Is the increase in LDL cholesterol induced by selective serotonin reuptake inhibitor therapy a blessing in disguise? **Med. Hypotheses**, v.74, p.955-956-59, 2010.

GOPALAN, S. Malnutrition: causes, aonsequences, and solutions. **Nutrition**, v.16, p-556-558, 2000.

GUIMARÃES, R. et al. Child malnutrition prevalence in general hospital admission. **Rev Bras Nutr Clin**, v. 22, p. 36–40, 2007.

GURMINI, J. et al. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 4, p. 271–278, 1 ago., 2005.

GUYTON, A.C.; HALL, J.I. **Tratado de Fisiologia Médica**. Ed. Elsevier, 12º ed. 2011.

GUZMAN, G. Overview of liver pathology. **Dis Mon**. 54:419-431, 2008.

HEYMANN, F; PEUSQUENS J.; LUDWIG-PORTUGALL, I.; KOHLHEPP, M.; ERGEN, C. NIEMIETZ, P.; MARTIN, C.; VAN ROOIJEN,N.; OCHANDO, J.C.; RANDOLPH ,G. J.; LUEDDE, T.; GINHOUX, F; KURTS, C.; TRAUTWEIN, C.; TACKE, F. Liver Inflammation Abrogates Immunological Tolerance Induced by Kupffer Cells. **Hepatology**, Vol. 62, No. 1, 2015.

HILL-BASKIN, A.E.; MARKIEWSKI, M.M.; BUCHNER, D.A.; WITTMER, C.; DOLMAN, C.S.; HERICH, J.; ATHANACIO, J.; VILLES CAZ, C.; GHOSH, S.S.;

HEILIG, J.S.; et al. Diet-induced hepatocellular carcinoma in genetically predisposed mice. **Hum. Mol. Genet.**, 18, 2975–2988., 2009.

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. **Am J Clin Pathol.**;75(6):816-21. Jun, 1981.

ISHIBASHI, H.; NAKAMURA, M.; KOMORI, A.; MIGITA, K. & SHIMODA, S. Liver architecture, cell function, and disease. **Semin Immunopathol** 31:399–409, 2009.

ISHIDA, B.Y.; FROLICH, J.; FIELDING, C.J. Prebeta-migrating high density lipoprotein: Quantitation in normal and hyperlipidemic plasma by solid phase radioimmunoassay following electrophoretic transfer. **J. Lipid Res.**; 28: 778–786, 1987.

JOSHI, S.; GAROLE, V.; DAWARE, M.; GIRIGOSAVI, S.; RAO, S. Maternal protein restriction before pregnancy affects vital organs of offspring in Wistar rats. **Metabolism**, 52: 13-18, 2003.

JOFRE-MONSENY, L.; MINIHANE, A.M.; RIMBACH, G. Impact of apoE genotype on oxidative stress, inflammation and disease risk. **Mol Nutr Food Res.**;52(1):131-45. Jan, 2008.

JOSEFOWICZ, S Z; LU, L.F.; RUDENSKY AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. **Annu Rev Immunol**;30:531-564, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: livro e atlas**, 12 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2012.

KLEINER, D.E.; BRUNT, E. M.; VAN NATTA, M.; BEHLING, C.; CONTOS, M.J.; CUMMINGS, O.W, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology** (41(6):1313-21. Baltimore, Jun., 2005.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. Elsevier, Rio de Janeiro., 2004.

KUNITAKE, S.T.; LA SALA, K. J.; KANE, J.P. Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins with pre-beta electrophoretic mobility. **J Lipid Res**, 26: 549–555., 1985.

KUMAR, V. et al. Robbins & Cotran **PATOLOGIA Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Saunders,. p. 1480, 2011.

LADD, F.V.; LADD, A.A.; RIBEIRO, A.A.; COSTA, S.B.; COUTINHO, B.P.; FEITOSA, G.A.; DE ANDRADE, G.M.; DE CASTRO-COSTA, C.M.; MAGALHÃES, C.E.; CASTRO, I. C.; OLIVEIRA, B.B.; GUERRANT, R.L.; LIMA, A.A.; ORIA, R.B. Zinc and glutamine improve brain development in suckling mice subjected to early postnatal malnutrition. **Nutritin**, v.26, p.662-670, 2010.

LADU, M.J.; SHAH, J.A.; REARDON, C.A.; GETZ, G.S.; BU, G.; HU, J.; GUO, L.; VAN ELDIK, L.J. Apolipoprotein E receptors mediate the effects of beta-amyloid on astrocyte cultures. **J. Biol. Chem.**, v.275, p.33974-33980, 2000.

LADU, M.J.; SHAH, J.A.; REARDON, C.A.; GETZ, G.S.; BU, G.; HU, J.; GUO, L.; VAN ELDIK, L.J. Apolipoprotein E receptors mediate the effects of beta-amyloid on astrocyte cultures. **J. Biol. Chem.**, v.275, p.33974-33980, 2000.

