



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

SAMILLY ALBUQUERQUE RIBEIRO

DESENVOLVIMENTO DE MODELO MURINO DE DESNUTRIÇÃO BASEADO NA
DIETA DE CRIANÇAS DESNUTRIDAS E IMPACTO NA BARREIRA
MORFOFUNCIONAL INTESTINAL

FORTALEZA

2022

SAMILLY ALBUQUERQUE RIBEIRO

DESENVOLVIMENTO DE MODELO MURINO DE DESNUTRIÇÃO BASEADO NA
DIETA DE CRIANÇAS DESNUTRIDAS E IMPACTO NA BARREIRA
MORFOFUNCIONAL INTESTINAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Doutor (a) em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

FORTALEZA

2022

SAMILLY ALBUQUERQUE RIBEIRO

DESENVOLVIMENTO DE MODELO MURINO DE DESNUTRIÇÃO BASEADA NA
DIETA DE CRIANÇAS DESNUTRIDAS E IMPACTO NA BARREIRA
MORFOFUNCIONAL INTESTINAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para à obtenção do título de Doutor (a) em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.^a Dr.^a Bruna Leal Lima Maciel
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Prof.^a Dr.^a Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Universidade Federal De Minas Gerais (UFMG)

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

- R372d Ribeiro, Samilly Albuquerque.
Desenvolvimento de modelo murino de desnutrição baseada na dieta de crianças desnutridas e impacto na barreira morfofuncional intestinal / Samilly Albuquerque Ribeiro. – 2022.
161 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.
1. Desnutrição. 2. função da barreira intestinal. 3. junções firmes. 4. modelo murino de desnutrição. 5. transportadores intestinais. I. Título.

CDD 615.1

A minha mãe, Sandra Maria Gomes Ribeiro
Abreu, e ao meu pai, Evandro Albuquerque
Abreu Junior.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder a oportunidade de ter uma formação de excelência e por me amparar em todas as dificuldades.

Ao CNPq pelo apoio financeiro com a bolsa de auxílio e recursos para desenvolvimento do trabalho (Universal 2019).

Ao Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima por me permitir ser sua orientanda, pela disposição em contribuir para o meu crescimento científico. Admiro muito o senhor como profissional, sua contribuição para ciência é única e tenho orgulho de fazer parte do grupo.

Ao Prof. Dr. Alexandre Havt, que me abriu as portas no LDI e continuou me orientando nesta jornada. Muito obrigada por fazer parte do meu crescimento, tenho muito orgulho de ter sido sua aluna e continuado aluna indiretamente todos esses anos, admiro muito seu amor pela ciência.

Aos professores participantes da banca examinadora de defesa, Prof.^a Dr.^a Bruna Leal Lima Maciel, Prof.^a Dr.^a Jaqueline Alvarez, Prof. Pedro Magalhães e o Prof. Dr. Roberto César por todas as valiosas contribuições para este trabalho. Muito grata a todo o tempo dedicado para esta defesa.

Aos participantes da banca examinadora de qualificação, Prof.^a Dr.^a Bruna Lima Maciel, Prof. Dr. Francisco Adelvane de Paulo Rodrigues e Prof. Dr. Marco Antônio de Freitas Clementino pelo tempo dedicado ao trabalho.

Aos professores responsáveis pelos laboratórios colaboradores, Prof.^a Dr.^a Gerlyane Brito e Prof.^a Dr.^a Diane Cavalcante que permitiram a execução de protocolos experimentais importantes para o desenvolvimento do trabalho.

Aos estudantes de pós-graduação e graduação, Kleybson de Sousa, Mônica Belém, Thiago de Freitas, Marcus, Enock Lee, Alexia Medeiros e Xhaulla que ajudaram na execução de experimentos cruciais deste trabalho.

A todos os alunos de pós-graduação e iniciação científica do Laboratório de Doenças Infecciosas e do Laboratório de Toxinologia Molecular que de alguma forma contribuíram na minha caminhada de pós-graduanda, meu muito obrigada.

A Prof.^a Dr.^a Bruna Leal Lima Maciel, que contribuiu enormemente para o desenvolvimento deste trabalho. Admiro sua tranquilidade e agradeço todo o conhecimento compartilhado. Espero que possamos continuar com a parceria.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Clementino pela parceria desde a graduação. Obrigada por compartilhar seu conhecimento comigo sempre.

Ao Prof. Dr. Advane de Paulo Rodrigues por todo conhecimento compartilhado na pós-graduação. Fico feliz na sua participação na banca de qualificação como professor. Obrigada por tudo.

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

A minha mãe, Sandra Maria Gomes Ribeiro Abreu, que não está mais presente, mas que foi e é a pessoa mais importante da minha vida, que sempre se sacrificou para me conceder a melhor formação que eu poderia ter. Sou grata por ser sua filha e por todo esforço que fez por mim.

À minha irmã, Samya Ribeiro por ser minha melhor amiga, pelo apoio emocional nos momentos mais difíceis nessa árdua jornada. Obrigada por todo apoio e compreensão.

Ao meu namorado, Victor Mapurunga que durante esses últimos anos me deu apoio emocional e ajuda física em alguns momentos de trabalho. Muito obrigada por fazer parte desses momentos.

Ao meu pai, meus tios e primos que de uma forma ou de outra apoiaram minha chegada até aqui. Meu muito obrigada.

A Ana Karolina dos Santos, Mariana Bona, Rafaela Pankov, Marília Maia, Herlice Veras, Mara Prata, Advane Rodrigues e Pedro Henrique Quintela por me

receberem no laboratório, por compartilhar risadas, tristezas, expectativas e por todo o crescimento científico que compartilhamos.

A Charliene, Luciana e Teresinha que sempre deram um suporte técnico que auxiliam enormemente nos experimentos. Meu muito obrigada a todas, sem vocês meu trabalho seriam bem mais árduo.

Ao Charles e a Kátia que sempre estiveram a postos para ajudar com a parte burocrática do desenvolvimento deste trabalho.

“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmos sempre depois de cada queda.”

(Autor: Oliver Goldsmith).

RESUMO

A desnutrição infantil tem patologia complexa, associada ao aumento do risco de mortalidade e susceptibilidade a doenças infecciosas, comprometendo a barreira morfofuncional intestinal, o desenvolvimento físico e neurocognitivo. Este trabalho teve como objetivo formular uma nova dieta experimental baseada na dieta complementar de crianças desnutridas de sete países em desenvolvimento, validar um novo modelo murino de desnutrição, avaliando o impacto da desnutrição na barreira epitelial morfofuncional intestinal. A dieta experimental (dieta MAL-ED) foi formulada considerando o percentual de diferença de energia, macronutrientes, fibra e zinco de crianças sem desnutrição vs. com desnutrição (escore Z altura para idade < -2), sendo tomado como dieta de referência a composição da dieta padrão para roedores (dieta AIN-93M). Posteriormente, camundongos machos C57BL/6 (21 dias de idade) foram submetidos ao consumo da dieta controle (AIN-93M) ou dieta MAL-ED por 28 dias. O peso e ração foram mensurados todos os dias; a composição e o comprimento corporal a cada sete dias; o teste lactulose/manitol (LM), morfometria e albumina nos dias 7 e 28; o teste de cotransporte em Câmaras de *Ussing*, análise dos transportadores intestinais e junções firmes no dia 7. A dieta MAL-ED mostrou-se moderadamente deficiente em energia, proteínas, lipídeos e zinco e com moderado aumento de carboidrato e fibra em relação a dieta controle. O consumo dessa dieta reduziu rapidamente o peso e ganho de peso, comprometeu as reservas energéticas e gerou falha de crescimento nos animais ($p < 0,05$) em período crônico, sem causar alterações nos níveis de albumina e edema ($p > 0,05$). Na barreira morfofuncional intestinal, a dieta MAL-ED reduziu a área de vilosidades no duodeno e jejuno, causou aumento da razão LM, da permeabilidade, associado ao aumento nos níveis de RNAm de FATCD/36 e redução da diferença de potencial basal ($p < 0,05$) em período agudo. Em período crônico, a dieta MAL-ED aumentou a área intestinal, comprimento do intestino delgado e a permeabilidade paracelular ($p < 0,05$). Assim, a nova dieta MAL-ED foi capaz de causar desnutrição, comprometer as reservas energéticas e o crescimento, sem gerar edema, causando impacto negativo na barreira morfofuncional intestinal em período agudo e aumento da área intestinal total em período crônico.

Palavras-chave: Desnutrição; desenvolvimento; dieta; zinco.

ABSTRACT

Development of a murine model of malnutrition based on the diet of malnourished children and impact on the intestinal morphofunctional barrier

Child malnutrition has a complex pathology, associated with increased risk of mortality and susceptibility to infectious diseases, compromising the intestinal morphofunctional barrier, physical and neurocognitive development. This work aimed to formulate a new experimental diet based on the complementary diet of malnourished children from seven developing countries, to validate a new murine model of malnutrition, evaluating the impact of malnutrition on the intestinal morphofunctional epithelial barrier. The experimental diet (MAL-ED diet) was formulated considering the percentage difference in energy, macronutrients, fiber and zinc of children without malnutrition vs. with malnutrition (Z-score height for age < -2), with the composition of the standard diet for rodents (AIN-93M diet) being taken as a reference diet. Subsequently, male C57BL/6 mice (21 days of age) were submitted to the consumption of the control diet (AIN-93M) or MAL-ED diet for 28 days. Weight and feed were measured every day; body composition and length every seven days; lactulose/mannitol (LM), morphometry and albumin test on days 7 and 28; cotransport test in Ussing Chambers, analysis of intestinal transporters and tight junctions on day 7. The MAL-ED diet was shown to be moderately deficient in energy, proteins, lipids and zinc and with a moderate increase in carbohydrates and fiber in relation to the control diet. The consumption of this diet quickly reduced weight and weight gain, compromised energy reserves and caused growth failure in animals ($p < 0.05$) in a chronic period, without causing changes in albumin and edema levels ($p > 0.05$). In the intestinal morphofunctional barrier, the MAL-ED diet reduced the villi area in the duodenum and jejunum, caused an increase in the LM ratio, permeability, associated with an increase in FATCD/36 mRNA levels and a reduction in the basal potential difference ($p < 0.05$) in the acute period. In the chronic period, the MAL-ED diet increased intestinal area, small intestine length and paracellular permeability ($p < 0.05$). Thus, the new MAL-ED diet was able to cause malnutrition, compromise energy reserves and growth, without generating edema, causing a negative impact on the intestinal morphofunctional barrier in the acute period and an increase in the total intestinal area in the chronic period.

Keywords: Malnutrition; development; diet; zinc.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Prevalência mundial de desnutrição crônica infantil.....	24
Figura 2	Prevalência mundial de desnutrição aguda infantil.....	25
Figura 3	Arquitetura do epitélio do intestino delgado.....	42
Figura 4	Tipos celulares e distribuição das células constituintes da barreira epitelial intestinal.....	44
Figura 5	Anatomia do complexo juncional de células epiteliais intestinais.....	45
Figura 6	Anatomia das junções firmes das células epiteliais intestinais.....	47
Figura 7	Desenho experimental do modelo de desnutrição com a dieta MAL-ED.....	61
Figura 8	Esquematisação do procedimento experimental da bioimpedância elétrica.....	63
Figura 9	Sinais clínicos desencadeados pelo consumo crônico da dieta MAL-ED controlada diariamente.....	83
Figura 10	Análise da composição corporal dos animais submetidos dieta de desnutrição MAL-ED e dieta controle.....	85
Figura 11	Efeitos do consumo agudo e crônico da dieta MAL-ED na morfometria do duodeno, jejuno e íleo.....	87
Figura 12	Imagens representativas dos segmentos intestinais dos animais controles e desnutridos pela dieta MALED.....	88
Figura 13	Efeitos do consumo agudo e crônico da dieta MAL-ED na permeabilidade intestinal.....	90
Figura 14	Efeitos do consumo agudo e crônico da dieta MAL-ED no tamanho do intestino delgado.....	91
Figura 15	Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED na corrente de curto-circuito, diferença de potencial e resistência elétrica transepitelial em condições basais.....	92
Figura 16	Efeitos das concentrações cumulativas da glutamina no jejuno de animais controles e desnutridos.....	94

Figura 17	Efeitos das concentrações cumulativas da alanil- glutamina no jejuno de animais controles e desnutridos.....	96
Figura 18	Efeitos das concentrações cumulativas da glicose na corrente de curto-circuito em animais controles e desnutridos.....	98
Figura 19	Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED nos níveis de transcrito dos transportadores intestinais e canal iônico.....	100
Figura 20	Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED nos níveis de transcrito das proteínas formadoras de junções firmes.....	101
Figura 21	Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED na expressão proteica de transportador intestinal e proteínas formadoras de junções firmes.....	103
Figura 22	Imagem representativa dos danos agudos e crônicos gerados pelo consumo da dieta MAL-ED na barreira morfofuncional intestinal.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Diagnóstico e gravidade de desnutrição através do escore Z.....	21
Tabela 2	Prevalência de desnutrição aguda em crianças menores que 5 anos de idade em 2000 e 2020.....	27
Tabela 3	Modelos experimentais de deficiência nutricional e efeitos nos parâmetros corporais, intestino, sistema imunológico e demais sistemas.....	39
Tabela 4	Escore histopatológico para inflamação no intestino delgado.....	65
Tabela 5	Sequências de oligonucleotídeos iniciadores dos genes alvos e as condições de anelamento.....	77
Tabela 6	Composição nutricional da dieta MAL-ED e controle.....	80
Tabela 7	Escore histopatológico desencadeados pelo consumo agudo e crônico da dieta MAL-ED.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LM	Lactulose/Manitol
BrdU	Bromodesoxiuridina
CCC	Corrente de curto-circuito
DBR	Dieta Básica Regional
FABP	Proteína de ligação a ácidos graxos da membrana plasmática (<i>Fatty acid-binding protein</i>)
FATP4	Proteína de transporte de ácido graxo 4 (<i>Fatty acid transport protein 4</i>)
FAT/CD36	Homólogo de rato da translocase de ácido graxo humano (<i>Fatty acid translocase</i>)
HAZ	Escore Z altura para a idade (<i>Height-age Z score</i>)
IMC	Índice de Massa Corporal
JAMs	Moléculas de adesão juncional (<i>Junctional adhesion molecules</i>)
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos (<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>)
MLCK	Miosina quinase de cadeia leve (<i>Mitogen-activated protein kinases</i>)
MAL-ED	Desnutrição e Infecção Entérica (<i>Malnutrition-Enteric Diseases</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDZ	Domínios PSD95–DlgA–ZO-1
PEPT-1	Transportador de peptídeo-1 (<i>Peptide Transporter-1</i>)
PKC	Proteína quinase C (<i>Protein kinase C</i>)
POF	Pesquisa de Orçamento Familiar
RT	Resistência elétrica transepitelial
SGLT	Transportador de glicose dependente do sódio (<i>Sodium-glucose linked transporter</i>)
V _o	Diferença de potencial elétrico
WAZ	Escore Z peso para a idade (<i>Weight-age Z score</i>)
WHZ	Escore Z peso para altura (<i>Weight-height Z score</i>)
ZO-1	Zonula ocludentes-1

LISTA DE SÍMBOLOS

Da	Dalton
Na ⁺	Sódio
K ⁺	Potássio
cm	Centímetros
°C	Graus Celsius
±	Mais ou menos
Kg	Quilogramas
mg	Miligramas
rpm	Rotação por min
MHz	Megahertz
M	Molar
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar
µm	Micrômetro
mL	Mililitros
%	Percentual
®	Marca Registrada
mM	Milimolar
Δ	Variação ou delta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Desnutrição: definição, diagnóstico e manifestações clínicas	20
1.2	Epidemiologia da desnutrição	23
1.3	Consequências da desnutrição para o indivíduo e para a sociedade.	28
1.4	Fisiopatologia da desnutrição	31
1.5	Modelos experimentais de desnutrição: importância e limitações...	35
1.6	Barreira morfofuncional intestinal	42
1.6.1	<i>Componentes extracelulares e componentes da barreira epitelial intestinal</i>	42
1.6.2	<i>Junções firmes: função, aspectos estruturais e regulação</i>	46
1.6.2.1	<i>Claudinas</i>	48
1.6.2.2	<i>Ocludina</i>	50
1.6.2.3	<i>Zonulas ocludentes</i>	50
1.6.3	<i>Absorção de carboidratos, proteínas e ácidos graxos</i>	51
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	56
3	OBJETIVO	58
3.1	Objetivo Geral	58
3.2	Objetivos Específicos	58
4	MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1	População e tamanho da amostra	59
4.2	Formulação da dieta MAL-ED	59
4.3	Desenho experimental	60
4.4	Grupos Experimentais	62
4.5	Análise da composição corporal: Bioimpedância elétrica	62
4.6	Avaliação do desenvolvimento corporal	63
4.7	Avaliação das concentrações séricas de albumina	64
4.8	Análise morfométrica e estudo histopatológico	64
4.9	Avaliação da barreira funcional do epitélio intestinal – teste Lactulose/Manitol mensuração dos marcadores por HPLC-PAD	65

4.10	Avaliação dos parâmetros eletrofisiológicos basais e durante transporte de peptídeos e carboidratos por Câmara de <i>Ussing</i>	66
4.10.1	<i>Soluções perfusoras e soluções teste</i>	67
4.10.2	<i>Montagem das Câmaras Ussing e coleta da amostras</i>	69
4.10.2.1	<i>Montagem das câmaras e calibração do sistema</i>	69
4.10.2.2	<i>Coleta de amostra</i>	71
4.10.3	<i>Medidas elétricas</i>	72
4.10.4	<i>Curva dose-resposta da glutamina, alanil-glutamina e glicose</i>	73
4.10.5	<i>Cálculos dos parâmetros eletrofisiológicos</i>	74
4.11	Avaliação dos níveis de transcritos de Junções Firmes e Transportadores intestinais por meio de RT-qPCR.....	75
4.11.1	<i>Extração do RNA total</i>	75
4.11.2	<i>Síntese de cDNA</i>	75
4.11.3	<i>Reação em cadeia de polimerase quantitativo</i>	76
4.12	Expressão proteica de junções Firmes e transportadores por meio de <i>Western Blotting</i>	78
4.13	Análise estatística.....	79
5	RESULTADOS	80
5.1	Composição da dieta MAL-ED.....	80
5.2	Indução da desnutrição pela dieta MAL-ED.....	81
5.2.1	<i>Sinais clínicos desencadeados pelo consumo crônico da dieta MAL-ED em animais recém desmamados</i>	81
5.2.2	<i>Efeitos do consumo crônico da dieta MAL-ED na composição corporal dos animais recém desmamados</i>	84
5.3	Efeitos da desnutrição induzida pela dieta MAL-ED na barreira morfofuncional intestinal.....	86
5.3.1	<i>Alterações desencadeadas pelo consumo agudo e crônico da dieta MALE-ED na morfometria e histopatologia do intestino delgado</i>	86
5.3.2	<i>Alterações desencadeadas pelo consumo agudo e crônico da dieta MAL-ED na permeabilidade da barreira intestinal</i>	89
5.3.3	<i>Efeitos do consumo agudo e crônico da dieta MAL-ED no tamanho total do intestino delgado</i>	90

5.3.4	<i>Efeitos do consumo agudo da dieta desnutrido MAL-ED na corrente de curto-circuito, na diferença de potencial e na resistência elétrica transepitelial em condições basais.....</i>	91
5.3.5	<i>Efeitos do consumo agudo da dieta desnutrido MAL-ED na corrente de curto-circuito, na diferença de potencial e na resistência elétrica transepitelial durante o transporte de glutamina, alanil-glutamina e glicose.....</i>	92
5.3.5.1	<i>Efeitos das concentrações cumulativas de glutamina no jejuno de animais controles e desnutridos.....</i>	92
5.3.5.2	<i>Efeitos das concentrações cumulativas de alanil-glutamina no jejuno de animais controles e desnutridos.....</i>	95
5.3.5.3	<i>Efeitos das concentrações cumulativas de glicose no jejuno de animais controles e desnutridos.....</i>	97
5.3.6	<i>Efeitos agudo do novo modelo de desnutrição MAL-ED nos níveis de transcritos dos transportadores intestinais e das proteínas formadoras de junções firmes.....</i>	99
5.3.7	<i>Efeitos agudo do novo modelo de desnutrição MAL-ED na expressão proteica de transportadores intestinais e das proteínas formadoras de junções firmes.....</i>	102
6	DISCUSSÃO	104
7	CONCLUSÃO	116
	REFERÊNCIAS	117
	ANEXO A.....	136
	ANEXO B.....	137
	ANEXO C.....	138
	ANEXO D.....	139
	ANEXO E.....	159

1 INTRODUÇÃO

1.1 Desnutrição: definição, diagnóstico e manifestações clínicas

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define a má nutrição como deficiência, excesso ou desequilíbrio no consumo de energia e/ou nutrientes (WHO, 2006), sendo classificada por três grandes condições: desnutrição, excesso de peso e desnutrição relacionada a micronutrientes. A desnutrição é subdividida em **desnutrição aguda** (do inglês *wasting*), **desnutrição crônica** (do inglês *stunting*), **subnutrição** (do inglês *underweight*); enquanto o excesso de peso engloba o sobrepeso, a obesidade e doenças não transmissíveis relacionadas à dieta, como doenças cardiovasculares, diabetes e alguns tipos de câncer (WHO, 2021). A desnutrição relacionada a micronutriente inclui deficiência de micronutrientes, como falta de vitaminas e minerais importantes, e também o excesso de micronutrientes (WHO, 2021). Com relação aos quadros clínicos desencadeados pela má nutrição, neste trabalho iremos focar nas condições relacionados a perda de peso e utilizaremos o termo desnutrição como sinônimo para todas as subdivisões desta.

O diagnóstico de desnutrição infantil pode ser dado por: avaliação dos índices antropométricos, tais como escore Z, índice de massa corporal (IMC), dobras cutâneas ou circunferência do braço médio; indicadores bioquímicos, como a albumina ou pré-albumina; e sinais clínicos, como retenção de líquido, alterações no cabelo ou na pele (WHO, 2006). Dentre os métodos de diagnóstico, os indicadores antropométricos têm como vantagens não serem invasivos e serem sensíveis a todos os tipos de desnutrição, enquanto os métodos bioquímicos e sinais clínicos exigem um grau moderado de desnutrição para um resultado validado (WHO, 2006). Por exemplo, o sinal clínico de retenção de líquido é indicativo de desnutrição grave decorrente de hipoalbuminemia gerada pela deficiência proteica (COULTHARD, 2015).

O escore Z era considerado parâmetro ouro para diagnóstico da desnutrição infantil, diferenciando os diferentes tipos desnutrição e o grau de gravidade (**Tabela 1**) (WHO, 2006). No entanto, a Sociedade Americana de Nutrição Parenteral e Enteral e a Academia de Nutrição e Dietética propuseram um novo conjunto de indicadores de diagnóstico de desnutrição para a população pediátrica de

1 mês a 18 anos de idade, com o intuito de uniformizar o diagnóstico de desnutrição pediátrica mundial, no qual tem sido implementado e validado na clínica (BECKER et al., 2014). A desnutrição infantil, segundo o novo método, pode ser diagnosticada por um ponto de dados ou por comparação de dois dados (BOUMA, 2017). Para um ponto de dados, o diagnóstico pode ser dado pelo escore Z: peso para altura, índice de massa corporal (IMC) para idade, comprimento/altura para idade ou circunferência do braço médio. Ao utilizar os dois pontos de dados, o diagnóstico pode ser dado por: velocidade de ganho de peso (<2 anos de idade), percentual de perda de peso (2-20 anos de idade), desaceleração do escore Z de peso por comprimento/altura, ingestão inadequada de nutrientes. Ambos os métodos utilizam pontos de corte específicos para determinação da gravidade da desnutrição no paciente (BOUMA, 2017).

Tabela 1 – Diagnóstico e gravidade de desnutrição através do escore Z.

Diagnóstico	Escore Z
Desnutrição aguda	peso para altura (WHZ, do inglês <i>weight-height Z score</i>)
Desnutrição crônica	altura para a idade (HAZ, do inglês <i>height-age Z score</i>)
Subnutrição	peso para a idade (WAZ, do inglês <i>weight-age Z score</i>)
Gravidade	Desvio padrão*
Leve	$-2,0 \leq \text{escore Z} < -1,0$
Moderado	$-3,0 \leq \text{escore Z} < -2,0$
Grave	$\text{Escore Z} < -3,0$

Fonte: WHO (2006).