LAMRI, M.Y.; MEGHELLI-BOUCHENAK, M.; BOUALGA, A.; BELLEVILLE, J.; PROST, J. Time course of changes in rat serum lecithin-cholesterol acyl-transferase activity and high-density-lipoprotein composition during the consumption of two different low-protein diets followed by a balanced diet. **Nutrition**. Sep-Oct;11(5):444-9, 1995.

LAGO, E.S.; TEODÓSIO, N.R.; PESSOA, D.C.; CABRAL FILHO, J.E. Longevity of malnourished rats fed with the regional basic diet (RBD) of the northeast of **Brazil**. **Arch Latinoam Nutr**.47(4):338-42. Dec.1997.

- LECLERQ, I.A. FARREL, G.C.; FIELD, J.; BELL, D.R. GONZALEZ, F.J. ROBERTSON, G.R. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalyts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. **The journal of clinical investigation**. Apr, 2000.
- LEIJA, A.; REYES, J.; RODRÍGUEZ, L. Hepatic stellate cells are a major component of liver fibrosis and a target for the treatment of chronic liver disease. **Biotecnología Aplicada**, v. 24, pp. 19-25, 2007.
- LEFEVER, S., VANDESOMPELE, J., SPELEMAN, F., & PATTYN, F. RTPrimerDB: the portal for real-time PCR primers and probes. *Nucleic Acids Research*, 37(Suppl.1), 942-945., 2009.
- LIMA, A.L.; SILVA, A.C.; KONNO, S.C.; CONDE, W.L., BENICIO, M.H.; MONTEIRO, C. A. Causas do declínio acelerado da desnutrição infantil no Nordeste do Brasil (1986-1996-2006). **Rev Saude Publica**. 44:17-27, 2010.
- MACKAY, I.R. Hepatoimmunology: a perspective. **Immunol Cell Biol**. 80:36., 2002.
- MAHLEY, R.W.; INNERARITY, T.L.; BERSOT, T.P.; LIPSON A.; MARGOLIS, S. Alterations in human high-density lipoproteínas, with or without increased plasma-cholesterol, induced by diets high in cholesterol. **Lancet**. 2:807-809, 1978.
- MAHLEY, R.W.; RALL, S.C., Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v.1, p.507-537, 2000.
- MAHLEY, R.W.; HUANG, Y.; WEISGRABER, K.H. Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 116. Sept, 2006.

MAYATEPEK, E.; BECKER, K.; GANA, L.; HOFFMANN, G.F.; LEICHSENDRING, M. Leukotrienes in the pathophysiology of kwashiorkor. **Lancet**, v.342, p.958-960, 1993.

MIYAZAKI, Y; PIPEK, R; MANDARINO, L.J; DEFRONZO, R.A. Tumor necrosis factor alpha and insulin resistance in obese type 2 diabetic patients. **Int J Obes Relat Metab Disord**. Jan;27(1):88-94., 2003.

MONTEIRO C.A.; CONDE, W.L. Tendência secular da desnutrição e da obesidade na infância na cidade de São Paulo (1974-1996). **Rev Saúde Pública** 34 (6):52-61, 2000.

MONTEIRO, C.A.; BENICIO, M.H.; KONNO, S.C.; SILVA, A. C.; LIMA, A.L.; CONDE, W. L. Causes for the decline in child under-nutrition in Brazil, 1996---2007. **Rev Saude Publica**.;43:35-43. 2009.

MONK, J. M.; WOODWARD, B. Elevated blood interleukin-10 levels and undiminished systemic interleukin-10 production rate prevail throughout acute protein-energy malnutrition in the weanling mouse. **Cytokine**, v.47, p. 126-131, 2009.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. V.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v. 136, p 2348-2357, 1986.

MULLER O, KRAWINKEL M. Malnutrition and health in developing countries. **CMAJ**.;173(3):279-86., 2005.

NEMETH, E.; BAIRD, A.W. & O'FARRELLY, C. Microanatomy of the liver immune system. **Semin Immunopathol** , 31:333-343, 2009.

NG, S. D. Insight into the Role of LCAT from Mouse Models. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, 5, 311-318. 2004.

ORIA, R.B.; PATRICK, P.D.; ZHANG, H.; LORNTZ, B.; DE CASTRO COSTA, C.M.; BRITO, G.A.; BARRETT, L.J.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. APOE4 protects the cognitive development in children with heavy diarrhea burdens in Northeast Brazil. **Pediatr. Res.**, v.57, p.310-316, 2005.

PESSOA, D. N. P. Efeitos da desnutrição pela Dieta Básica Regional (DBR) em três gerações de ratos, sobre a reprodução, crescimento corporal e desenvolvimento de órgãos. 1997. Tese (Doutorado) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 1997.

PESSOA, D. N. P. et al. Dietary proteins on reproductive performance in three consecutive generations of rats. **Arch. Latinoam. Huth.**, v.50, p. 55-61, 2000.

PESSOA, D.C.N.P.; LAGO, E.S.; BION, F.M.; ANTUNES, N.L.M.; VARELA, R.M.; TEODÓSIO, N.R Influência do teor e qualidade da proteína dietética sobre o crescimento corporal e desenvolvimento de órgãos, em três gerações sucessivas de ratos. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. J. Brazilian. Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP, v. 30, p. 31-52, dez. 2005.