Nota: desvio padrão de referência da OMS (1999).

Em relação aos tipos de desnutrição, a **desnutrição aguda**, em geral, indica recente e severa perda de peso por deficiência nutricional ou decorrente de uma doença, como doenças infecciosas (ACF, 2010; WHO, 2021). A desnutrição aguda quando grave aumenta o risco de mortalidade e pode durar vários meses, se não for devidamente tratada (GARENNE et al., 2009; ISANAKA et al., 2011). Existem três tipos de manifestações clínicas de desnutrição aguda: *kwashiorkor*, marasmo e *kwashiorkor* marasmático. O *kwashiorkor* é caracterizado principalmente pela presença de edema, atrofia muscular grave, sem perda de gordura subcutânea e nos casos mais graves, pode-se observar pele descamativa e brilhantes, lesões cutâneas

e cabelos descoloridos (ACF, 2010). O marasmo, por sua vez, é caracterizado principalmente por hipotrofia muscular, perda de gordura subcutânea e ausência ou presença de um edema discreto (BUTSCH; HEIMBURGER, 2008). O *kwashiorkor marasmático* é uma forma mais severa e com características comuns das duas condições, podendo ocorrer também como complicações de trauma, sepse e doença inflamatória crônica (SOUZA, et al., 2016).

A **desnutrição crônica**, por sua vez, é comumente associada a más condições socioeconômicas, de saúde e nutrição materna, doenças frequentes e/ou alimentação e cuidados inadequados na primeira infância (WHO, 2021). Os acometidos por desnutrição crônica não possuem um alto risco de mortalidade como os diagnosticados com desnutrição aguda (BRIEND et al., 2015), entretanto, quando manifestada nos 1000 primeiros dias de vida são associados com déficit cognitivo (ALAM et al., 2020), baixos salários (ACF, 2010; HODDINOTT et al., 2008; WORLD BANK, 2007), obesidade e síndromes metabólicas na vida adulta (DEBOER et al., 2012).

A **subnutrição**, por outro lado, é uma condição influenciada pela desnutrição aguda (HAZ) e crônica (WAZ), refletindo uma condição atual resultantes de ingestão inadequada de alimentos, episódios passados de desnutrição ou más condições de saúde, gerando uma interpretação complexa (WHO, 2021). O baixo peso para idade é facilmente avaliado, sendo o indicador mais utilizado, no qual teve variação e distribuição etária mundial semelhante a desnutrição crônica entre 1990 e 2013 (NGO; ORTIZ-ANDRELLUCCHI; SERRA-MAJEM, 2016).

A desnutrição também pode ser relacionada a deficiência de micronutrientes, sendo o iodo, ferro e vitamina A as carências mais importantes, em termos de saúde pública global, representando uma grande ameaça à saúde especialmente em crianças e mulheres grávidas em países de baixa renda (BLACK et al., 2008; OMS, 2021). Estudo recente mostrou que o fornecimento de micronutrientes adequados associado a um ambiente saudável/limpo, riqueza familiar, educação materna e raciocínio cognitivo tem influência forte e persistente no desenvolvimento cognitivo infantil (MCCORMICK et al., 2019a). O zinco também vem demonstrando papel crucial na nutrição. Modelos experimentais *in vivo* de deficiência em zinco apontam para um aumento de susceptibilidade a doenças infecciosas e, por sua vez,

a desnutrição, gerando um ciclo vicioso desnutrição e infecção entérica (BOLICK et al., 2015; GIALLOUROU et al., 2018; QS MEDEIROS et al., 2019). Estudos apontam que a suplementação de ferro, zinco e vitamina A melhoram o crescimento linear de crianças desnutridas (CHEN et al., 2003; FAHMIDA et al., 2007; LIMA et al. 2014). Além disto, um estudo com crianças pertencentes ao estudo coorte multicêntrico denominado Malnutrition-Enteric Diseases (MAL-ED) mostrou que uma maior densidade de micronutrientes na alimentação complementar pode reduzir a disfunção entérica ambiental, também conhecida como enteropatia ambiental, condição que gera desnutrição (MCCORMICK et al., 2019b).

O risco de desnutrição nos primeiros dois anos de vida aumentam durante o período de introdução de alimentos complementares necessários para atender a demanda energética excedente do que é fornecido pelo leite materno (DEWEY; HUFFMAN, 2009; VICTORA et al., 2010; WHO, 2022). Este período é denominado de alimentação complementar e ocorre por volta dos 6 meses de idade (WHO, 2022). Os fatores determinantes para o aumento do risco de desnutrição nessa fase são: quantidades insuficientes de produtos, má qualidade dos alimentos, práticas alimentares inadequadas e aumento das taxas de infecções (BHUTTA et al., 2013; DANAELI et al., 2016).

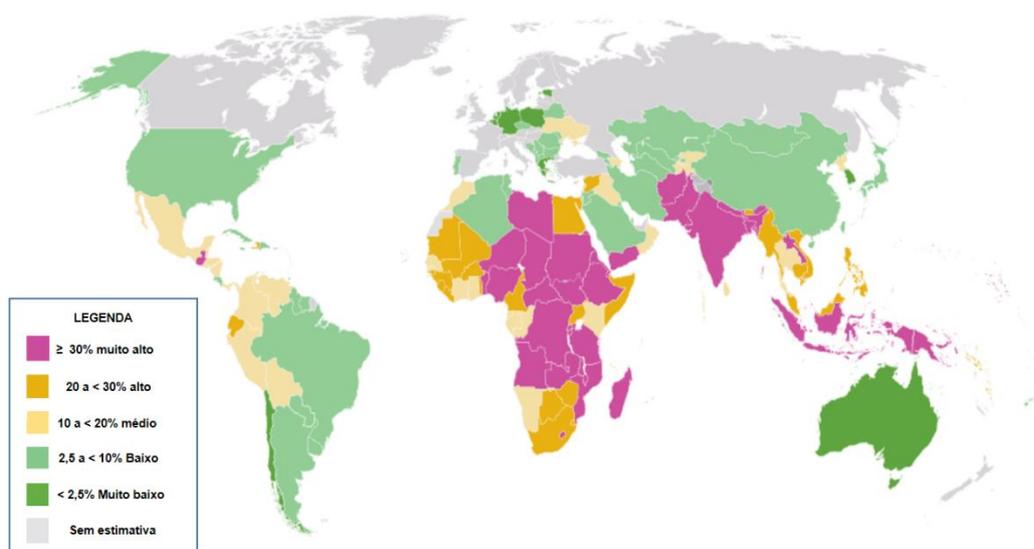
1.2 Epidemiologia da desnutrição

Os dados epidemiológicos sobre a desnutrição infantil nos últimos anos são escassos devido, principalmente, ao isolamento social causado pela pandemia do COVID-19. No entanto, o mundo tem vivido uma grande crise mundial, fazendo com que alguns países, como o Brasil, voltem ao mapa da fome (WORLD FOOD PROGRAMME, 2022). Em 2020, cerca de 768 milhões de pessoas em escala global se encontravam em insegurança alimentar crônica, enquanto, em 2021, cerca de 193 milhões de pessoas experimentam a insegurança alimentar aguda em 53 países (WORLD FOOD PROGRAMME, 2022). Atualmente, cerca de 597 milhões de pessoas apresentam insegurança alimentar em 89 países (WORLD FOOD PROGRAMME, 2022). Ainda, segundo World Food Programme (2022), se as tendências atuais continuarem, o número de pessoas famintas será de 840 milhões a nível mundial em 2030.

Em relação a desnutrição infantil, o último relatório divulgado pelas autoridades competentes registraram cerca de 149,2 e 85 milhões de crianças menores de 5 anos de idade acometidas por desnutrição crônica e subnutrição, respectivamente, enquanto, cerca de 45,4 milhões de crianças menores que 5 anos de idade foram acometidas por desnutrição aguda, dentre as quais cerca de 13,6 milhões foram severamente afetadas (UNICEF; WHO; WORLD BANK GROUP, 2021; WHO, 2022). Esta última estimativa sobre a prevalência da desnutrição infantil mostra que a Ásia e a África ainda são os continentes mais afetados, seguidos pela América Latina/Caribe e Oceania.

A Ásia é o continente com o maior número de crianças menores de 5 anos de idade afetadas por desnutrição, principalmente desnutrição crônica (**Figura 1**). No ano de 2020, cerca de 31,9 milhões de crianças menores do que 5 anos de idade foram afetadas por desnutrição aguda moderada a severa na Ásia, dentre as quais 10,3 milhões foram diagnosticadas com desnutrição aguda grave; enquanto, cerca de 79 e 41,9 milhões de crianças < 5 anos de idade foram acometidas por desnutrição crônica e subnutrição, respectivamente (UNICEF; WHO; WORLD BANK GROUP, 2021; WHO, 2022). Dentre os casos de desnutrição aguda na Ásia, a maior prevalência está registrada no Sul da Ásia, com cerca de 25 milhões de crianças afetadas (14,1%), conforme pode ser visto na **Figura 2** (UNICEF; WHO; WORLD BANK GROUP, 2021).

Figura 1 – Prevalência mundial de desnutrição crônica infantil.

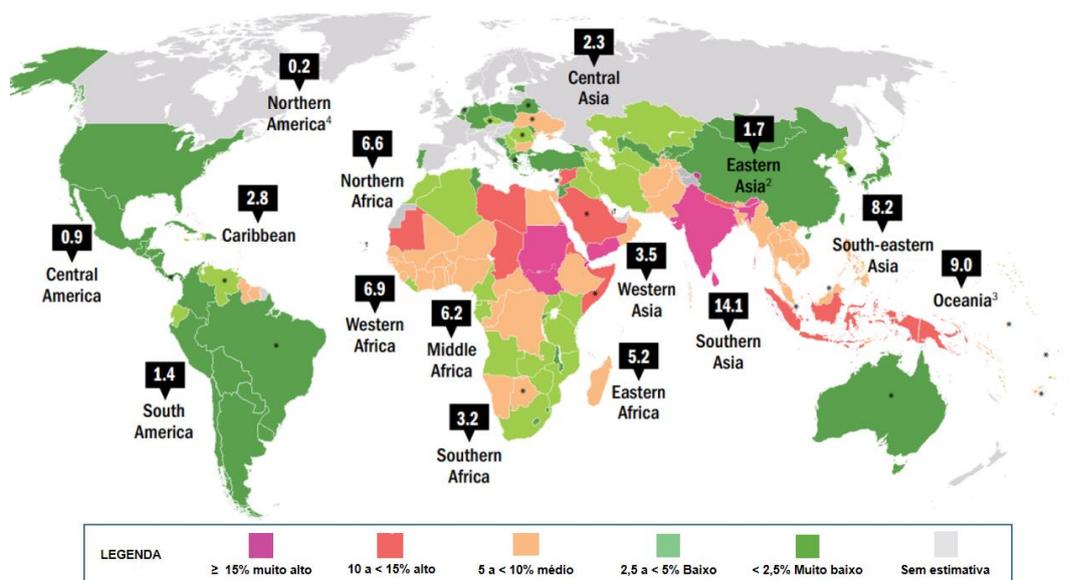


Fonte: Adaptado de UNICEF; WHO; WORLD BANK GROUP (2021).

Distribuição mundial da prevalência de crianças menores de cinco anos de idade com desnutrição crônica. Esta estimativa é, em grande parte, baseada em dados coletados antes da pandemia por COVID-19. O mapa não estão em escala e não refletem posição territorial legal de países ou delimitações de fronteiras.

A África aparece em segundo lugar em casos de desnutrição infantil, com cerca de 12,1 milhões de casos de desnutrição aguda moderada a severa (**Figura 2**), dentre as quais 3 milhões desses casos são de desnutrição aguda severa. Cerca de 61,4 milhões de crianças foram diagnosticadas com desnutrição crônica e 27,2 milhões de crianças com subnutrição (**Figura 1**) (UNICEF; WHO; WORLD BANK GROUP, 2021; WHO, 2022). A região Ocidental e Norte da África são as mais afetadas pela desnutrição aguda infantil, com 4,5 (6,9%) e 3,5 (6,6%) milhões de casos, respectivamente (**Figura 2**) (UNICEF; WHO; WORLD BANK GROUP, 2021).

Figura 2 – Prevalência mundial de desnutrição aguda infantil.



Fonte: Adaptado de UNICEF; WHO; WORLD BANK GROUP (2021).

Distribuição mundial da prevalência de crianças menores de cinco anos de idade com desnutrição aguda. Esta estimativa é, em grande parte, baseada em dados coletados entre 2010-2020, porém alguns dados de 2000-2009 foram usados e estão indicados em com um asterisco (*). As estimativas levam em conta dados antes da pandemia do COVID-19, com exceção de quatro inquéritos. ² Os dados da Ásia Oriental não incluem o Japão. ³ Os dados da Oceania excluem Austrália e Nova Zelândia. ⁴ Os dados da América do Norte correspondem apenas os Estados Unidos. Não há estimativa para as regiões da Europa, Austrália e Nova Zelândia. O mapa não estão em escala e não refletem posição territorial legal de países ou delimitações de fronteiras.

A América Latina, Caribe e Oceania apresentam uma menor prevalência de desnutrição infantil. A América Latina e Caribe registraram juntos 5,8 milhões de casos de desnutrição crônica (**Figura 1**), 0,7 milhões de casos de desnutrição aguda moderada a grave (**Figura 2**), dentre as quais cerca de 0,1 milhões de crianças foram severamente afetadas (UNICEF; WHO; WORLD BANK GROUP, 2021). Em relação a subnutrição, o último relatório divulgou que cerca de 1,3 milhões de crianças menos de 5 anos de idade apresentaram baixo peso para idade nas Américas (WHO, 2022).

A Oceania, por sua vez, registrou 0,6 milhões de crianças com desnutrição crônica, 0,13 milhões com desnutrição aguda moderada a grave e 0,05 milhões afetadas por desnutrição aguda grave (UNICEF; WHO; WORLD BANK GROUP, 2021); enquanto, o Oeste do Pacífico registrou cerca de 2,7 milhões de casos de subnutrição em crianças menores de 5 anos de idade (WHO, 2022). Um estudo recente aponta que a pandemia por COVID-19 pode ter exacerbado essa estimativa de desnutrição aguda em 14,3%, apesar de, os efeitos da pandemia não estarem totalmente quantificado (HEADEY et al., 2021).

No Brasil, os dados epidemiológicos de desnutrição são escassos e parecem subestimados. Um grande estudo epidemiológico relatou diminuição de casos de desnutrição infantil no Brasil nos últimos 33 anos, com redução da prevalência de desnutrição crônica de 37,1% em 1974/75 para 7,1% em 2006/2007 e redução de casos de subnutrição de 5,6% em 1989 para 2,2% em 2006/2007 (VICTORA et al., 2011). Dados de maio de 2008 e maio de 2009 relativos à Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) realizada pela Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, por sua vez, mostram uma prevalência de 2,8% de desnutrição aguda e 6,0% de desnutrição crônica ao avaliar 14.580 crianças menores de 5 anos de idade (IBGE, 2010).

Estes dados mostram que o déficit de altura foi mais expressivo em meninas (9,4%) em relação a meninos (8,4%) no primeiro ano de vida, sendo reduzido para 7% no segundo ano de vida e oscilando de 4 a 6% nos dois a quatro anos de idade em ambos os sexos (IBGE, 2010). Segundo a última POF com dados sobre desnutrição no país, a região Norte (8,5%) foi a mais afetada e a região Sul (3,9%) a menos afetada (IBGE, 2010). No entanto, os últimos dados do Relatório Global de Nutrição de 2018 mostram que o Brasil pouco avançou para cumprimento da meta de

nutrição materna e infantil em relação à desnutrição crônica, registrando 7,0% de crianças menores de 5 anos de idade afetadas pela desnutrição crônica e 1,8% de crianças menores de 5 anos afetadas pela desnutrição aguda (GLOBAL NUTRITION REPORTS, 2021). Além disto, vale ressaltar que o Brasil voltou a aparecer no mapa da fome no ano de 2022 (WORLD FOOD PROGRAMME, 2022) e pouco se sabe como isto impactará no desenvolvimento infantil nos próximos anos.

Os resultados gerais demonstraram uma redução no número de casos de desnutrição crônica nos últimos 20 anos - **tabela 2** (UNICEF; WHO; WORLD BANK GROUP, 2021). Contudo, a prevalência mundial de desnutrição crônica infantil é demasiadamente superior a prevalência de desnutrição aguda, aumentando o fardo de morbidade em relação a mortalidade nessas populações (BLACK et al., 2013; GARENNE et al., 2009). Além disso, pouco se sabe qual será o impacto que a crise econômico-social gerada pela pandemia por COVID-19 vai gerar na desnutrição crônica infantil nos próximos anos.

Tabela 2- Prevalência de desnutrição aguda em crianças menores que 5 anos de idade em 2000 e 2020.

Continente	Prevalência	
	Ano 2000 (milhões de casos)	Ano 2020 (milhões de casos)
Ásia	135,9	79
África	54,4	61,4
América Latina e Caribe	10,2	5,8
Europa	2,4	1,8
Oceania	0,4	0,6

Fonte: UNICEF, WHO, WORLD BANK GROUP, 2021.

1.3 Consequências da desnutrição para o indivíduo e para a sociedade

A desnutrição intrauterina ou na primeira infância gera riscos para o indivíduo até a vida adulta. O baixo peso ao nascer, por si só, aumentam substancialmente o risco de mortalidade em neonatos. Black et al. (2008) ao analisarem cinco estudos coortes no Nepal, Índia, Paquistão e Brasil identificaram que a asfixia ao nascer e doenças infecciosas (sepse, pneumonia e diarreia) são as causas de mortalidade mais associados ao baixo peso em recém-nascidos, aumentando em 60% o risco de morte. Ao estendermos a faixa etária para menores de 5 anos de idade, a nutrição inadequada contribui para 45% da mortalidade infantil, no qual as causas mais comuns são parto prematuro, trauma ao nascer e anomalias congênitas, juntamente com asfixia e infecções, como pneumonia, diarreia e malária (WHO, 2020).

A desnutrição, em geral, é associada ao aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas nos primeiros anos de vida (GUERRANT et al., 1992; IRENA; MWAMBAZI; MULENGA, 2011; TALBERT et al., 2012), assim como, infecções recorrentes na infância são associadas a danos na mucosa intestinal, má absorção, inflamação e subsequente falha de crescimento (BERKMAM et al., 2002; MOORE et al., 2001, 2010), resultando, assim, num ciclo vicioso de desnutrição e infecções entéricas (GUERRANT et al., 2008; 2013).

As infecções entéricas recorrentes mesmo quando assintomáticas, chamadas de enteropatia ambiental, tem importante contribuição para o estabelecimento da desnutrição na primeira infância (BARTELT; BOLICK; GUERRANT, 2019). Além disto, estudos mostram que a desnutrição é relacionada com redução da resposta vacinal na infância e na vida adulta (HOEST et al., 2014; MCDADE et al., 2001; MOORE et al., 2004), contribuindo para o aumento de susceptibilidade a doenças infecciosas. O estudo coorte multicêntrico intitulado “Etiologia, Fatores de Risco e Interações de Infecções Entéricas e Desnutrição e as Consequências para a Saúde e Desenvolvimento Infantil - MAL-ED” tem contribuído para melhor compreensão da relação entre desnutrição e infecções entéricas subclínica e clínicas na primeira infância (MAL-ED, 2014).

A partir deste estudo, identificou-se que o aumento na carga de patógenos isolados de fezes é relacionado a diminuição de escore Z peso para idade, subnutrição

(PLATTS-MILLS et al., 2017); que o enteropatógeno *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) foi relacionado a infecções clínicas, subclínicas e crescimento prejudicado (LIMA et al., 2017; 2018); e que o aumento de duração do aleitamento ajuda a prevenir infecções potencialmente inflamatórias (ROGAWSKI et al., 2017). A partir, deste estudo também foi possível desenvolver um método simples de determinação de insegurança alimentar (PSAKI et al., 2012), assim como estabeleceu associação com o aumento da razão lactulose/manitol, um marcador de dano a integridade intestinal, com estado nutricional e infecções por enteropatógenos (LEE et al., 2017). Também identificou associação de biomarcadores para diagnóstico, bem como prognóstico de desnutrição e enteropatia ambiental (GUERRANT et al., 2016). O MAL-ED também permitiu identificar que resistência a hormônio do crescimento estão ligadas a inflamação e infecções entéricas (DEBOER et al., 2017). Mais recente, foi possível quantificar energia, macronutrientes, fibra, 6 vitaminas e 6 minerais da dieta de crianças em fase de introdução alimentar e associar a desnutrição aguda, desnutrição crônica e subnutrição, no qual aumento de fibras e redução de zinco foram associados com desnutrição crônica infantil (MACIEL et al., 2021).

A desnutrição também é associada ao desenvolvimento de doenças crônicas em período tardio, quando presente nos primeiros anos de vida. O baixo peso, altura e índice de massa corporal (IMC) entre os 3 e 4 anos de idade, seguido de um rápido ganho de peso foram associados em estudos coorte a doenças cardiovasculares (BARKER et al., 2005) e intolerância à glicose (BHARGAVA et al., 2012) na vida adulta. Outro estudo identificou que o baixo IMC aos 2 anos de idade foi relacionado a medidas menos favoráveis de colesterol, triglicerídeos, resistência à insulina, pressão arterial e níveis de glicose no teste de intolerância à glicose quando adulto (FALL et al., 2008).

Resultado semelhante foi encontrado em meta-análise de estudo coorte, no qual baixo IMC aos 2 anos de idade foi associado com maior pressão arterial e glicemia na fase adulta (VICTORA et al. 2008). O ajuste do IMC adulto para encontrar associação com IMC na infância mostram que o baixo IMC no segundo ano de vida contribui para o desenvolvimento de síndromes metabólicas, apesar de, o IMC elevado no adulto ter maior relação (DEBOER et al., 2012). O déficit de crescimento na infância também foi relacionado a maiores chances de obesidade, hipertensão (FERREIRA et al., 2008), resistência à insulina (FERREIRA et al., 2008, FLORÊNCIO

et al., 2007) e aumento de colesterol LDL (FLORÊNCIO et al., 2007) em mulheres na vida adulta.

Diversos estudos têm relacionado desnutrição com déficit cognitivo ainda na infância e também na vida adulta (GUERRANT et al., 2008; VICTORA et al., 2008). Crianças com atraso de crescimento linear aos 2 anos apresentaram atraso no ingresso escolar, maiores taxas de repetência e evasão, menores conclusões em ensino fundamental e médio e baixo desempenho escolar (DANIELS; ADAIR, 2004). Além disto, a desnutrição energético proteica nos primeiros anos de vida gera déficit de atenção persistente aos 40 anos, mesmo em paciente reabilitados com sucesso (GALLER et al., 2012). Galler et al. (2013) também sugeriram que um único episódio de desnutrição na primeira infância seguido de reabilitação adequada está associado a mais ansiedade, vulnerabilidade, menor sociabilidade e curiosidade intelectual, maior desconfiança, orientação mais egocêntrica e um menor senso de eficácia ou competência na vida adulta. Estudos mostram que esse déficit cognitivo é decorrente de danos estruturais no cérebro que prejudicam o desenvolvimento motor infantil (PITCHER; HENDERSON-SMART; ROBINDON, 2006) e o comportamento exploratório (BROWN; POLLITT, 1996).

A deficiência de micronutrientes na infância também tem importante contribuição no desenvolvimento de doenças. A deficiência em vitamina A, por exemplo, tem sido associada ao aumento da gravidade em quadros diarreicos (BARRETO et al., 1994; BLACK et al., 2008; KLEMM et al., 2008). Por outro lado, a deficiência de ferro é ligada a redução do QI em crianças, no qual a suplementação de ferro em crianças maiores de 27 meses de idade gera um aumento de 1-2 pontos no QI (SACHDEV; GERA; NESTEL, 2005). A deficiência de iodo é correlacionada com aumento de risco de bócio, hipotireoidismo congênito e déficit cognitivo (BLACK et al., 2008; GLINOER; DELANGE, 2000). Outras deficiências como cálcio, vitamina D, vitamina B12 e ácido fólico também tem sua importância no desenvolvimento. A deficiência de cálcio é associada ao raquitismo (THACHER, 2006), enquanto o baixo crescimento fetal e menor mineralização esquelética são associados à deficiência de vitamina D (HOLICK, 2006).