PENDSE, A.A.; ARBONES-MAINAR, J.M.; JOHNSON, L.A.; ALTENBURG, M.K.; MAEDA, N. Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond. **J. Lipid Res.**, v.50 Suppl, p.S178-S182, 2009.

PELLETIER, D.L.; FRONGILLO, E. A.; SCHROEDER, D. G.; HABICHT, J.P. The effects of malnutrition on child mortality in developing countries. **Bull World Health Organ**, 1995.

RACANELLI, V. & REHERMANN, B. The liver as an immunological organ. **Hepatology** 43(2):54-62., 2006.

RYTTER, M. J. H.; KOLTE, L.; BRIEND, A.; FRIIS, H.; CHRISTENSEN, V. B. The Immune System in Children with Malnutrition—A Systematic Review. **PLOS One.**; 9(8): e105017. Aug., 2014.

ROCHA DE MELO, A. P.; GUEDES, R. C. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition within the lactation period. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, n. 5, p. 663-670, 1997.

ROSS, M.H.; KAYE, G.I.; PAWLINA, W. Histology: a text and atlas. 4 ed.

SEGREST, J.P. et al., Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein. **Curr Opin Lipidol**, v.11, n.2, p.105-15, 2000.

SPRAGUE, A. H., & KHALIL, R. A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. **Biochemical Pharmacology.**, 78(6), 539-552. 2009.

SOUZA, A.S. Influência da desnutrição promovida pela dieta básica regional sobre o perfil de ácidos graxos do leite materno, o crescimento e o desenvolvimento de ratos jovens. **Rev. Nutr. Campinas**, v. 22, n. 4, 64., 2009.

STAELS, B., VAN TOL, A., SKRETTING, G., AUWERX, J. Lecithin:cholesterol acyltransferase gene expression is regulated in a tissue-selective manner by fibrates. **Journal of Lipid Research**, 33, 727-735. 1992.

TAKACH, S.; YANG, L.; HO, J.; SABRI, E.; MARTIN, L.; HALPENNY, M.; ATKINS, H.; SABLOFF, M.; MCDIARMID, S.A.; HUEBSCH, L.B.; BENCE-BRUCKLER, I.; GIULIVI, A.; ALLAN, D.S. Monoclonal B cells detected in autologous PBSC grafts from patients with classical Hodgkin lymphoma: impact on relapse and survival following transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, v.45, p.856-861, 2010.

TEODÓSIO, N.R.; LAGO, E.S.; ROMANI, S.A.; GUEDES, R.C. A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.40, p. 533-547, 1990

TETTE, E.; SIFAH, K. A.; NARTEY, E. T. Factors affecting malnutrition in children and the uptake of interventions to prevent the condition Edem M. A. **BMC Pediatrics**. 15:189, 2015.

TRINDADE, C. E. P.; NÓBREGA, F. J. DE; TONETE, S. S. Q. Repercussões metabólicas da desnutrição protéico-calórica. In: **Desnutrição Intra-uterina e Pós-natal**. 2. ed. São Paulo: Panamed Editorial,. p. 567., 1986.

UEHARA, Y.; CHIESA, G.; SAKU, K. High-Density Lipoprotein-Targeted Therapy and Apolipoprotein A-I Mimetic Peptides. **Circulation Journal**. Official Journal of the Japanese Circulation Society. <http://www.j-circ.or.jp>. online November 6, 2015.

UENO, P. M.; ORIÁ, R. B.; MAIER, E. A.; GUEDES, M.; DE AZEVEDO, O. G.; WU, D.; WILLSON, T.; HOGAN, P.S.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L.; POLK, D. B.; DENSON, L. A.; MOORE, S. R. Alanyl-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis in vitro and in a murine model of weanling undernutrition **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 301: G612–G622, 2011.

UNICEF, WHO. Estimates TWBJCM: Levels & Trends in Child Malnutrition, vol. 2015. Geneva: WHO; 2013.

UNTERGRASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M., & ROZEN, S. G. Primer3 - new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, 40(15):e115. 2012.

VAN DEN ELZEN, P.; GARG, S.; LEON, L.; BRIGL, M.; LEADBETTER, E.A.; GUMPERZ, J.E.; DASCHER, C.C.; CHENG, T.Y.; SACKS, F.M.; ILLARIONOV,

P.A.; BESRA, G.S.; KENT, S.C.; MOODY, D.B.; BRENNER, M.B. 65 Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. **Nature**, v.437, p.906-910, 2005.

WANG, M.; BRIGGS, M.R.. HDL: the metabolism, function and therapeutic importance. **Chem. Rev.** v. 104, n.1, p.119-37, 2004.

WATERLOW, J. C. Protein-energy malnutrition: the nature and extent of the problem. **Clinical Nutrition**, v. 16, p. 3–9, mar. 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Animal Waste, Water Quality and Human Health. London: **IWA Publishing**, p. 476. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO | Global Health Observatory (GHO): Underweight in children. Geneve, **Switzerland: World Health Organization**, 2014. Disponível em: <http://www.who.int/gho/mdg/poverty_hunger/underweight_text/en/>. 66