A falta de vitamina B12 é fator de risco para defeitos no tubo neural e perda fetal precoce, quando na gravidez, ou falha de crescimento, falha na função

neurocognitiva e desenvolvimento global atrasado quando crianças são expostas a deficiência grave na amamentação (RAY et al., 2007). O aumento de risco de má formação do tubo neural e possivelmente pré-eclâmpsia e outros resultados adversos são consequência da deficiência de ácido fólico (TAMURA; PICCIANO, 2006). Além disso, diversos estudos randomizados e controlados por placebo apontam a deficiência de zinco como aumento de risco de morbidade para malária, pneumonia e diarreia (BROOKS et al., 2004; WALKER; BLACK, 2004; SAZAWAL et al., 2007; TIELSCH et al., 2007).

Posto isso, é notório que o impacto gerado pela desnutrição, além de persistente, reflete diretamente na economia da população, gerando custos diretos ou indiretos, como custos de internações, de tratamentos, redução do nível de escolaridade com consequente diminuição do status econômico individual, assim como, baixa produtividade devido à má condição física (GRANTHAM-MCGREGOR et al., 2007; VICTORA et al., 2008). Determinar os custos totais gerados pela desnutrição é um desafio. Uma avaliação sobre os custos globais gerados pela desnutrição sugeriu que cerca de US\$ 3,5 trilhões são gastos por ano com desnutrição (FAO, 2013). Um dado mais recente mostrou que somente em Papua Nova Guiné, um estado da Oceania, os gastos com a desnutrição infantil chegam a US\$ 1,5 bilhões por ano (HURNEY; MAJELLA, 2017). Desta forma, uma atenção maior a esta complexa doença é de grande importância não apenas para o indivíduo, mas para a nação em questão.

1.4 Fisiopatologia da desnutrição

A deficiência nutricional desencadeia respostas fisiológicas complexas em todos os sistemas corporais. Identificar quais as primeiras alterações desencadeadas pela desnutrição é um processo desafiador, mesmo com o avanço da ciência, visto que, esta doença desencadeia uma resposta sistêmica rápida e tem causas multifatoriais na clínica. Contudo, as primeiras alterações na restrição alimentar são metabólicas, com rápida glicogenólise, aumento do consumo de aminoácidos livres, piruvato e lactato e consequente perda de massa muscular; seguida por uma fase posterior de conservação de proteínas e mobilização de gordura, que, por sua vez, gera lipólise e cetogênese, para utilização da energia armazenada (DIPASQUALE et al., 2020). A secreção de hormônios também é afetada pela desnutrição, sendo

observados níveis mais altos de hormônio do crescimento e cortisol e níveis reduzidos de insulina, fator de crescimento semelhante à insulina-1 e tri-iodotiroxina (GROVER; EE, 2009).

Tecidos com alto poder de renovação celular são os mais rapidamente afetados pela deficiência nutricional, causando sinais evidentes de desnutrição, como alterações no peso, circunferência braquial, prega cutânea, manchas no corpo e queda de cabelo (ACF, 2010; GOUVEIA et al., 1999). Por outro lado, sinais clínicos como comprometimento da altura, edema, hepatomegalia, diminuição de circunferência craniana e torácica surgem quando há persistência dos déficits de nutrientes na dieta associada com a fase crítica de desenvolvimento do indivíduo (GERUDE et al., 2002; GOUVEIA, 1999). A redução da massa muscular é associada ao aumento do risco de mortalidade tanto na desnutrição crônica como aguda (OLOFIN et al., 2013). A depleção de leptina, um hormônio produzido pelo tecido adiposo, tem função de aumentar a secreção de linfócitos e citocinas, parece ser a causa para o aumento de risco de mortalidade associado a redução de reservas lipídicas (BARTZ et al., 2014; FERNÁNDEZ-RIEJOS et al., 2010; WELLS; CORTINA-BORJA, 2013).

Os sistemas corporais trabalham em conjunto para manter a sobrevivência do indivíduo e a deficiência nutricional acaba por afetar todos os sistemas. Por exemplo, a desnutrição é reportada por desencadear alterações hidroeletrolíticas importantes, como retenção de sódio e depleção de potássio intracelular em casos de *kwashiorkor*, provavelmente devido a diminuição da atividade da bomba de sódio dependente de energia (BATTOOL et al., 2015). Além disto, a desnutrição causa atrofia de diversos órgãos corporais, como coração, rins, timo e especialmente a musculatura (DESAI et al., 1996). No sistema respiratório, há diminuição da ventilação por minuto e resposta ventilatória prejudicada à hipóxia, que podem ser decorrentes da redução da massa muscular torácica, diminuição da taxa metabólica e desequilíbrios eletrolíticos (hipocalemia e hipofosfatemia) (DIPASQUALE et al., 2020; GROVER; EE, 2009).

A desnutrição crônica também é associada ao aumento da pressão arterial, sendo um forte indício de desenvolvimento de hipertensão na idade adulta (SESSO et al., 2004; SAWAYA et al., 2005). Entretanto, na desnutrição aguda grave o débito

cardíaco, a frequência cardíaca e a pressão arterial estão reduzidas, a circulação central assume maior importância do que a circulação periférica e os reflexos cardiovasculares estão alterados, causando hipotensão postural e diminuição do retorno venoso (NGO; ORTIZ-ANDRELLUCCHI; SERRA-MAJEM, 2016). Além disso, como citado anteriormente, o sistema nervoso também é afetado pela deficiência nutricional. A desnutrição intrauterina prolongada ou grave é associada a pior desenvolvimento, a 15% de anormalidade no desenvolvimento cognitivo e a maior vulnerabilidade do sistema de memória e reconhecimento verbal e visual, o que é consistente com o desenvolvimento acelerado dessas estruturas no período intrauterino e neonatal (GEORGIEFF, 2007). Estudo recente mostrou que a desnutrição materno-fetal por dieta multideficiente causou alterações na barreira hematoencefálica, aumento de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo associado a comportamentos de ansiedade (DE AQUINO et al., 2019).

Dentre os sistemas rapidamente afetados pela desnutrição temos o sistema digestivo, devido à sua alta capacidade de renovação (GOUVEIA et al, 1999). Alterações na mucosa intestinal são comumente registradas em diversos estudos. Em geral, observa-se atrofia de vilosidades, ramificação de criptas, estreitamento da borda em escova (BRUNSER; CASTILHO; ARAYA, 1976; QUARENTEI, 1983; VELA, 1974; WELSH et al., 1998) e aumento da permeabilidade intestinal (SULLIVAN et al., 1991; WELSH et al., 1998).

No entanto, as alterações morfológicas parecem sofrer influências de outros fatores. Por exemplo, crianças com *kwashiorkor* mostraram redução da altura de vilos e criptas no duodeno e jejuno (STANFIELD et al., 1965). Sullivan et al. (1991), por outro lado, observaram hipertrofia de criptas e infiltrados de linfócitos em crianças gravemente acometida com *kwashiorkor* e *marasmo*. Pires et al. (2003) identificaram que a diarreia persistente em crianças desnutridas diminui gradativamente a altura de vilos, a razão vilo:cripta e espessura total da mucosa conforme aumenta o grau de severidade. Um importante estudo também mostrou redução no número de células epiteliais, de células de Paneth e degeneração das criptas (BÉHAR et al., 2016). Além disso, evidências sugerem que alterações no intestino, como alterações morfológicas e inflamação são cruciais para o estabelecimento das morbidades associadas à desnutrição (ATTIA et al., 2017).

O tecido linfoide, encontrado em todo o trato gastrointestinal, tem importante função na vigilância imunológica (REED; WICKHAM, 2009). Durante o processo de desnutrição é observado uma resposta inflamatória na barreira intestinal, como redução da produção de IL-10, aumento do número e atividade de células CD3 e macrófagos na lâmina própria, redução da atividade linfocitária e de macrófagos no enterócito (WELSH et al., 1998), assim como diminuição de estímulo de células T (HUGHES et al., 2009) e aumento de biomarcadores de inflamação, como mioleoperoxidase (MPO), lactoferrina e calprotectina fecal (PRATA et al., 2016). Esse distúrbio no sistema imune juntamente com alterações na barreira morfofuncional intestinal facilitam a translocação de antígenos, desencadeando um estado pró-inflamatório sistêmico (GUERRANT et al., 2008, 2013, 2016).

Estudo mostra que células mononucleares do sangue periférico de crianças desnutridas apresentam expressão reduzida de citocinas de diferenciação de células T auxiliares (Th1) e expressão aumentada de citocinas Th2, comprometendo a capacidade de eliminação de determinados patógenos (BADR et al., 2011; GONZALEZ-TORRES et al., 2013). Além disso, na desnutrição aguda grave também é reportado redução de produção de linfócitos no timo, glândulas linfoides atrofiadas e diminuição da produção de proteínas do complemento, o que corroboram para comprometimento do sistema imune (NGO; ORTIZ-ANDRELLUCCHI; SERRA-MAJEM, 2016). Esse comprometimento da resposta imune, aumenta a susceptibilidade as infecções entéricas que, por sua vez, são associadas a má absorção (LINDENBAUM et al., 1966; 1971) ou perda de nutrientes, principalmente quando associada a diarreia (GUERRANT et al., 2013). Desta forma, inicia-se um ciclo vicioso de desnutrição e infecção entérica, anteriormente comentado, que compromete o crescimento através da modulação do eixo GH/IGF-1 (AMADI et al., 2017; DEBOER et al., 2017; HARPER et al., 2018; WELSH et al., 1998; WONG et al., 2016).

Fatores ambientais e dietéticos são cada vez mais reconhecidos por influenciar na composição e função da microbiota intestinal na infância (DE FILIPPO et al., 2010). Estudo mostra que crianças desnutridas possuem mais enteropatógenos (KOTLOFF, 2017) e quanto maior o número de patógenos isolados nas fezes, menores os escores Z de peso para idade e altura para idade (PLATTS-MILLS et al., 2017). Fatores como uma dieta monótona contendo carboidratos dietéticos não

digeríveis específicos (DE FILIPPO et al., 2010) podem ser uma vantagem seletiva aos micróbios que metabolizam esses substratos (THAXTON et al., 2018). Além disso, a desnutrição pode afetar a liberação de peptídeos antimicrobianos que eliminam um subconjunto de micróbios comensais e favorecem outros grupos bacterianos (DE MEDINA et al., 2014). Estudo mostra que a principal característica da microbiota em crianças desnutridas é um desenvolvimento imaturo, determinado por biomarcadores de táxons bacterianos que são altamente discriminatórios por idade em crianças saudáveis (SUBRAMANIAN et al., 2014).

Diante do exposto, é evidente a complexidade da desnutrição e devido às limitações éticas para estudos clínicos, diversos modelos animais têm contribuído para o desvendamento da fisiopatologia associada à diferentes deficiências nutricionais (PARK et al., 2017; PINHEIRO et al., 2013; SAMPIAO et al., 2016).

1.5 Modelos experimentais de desnutrição: importância e limitações

Os modelos experimentais indutores de desnutrição vêm ajudando a compreender os efeitos da deficiência proteica, energética e de micronutrientes específicos no desenvolvimento saudável (**Tabela 3**). No entanto, alguns modelos genéticos de nocaute de proteínas específicas são citados por causar desnutrição (SALAMEH et al., 2019).

A proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) é uma enzima que desempenha função de regular a homeostase energética celular e quando foi deletada do fígado de camundongos desencadeou uma maior perda de peso em relação a camundongos selvagens alimentados com dieta pobre em proteínas e rica em carboidratos por 3 semanas (CHALVON-DEMERSAY, 2017). O nocaute de claudina-2 e claudina-15 em camundongos também gerou perda de peso severa, culminado em morte precoce por comprometimento da adequada absorção de nutrientes em camundongos recém desmamados (WADA et al., 2013). Dessa forma, estes modelos genéticos mostram a importância de determinadas proteínas no desenvolvimento saudável, apesar de, terem pouca representatividade e relevância clínica.

Dentre os modelos de deficiência nutricional temos os modelos de restrição calórica. Estes modelos são importantes por demonstrar os efeitos da deficiência

energética nos diversos sistemas corporais, incluindo o impacto na função imunológica, condição geralmente comprometidas em crianças desnutridas (IBRAHIM et al., 2017). Os modelos experimentais de restrição calórica levam a desnutrição, impactam na homeostase corporal total e consistem em restringir o consumo da ração em relação ao grupo controle (SALAMEH et al., 2019). Jahng et al. (2007) analisaram os efeitos da restrição calórica crônica em ratos recém desmamados ao alimentar os animais com 50% a menos de ração que o grupo controle por 60 dias (**Tabela 3**). Outro modelo de restrição calórica avaliou os efeitos no timo ao disponibilizar 30% a menos de ração para o grupo desnutrido do que para os grupos controles (PAN et al., 2018). Na literatura, também é citado modelo de restrição calórica de 25% (NÚÑEZ et al., 2013) e 15% (PARK et al., 2017) em relação ao controle (**Tabela 3**). Entretanto, esses modelos podem ser estressantes para roedores, nos quais níveis aumentados de corticosterona (MEHUS; PICKLO, 2017), aumento de ansiedade e depressão (JAHNG et al., 2007) foram reportados.

Os modelos animais mais utilizados são os de deficiência proteica, uma vez que, a desnutrição energético-proteica ou desnutrição aguda possuem alta prevalência em países em desenvolvimento e tem alta associação com a mortalidade infantil (NGO; ORTIZ-ANDRELLUCCHI; SERRA-MAJEM, 2016). Esses modelos vêm buscando compreender principalmente o impacto da deficiência proteica grave no sistema imune e gastrointestinal (**Tabela 3**). No geral, estes modelos utilizam dietas com 0% (BELMONTE et al., 2007) a 7% (BROWN et al. 2015) de proteína em relação a dieta controle (14% a 23% de proteína). A principal diferença entre estas dietas são o aumento dos percentuais de carboidratos (15 a 41%) e de lipídeos (20 a 51%) em relação a dieta controle (BELMONTE et al., 2007; CORWARE et al., 2014; DALVI et al., 2017; MAYNERIS-PERXACHS et al., 2016).

Algumas dietas deficientes em proteínas possuem quantidades de lipídeos semelhantes as dietas controles, como a dieta 2% de proteína (MAYNERIS-PERXACHS et al., 2016; SANTOS et al., 2016) e a dieta 4% de proteína, que possuem mais carboidratos (81 a 82,2%) e mesma quantidade lipídeos (13,4 a 14%) em relação a dieta controle (DALVI et al., 2017; EYZAGUIRRE-VELÁSQUEZ et al., 2017; FOCK et al., 2008). A dieta 2% de proteína foi utilizada em alguns estudos para avaliar os efeitos na barreira morfofuncional, sistema imunológico e metabólica (MAYNERIS-

PERXACHS et al., 2016; SANTOS et al., 2016), assim como induzir modelos de desnutrição e infecção por patógeno específico (GIALLOUROU et al., 2018).

A dieta 7% de proteína, que neste trabalho denominamos de semelhante a dieta básica regional (DBR), uma importante dieta que será discutida mais à frente, foi usada para mostrar que a importância da relação entre dieta e exposição a microbiota específica para o estabelecimento da enteropatia ambiental (**Tabela 3**) (BROWN et al. 2015). As dietas com deficiência proteica são empregues tanto em modelos de desnutrição materno fetal, como em animais recém desmamados, uma vez que, a desnutrição materno fetal e nos dois primeiros anos de vida são associados com várias consequências a longo prazo (ISLAM; RAHMAN; MAHALANABIS, 1994).

Os modelos experimentais de deficiência de micronutrientes também são importantes para identificar a função dos micronutrientes no desenvolvimento saudável. Dentre eles, a deficiência de zinco se torna um alvo devido a sua alta prevalência em crianças lactentes de países de baixa renda (AHSAN et al., 2021), associação com a mortalidade infantil (CHOI; LIU; PAN, 2018; KREBS; MILLER; HAMBIDGE, 2014), o crescimento prejudicado, anomalias neuronais, anemia ferropriva e doenças cardiovasculares (AHSAN et al., 2021). Estudos mostram que existe um sinergismo da deficiência de zinco com infecções por patógenos específico e consequente agravamento dos sintomas da desnutrição (BOLICK et al., 2014; GIALLUROU et al., 2018; QS MEDEIROS et al., 2019). No entanto, os modelos *in vivo* de deficiência em zinco utilizam dietas com baixíssimo teor de zinco. Na literatura, são citadas dietas com 30 mol/kg (WOUWE; VELDHUIZEN, 1996), menos que 2 ppm (MAYNERIS-PERXACHS et al., 2016), dieta com 1,5 ppm de zinco (ZHONG et al., 2013) e dieta com 0% de zinco (BOLICK et al., 2014), sem alterar o percentual de macronutrientes e calorias. Além disso, nenhuma dieta até o momento avaliou a associação de deficiências de macronutrientes e zinco em modelos animais de desnutrição.

Apenas três dietas são baseadas na composição alimentar da população de uma região específica: a dieta básica regional (DBR), dieta milho vegetal e a dieta M8. A DBR é uma dieta que mimetiza a composição alimentar da região do semiárido brasileiro, bastante utilizada na experimentação animal, que possui menos proteína (7%) e lipídeo (5%) e mais carboidrato (88%) em relação a dieta controle (65% de

carboidrato, 20% de proteína e 15% de lipídeo) (TEODÓSIO et al., 1990). A dieta Milho Vegetal, por outro lado, foi baseada nos alimentos predominantes da dieta de crianças do Malawi com *kwashiorkor* e possui 35% a menos de proteína, 47% a menos de lipídeo, 134% a mais de carboidrato e 53% a mais de fibra em relação a dieta controle (FOLLIS, 1957). A dieta M8, por sua vez, corresponde a outra dieta baseada nos alimentos mais consumidos pela população da Malawi e possui menos proteína (4,36%), menos lipídeo (3,66%) e mais carboidrato (26,1%), além de incluir no teste a influência de fibras (4,79%) (BLANTON et al., 2016). Estas dietas têm em comum serem baseadas nos alimentos mais consumidos pelas populações específicas, sem considerar se a quantidade de macronutrientes, vitaminas e minerais são equivalentes as consumidas pelas mesmas populações.

Diante disto, a principal limitação dos modelos experimentais de desnutrição são a ausência de quantificação de energia, macronutrientes e micronutrientes da dieta de crianças desnutridas que comprovem a similaridade das dietas experimentais com a clínica. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo formular uma nova dieta de desnutrição, dieta MAL-ED, com base num estudo recente que quantificou a energia, macronutrientes e micronutrientes da dieta complementar de crianças desnutridas de sete países de baixo poder socioeconômico pertencentes ao estudo coorte de desnutrição e infecção entérica (MAL-ED, do inglês *Malnutrition-Enteric Diseases*) (MALCIEL et al., 2021). Nossa hipótese é que a nova dieta MAL-ED irá induzir um quadro clínico de desnutrição em camundongos recém-desmamados, consistindo no primeiro modelo murino de desnutrição que mimetizar as deficiências nutricionais comuns nas dietas de crianças em fase de alimentação complementar.

Tabela 3 – Modelos experimentais de deficiência nutricional e efeitos nos parâmetros corporais, intestino, sistema imunológico e demais sistemas.

Modelo pré-clínico	Parâmetros corporais	Intestino	Sistema imunológico	Demais sistemas corporais	Referência
Restrição calórico					
-50% de energia	Redução do peso	-	-	Aumento da ansiedade e depressão	JAHNG et al., 2007
-30% de energia	Redução do peso	Não alterou a permeabilidade intestinal	Redução dos níveis sistêmicos de TNF		PAN et al., 2018
-25% de energia	Redução de peso	-	Atrofia do timo	Aumento dos níveis de corticosterona	NÚÑEZ et al., 2013
-15% de energia	Redução de peso	-	Redução dos níveis de MCP-1 no fígado e nos adipócitos	-	PARK et al., 2017
Deficiência proteica					
0% de proteína					
0,7% de proteína					
2% de proteína-desnutrição pós-desmame	Redução de peso	-	Aumento de MPO e lipocalina-2 nas fezes	Diversidade da microbiota mais alta: expansão de Verrucomicrobia, perda de abundância de Firmicutes e permanência de Bacteroidetes	BARTEL et al., 2017; MAYNERIS-PERXACHS et al., 2016
4% de proteína-desnutrição pós-desmame	Redução de peso	Aumento de permeabilidade a pequenas moléculas no íleo e cólon e diminuição da expressão de occludina nos mesmo segmentos	-	Redução dos níveis plasmáticos de zinco	EYZAGUIRRE-VELASQUEZ et al., 2017
6% de proteína – desnutrição materno-fetal	Redução de peso no nascimento	Aumento de dissacarídeos no intestino; aumento da expressão de SGLT-1, GLUT-2 e PEPT-1 no duodeno	-	-	PINHEIRO et al., 2013
Dieta semelhante a DBR-desnutrição pós desmame		Sem atrofia de vilos, indicativo de dano a integridade intestinal, aumento de claudina-2 e redução de ZO-1	-	-	BROWN et al., 2015

Deficiência de zinco					
0% de zinco	Reduziu o peso apenas de animais infectados	Presença de diarreia, reduziu vilos/cripta e aumentou mucina no íleo, quando infectado por EAEC	Aumento de KC e MCP1 e redução de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-23 α e Csf3 quando infectado por EAEC	Aumento de susceptibilidade a infecção por EAEC	BOLICK et al., 2014
	Reduziu o peso de animais infectados	Diarreia, aumento de secreção de muco, embotamento de vilos no íleo e aumento de infiltrado celular, edema e secreção de muco no cólon, quando infectados por <i>Campylobacter jejuni</i>	Aumento de lipocalina-2 e MPO no íleo, quando infectados por <i>Campylobacter jejuni</i>	Aumento de metabólitos associados a inflamação e estresse oxidativo, quando infectados por <i>Campylobacter jejuni</i>	GIALLOUROU et al., 2018
< 1,5 ppm de zinco	Não alterou o peso	-	-	Fator de risco para doença hepática alcoólica	ZONG et al., 2013
	Não alterou o peso	-	Sem inflamação	Alterações menos pronunciadas na microbiota e metaboloma que dieta deficiente em proteína (2%)	MAYNERIS-PERXACHS et al., 2016
< 2 ppm de zinco	Reduziu o peso de animais infectados	Diarreia, fezes com sangue, maior colonização no cólon, sem aumentar os escores histopatológicos, quando infectados por <i>Shigella flexneri</i>	Aumento de lipocalina-2, MPO, TNF- α e IL-10 no ceco, quando infectados por <i>Shigella flexneri</i>	Aumento de susceptibilidade a infecção por <i>Shigella flexneri</i>	QS MEDEIROS et al., 2019
	Retardo do crescimento	-	-	-	VAN WOUWE; VELDHUIZEN, 1996
Baseadas na composição alimentar de populações					
DBR- desnutrição materno-fetal e pós-desmame	Redução do peso e menor ganho de peso	Aumento da profundidade de criptas no jejuno e redução de células caliciformes, aumento de translocação de bactérias	-	-	QUEIROZ et al., 2014
		Atrofia de cripta; redução da corrente curto circuito basal no íleo;	-	-	SAMPAIO et al., 2016

		aumento dos níveis de transcritos de PEP-1, SGLT-1, claudina-2 e ocludina e redução dos níveis de SN2			
		Redução da expressão de claudina-3 no jejuno; atrofia de vilos e criptas no jejuno; redução da resistência elétrica basal; indicativo de dano a integridade intestinal	-	-	UENO et al., 2011
Milho vegetal	Redução de peso e menor crescimento	Embotamento de vilos e criptas	-	-	LYKKE et al., 2013; MAY et al., 2018
		-		Esteatose hepática e edema bilateral	FOLLIS, 1957
M8	Menor peso e menor massa magra	-	-	Microbiota imatura (22 espécies), predominância de <i>Clostridium neonatale</i>	BLANTON et al., 2016

Fonte: Autor.

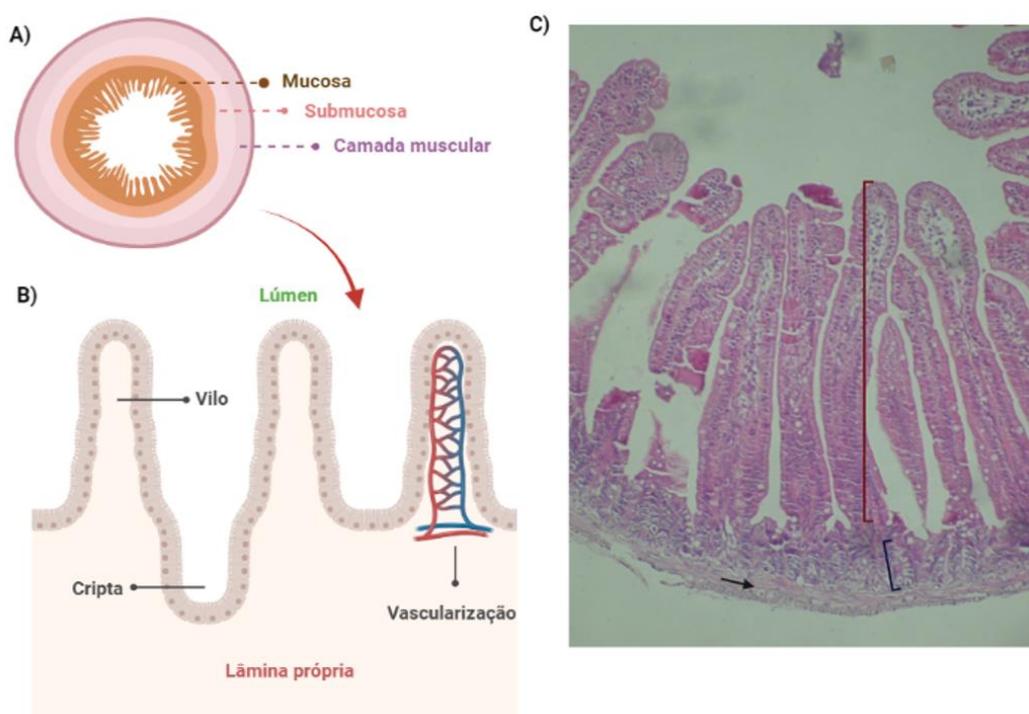
Sumarização dos resultados encontrados para as diferentes dietas experimentais indutoras de desnutrição nos diversos sistemas corporais.

1.6 Barreira morfofuncional intestinal

1.6.1 Componentes extracelulares e componentes da barreira epitelial intestinal

O epitélio gastrointestinal tem a função de separar a face interna do organismo da face externa, assim como apresenta função de digestão, absorção e secreção de eletrólitos e água (MADARA, 1991). No entanto, o espaço luminal contém diversos compostos sendo digeridos e uma vasta gama de substâncias nocivas, inclusive microrganismos com potencial patogênico, o que confere ao epitélio intestinal uma importante função imunológica (MADARA, 1991; TURNER, 2009).

Figura 3 – Arquitetura do epitélio do intestino delgado.



Fonte: Autor.

Desenho representativo e fotomicrografia da barreira morfofuncional intestinal. A) Esquema representativo da secção transversal do intestino delgado, especificando as regiões da mucosa intestinal: mucosa (vilos, criptas e lâmina própria), submucosa, camada muscular. B) Ampliação esquemática mostra a arquitetura de vilos, criptas, lâmina própria juntamente com a vascularização no vilão. O vilão corresponde a parte do epitélio que se estende para o lúmen intestinal e a cripta uma invaginação do epitélio na mucosa intestinal. C) Fotomicrografia do intestino delgado de camundongo C57BL/6 machos. Os vilos estão representados pela linha vermelha, a cripta pela linha preta e a camada muscular pela seta preta.

A barreira epitelial intestinal é formado por uma única camada de células que repousam sob a lâmina própria e juntas se dobram, formando os vilos e as criptas, **Figura 3** (MADARA, 1991). As vilosidades se estendem para o lúmen intestinal e as

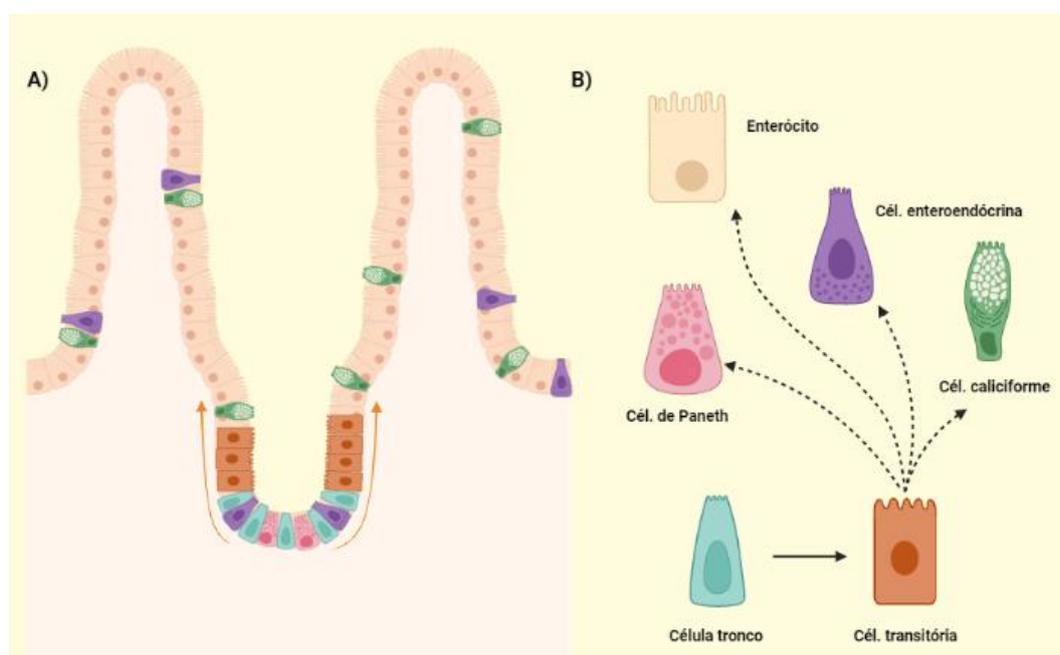
criptas são invaginações epiteliais na mucosa do intestino (PETERSON; ARTIS, 2014). A lâmina própria é composta por tecido conjuntivo, vasos linfáticos e vasos sanguíneos que são responsáveis por fornecer para o epitélio nutrientes, hormônios para secreção, células do sistema imune para proteção do organismo, bem como possui a função de absorver os nutrientes resultantes da digestão (REED, 2009). O epitélio e a lâmina própria, por sua vez, são sustentados pela submucosa, pouco visível em camundongos, e duas camadas de músculo liso, uma disposta longitudinalmente e outra transversal (MADARA, 1991).

O epitélio intestinal possui alta capacidade de renovação. As criptas são responsáveis por esse potencial proliferativo devido às células-tronco intestinais pluripotentes que são capazes de se auto-renovar, proliferar e diferenciar em células abortivas ou células secretórias (células caliciformes, células de Paneth ou células enteroendócrinas), **Figura 4** (PETERSON et al., 2015). Experimentos de marcação com timidina tritiada ou BrdU (bromodesoxiuridina) mostram que as células-tronco intestinais estão próximas a base das criptas, na quarta posição após a célula do fundo, e se auto-renovam poucas vezes (RADTKE; CLEVERS, 2005). As células-tronco intestinais se proliferam e dão origem as células transitórias, que possuem capacidade de proliferação limitada, não têm características de células troncos, e sua progênie é destinada a se diferenciar e migrar para o ápice do vilão (CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006; RADTKE; CLEVERS, 2005). Várias criptas fornecem células para um único vilão (RADTKE; CLEVERS, 2005). Este processo de renovação do epitélio intestinal ocorre em torno de 24 a 48 horas (RADTKE; CLEVERS, 2005).

As células epiteliais mais abundante são os enterócitos, também chamados de células absorptivas ou células colunares (**Figura 4**). Os enterócitos são especializados na função digestiva e metabólica, caracterizados pela presença de microvilosidades em sua superfície apical (PETERSON; ARTIS, 2014). O epitélio intestinal também apresenta outras células com importantes funções como células de *Paneth*, caliciformes e células enteroendócrinas (**Figura 4**). As células de *Paneth* estão dispersas na região inferior das criptas e são responsáveis por secretar peptídeos antimicrobianos, como lizosima e defensinas, para proteger as células-tronco próximas (PETERSON; ARTIS, 2014). As células caliciformes produzem e secretam mucinas, glicoproteínas, com o intuito lubrificar o epitélio intestinal e criar

uma barreira que impede que partículas grandes, incluindo patógenos, entrem em contato com a camada de células epiteliais (CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006). Por outro lado, as células enteroendócrinas desempenham a função de secretar vários hormônios intestinais, dentre os quais catecolaminas e peptídeos (CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006). Linfócitos intraepiteliais também são encontrados na barreira epitelial intestinal e estão localizados acima da membrana basal, mas subjacentes à junção firmes (TURNER, 2009).

Figura 4 – Tipos celulares e distribuição das células constituintes da barreira epitelial intestinal.



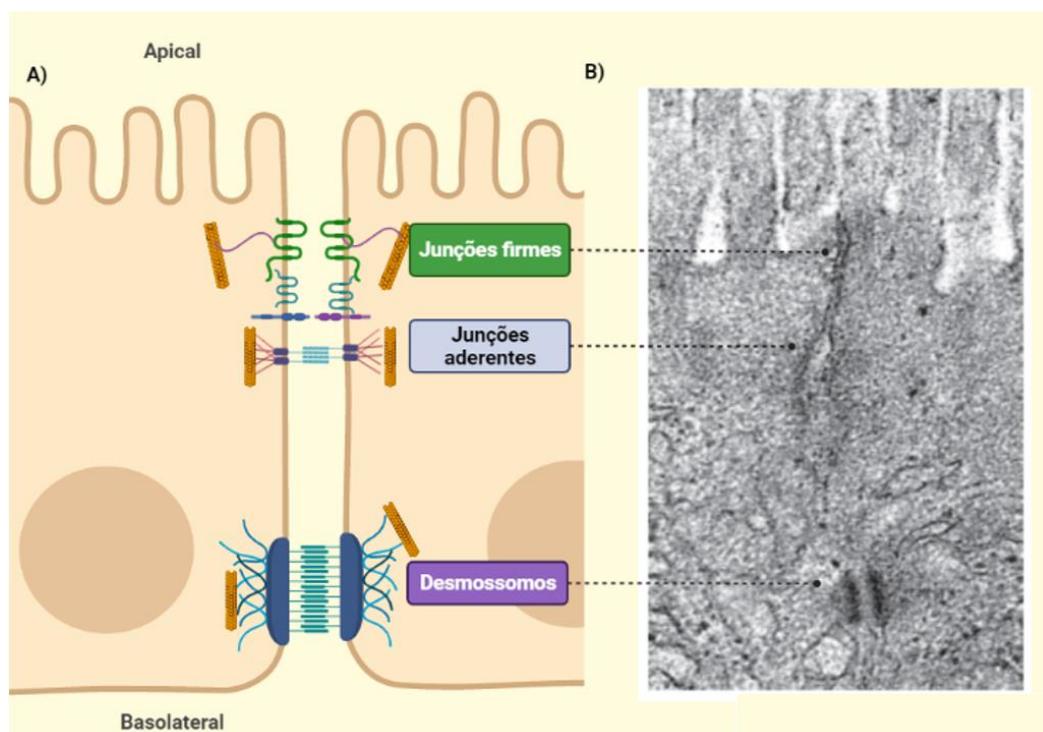
Fonte: Autor, baseado em Turner (2009).

Legenda: A) Esquema representativo da barreira epitelial intestinal, com duas vilosidades e uma das criptas que contribuem para a renovação do seu epitélio. As células tronco ficam na base da cripta, próximo as células de Paneth e células enteroendócrinas. Acima das células-tronco estão as células transitórias (progenitores em divisão, alguns deles já parcialmente diferenciados); e acima, encontram-se células diferenciadas. As setas (laranja) apontam para direção dos vilos, direção a qual as células das criptas se dividem. B) Existem quatro classes de células terminalmente diferenciadas: células absorptivas ou enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas. Os enterócitos têm uma borda em escova, também conhecida como microvilosidades, em sua superfície apical. As células caliciformes secretam muco e o ápice do seu citoplasma é geralmente distendido com grânulos secretores cheios de muco. As células enteroendócrinas são menores e secretam vários hormônios intestinais. As células de Paneth, encontram-se apenas no fundo das criptas e secretam peptídeos antimicrobianos.

O epitélio intestinal, quando intacto, são compostos por três complexos juncionais: junções firmes, junções aderentes e desmossomos, **Figura 5** (TURNER, 2009). As junções firmes estão localizadas na região apical dos enterócitos, tem a

função principal de regular a permeabilidade paracelular a solutos e são constituídas de um complexo de diversas proteínas transmembranas, proteínas citoplasmáticas e moléculas reguladoras (TURNER, 2009). As junções aderentes são formadas por proteínas transmembranas denominadas de caderinas, distribuídas da seguinte maneira: a cauda da E-caderina se liga a catenina- δ 1 e β -catenina, que, por sua vez, se liga a actina do citoesqueleto (TURNER, 2009). Esse complexo juncional é responsável pela adesão entre as células epiteliais e sua ruptura resulta na perda do contato de célula-célula, célula-matriz e polarização celular, além de ocasionar apoptose prematuro por sinalização de células ineficazes (HERMISTON; GORDON, 1995).

Figura 5 – Anatomia do complexo juncional de células epiteliais intestinais.



Fonte: Autor, baseado em Turner (2009).

Imagem representativa e eletromicrografia da anatomia dos complexos juncionais que compõem o epitélio intestinal. A) Imagem representativa do complexo juncional de células epiteliais intestinais. No ápice, encontra-se o complexo de junções firmes com seus componentes estruturais: claudina (verde), ocludina (azul) e ZO-1 (roxo) ligada à cadeia de actina (laranja). Em seguida, o complexo de junções aderentes e a localização de seus componentes estruturais ligados a cadeia de actina (laranja). Na região basolateral, o complexo desmossomos com seus respectivos componentes estruturais (desmoglinas, desmocolina, desmoplaquina, placoglobina e filamentos de queratina) ligados a cadeia de actina (laranja). B) Eletromicrografia da barreira epitelial intestinal com indicação dos complexos juncionais citados acima.

Ambos os complexos junções firmes e junções aderentes são conectadas ao citoesqueleto através de um anel perijuncional de actina e miosina (**Figura 5**) (TURNER, 2009). Na região mais basolateral estão os desmossomos, constituindo-se as principais junções adesivas intercelulares nas membranas basolaterais das células epiteliais e em outros tecidos (HUBER, 2003). Este complexo juncional têm a função de manter a adesão e comunicação intracelular entre as células epiteliais adjacentes, fornecendo locais de ancoragem para filamentos intermediários importantes para a manutenção da arquitetura tecidual (HUBER, 2003). São compostos por interações entre os filamentos de desmogleína, desmocolina, desmoplacina e queratina (TURNER, 2009). Nesse trabalho, iremos focar nas alterações das junções firmes frente ao desafio com a nova dieta MAL-ED, uma vez que, sua adequada formação é de extrema importância para permeabilidade paracelular e para a adequada absorção de carboidratos, proteínas e lipídeos (WADA et al., 2013).

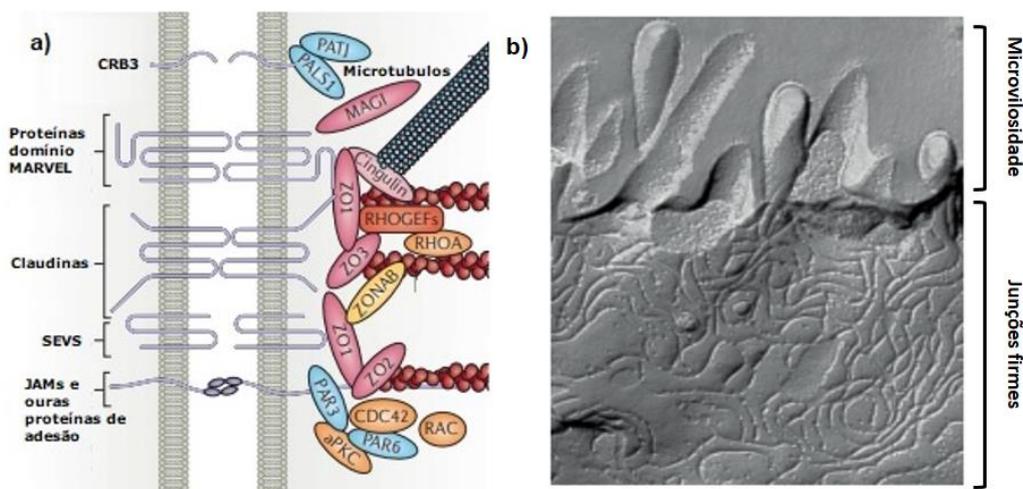
1.6.2 Junções firmes: função, aspectos estruturais e regulação

As junções firmes estabelecem a formação de barreira em vários compartimentos dos corpos e sua principal função consiste em restringir o fluxo paracelular de acordo com o tamanho e carga dos solutos, contribuindo para manutenção da homeostase em órgãos e tecidos (ZIHNI et al., 2016). São estruturas complexas e altamente dinâmicas, formada por mais de 40 proteínas que se dividem em proteínas transmembranares e proteínas citoplasmáticas (SCHNEEBERGER; LYNCH, 2004). Os domínios extracelulares formam a barreira seletiva através das interações hemofílicas e heterofílicas com as células adjacentes (SUZUKI et al., 2013).

As principais proteínas transmembranares são as claudinas e as proteínas do domínio MARVEL, que incluem as ocludinas, tricelulina e MARVEL3D (**Figura 6**) (ZIHNI et al., 2016). O domínio MARVEL são um módulo hélice de quatro domínios transmembranares, geralmente associados a microdomínios de membrana ricos em colesterol (ZIHNI et al., 2016). Outras proteínas também fazem parte do complexo transmembranares, como trispan, substância epicárdica de vasos sanguíneos (SEVS) e um grupo de proteínas de adesão transmembrana de intervalo único, que incluem as moléculas de adesão juncional (JAMs, do inglês *junctional adhesion molecules*), angulinas, receptor de adenovírus e vírus coxsackie (ZIHNI et al., 2016).

As proteínas citosólicas, também chamadas de proteínas de placas, são uma rede complexa de proteínas que interagem com os microtúbulos, actina e com os domínios citoplasmático das proteínas transmembranares, **Figura 6** (ZIHNI et al., 2016). As proteínas citoplasmáticas são caracterizadas por possuírem domínios PSD95–DlgA–ZO-1 (PDZ) e por regularem a função e estrutura do complexo devido sua associação com o citoesqueleto (SUZUKI et al., 2013; ULLUWISHEWA et al., 2011).

Figura 6 – Anatomia das junções firmes das células epiteliais intestinais.



Fonte: adaptado de Zihni et al. (2016, p. 2).

Legenda: a) Breve visão das principais proteínas formadoras de junções firmes. As proteínas transmembranares estão representados em cinza no lado esquerdo, dentre elas temos os fragmentos de proteínas homóloga 3 (CRB3); em seguida, as proteínas do domínio MARVEL, como a ocludina, tricelulina e proteína contendo domínio MARVEL 3. As claudinas são representadas mais abaixo, seguidas das substância epicárdica dos vasos sanguíneos (SEVS) e as moléculas de adesão juncional (JAMs) e outro tipo de proteínas de adesão. No lado direito, estão representadas as proteínas citosólicas adaptadoras e ligantes do citoesqueleto (ovais rosa) e bem como proteínas de polaridade (ovais azuis). As proteínas ligantes representadas são: zonula ocludens (ZO) ZO1, ZO2 e ZO3; cingulina; guanilato quinase associada à membrana invertida (MAGI). As proteínas de polaridade representadas incluem: particionamento defeituoso 3 (PAR3) e PAR6; proteína associada ao Lin-1 1 (PALS1); e junção estreita associada a PALS1 (PATJ). Alguns componentes de sinalização associados a junções firmes (ovais laranjas) representadas são: proteína quinase C atípica (aPKC); CDC42, RAC e RHOA, que são RHO GTPases; e seus reguladores, fatores de troca de nucleotídeos de guanina para RHO de pequenas GTPases (RHOGEFS; retângulo vermelho). Além disso, uma interação entre ZO1 e o regulador transcricional ZO1-associado proteína de ligação a ácido é mostrada (oval amarelo - ZONAB). A imagem também representa a associação das proteínas citosólicas com microtúbulos (filamentos em azul) a e filamentos de actina (filamentos ovais em laranjas). b) Eletromicrografia de criofratura região apical de células epiteliais intestinais mostrando as microvilosidades e a rede de junções firmes.

A regulação e interação das junções firmes com actina e miosina se dá por diversas proteínas de sinalização, como a proteína quinase C (PKC, do inglês *protein kinase C*), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK, do inglês *Mitogen*

Activated Protein Kinases), miosina quinase de cadeia leve (MLCK, do inglês *mitogen-activated protein kinases*) e família Rho de pequenas GTPases (ULLUWISHEWA et al., 2011). Existem diversas isoformas de PKC no intestino, dentre as quais PKC épsilon inibem a secreção de Cl⁻ e a translocação apical PKC alfa diminui a resistência transepitelial (RT) (SONG et al., 2001). O MAPK é estimulado por fatores de crescimento e estresse, como a prevenção de ruptura das junções frente ao estresse gerado pelo peróxido de hidrogênio (PLOTNIKOV et al., 2010).

As MLCK, por outro lado, regulam a contração do anel actina e miosina e sua inibição previne o aumento da permeabilidade nas junções firmes (TURNER et al., 1997). A família Rho de pequenas GTPases regulam a estrutura e função das junções firmes, assim como desempenham papel importante sob o anel de actomiosina perijuncional (NUSRAT et al., 1995). A fosforilação das proteínas formadoras das junções firmes influenciam a função de barreira. Por exemplo, uma menor fosforilação de ZO-1 em células de rim canino foi reportada por aumentar a resistência transepitelial (STEVENSON, et al., 1989). Além disso, a fosforilação de ocludinas é importante para a sua associação nas junções firmes (WONG, 1997).

O transporte transcelular também pode ativar eventos de sinalização intracelular que regulam a função barreira das junções firmes. Isso pode ocorrer quando as concentrações de nutrientes no lúmen excedem a capacidade dos cotransportadores apicais de nutrientes e Na⁺, como forma de amplificar a absorção transcelular de nutrientes (TURNER et al., 2009). Nesse caso, o cotransporte de Na⁺-nutrientes desencadeiam contração do anel de actomiosina perijuncional (MADARA; PAPPENHEIMER, 1987), através da ativação de MLCK (TURNER et al., 2009). Assim, as junções firmes possuem uma grande diversidade de proteínas formadoras e regulação extremamente complexa, dessa forma, iremos focar em três proteínas formadoras de junções firmes: claudinas, ocludinas e zonulas ocludens (ZO).

1.6.2.1 Claudinas

Dentre as proteínas transmembranares formadoras de junções firmes, as claudinas tem papel fundamental para manutenção e função deste complexo (WADA et al., 2013; SUZUKI et al., 2013). As claudinas são uma família de 27 proteínas (20-27 KDa) que possuem quatro domínios transmembranares com uma alça intracelular,

duas alças extracelulares e dois domínios citoplasmáticos, C-terminal e N-terminal (ANGELOW; AHLSTROM; YU, 2008; SUZUKI et al., 2014; TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001). As alças extracelulares das moléculas de claudinas fazem interações homofílicas e heterofílicas com células adjacentes, criando uma barreira ou poro, via paracelular, para a passagem seletivas de moléculas (SUZUKI et al., 2013).

As claudinas identificadas até o momento possuem estrutura semelhante, mas o número e posição dos aminoácidos na primeira alça extracelular conferem propriedade funcionais diferentes para as diferentes claudinas (AMASHEH et al., 2009). Dessa forma, as claudinas podem possuir função: de barreira, ou seja, diminuem a permeabilidade paracelular; ou de poro, que aumentam a permeabilidade paracelular (SUZUKI et al., 2013; TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001). Estudos mostram que, no intestino, claudina-1, -3, -4, -5 -8, -9, -11 e -14 são formadoras de barreira, enquanto claudina-2, -7, -12, -15 são formadoras de poros (LU et al., 2013).

Claudinas formadoras de poros podem ser seletivas para cátions ou ânions. Por exemplo, as claudina-2 e -12 são formadoras de poros seletivas para cátions por possuírem 3 e 4 aminoácidos carregados negativamente na sua primeira alça extracelular (LU et al., 2013; SUZUKI et al., 2013). Em geral, os poros tem o diâmetro de 4 a 8 Å, variando conforme o tecido, e permitem a difusão de macromoléculas de aproximadamente 30 a 40 Å (ZIHNI et al., 2016). As claudinas formadoras de barreira, por outro lado, provavelmente possuem uma distribuição e orientação de aminoácidos diversos que impedem a permeabilidade tanto de moléculas carregadas, como não carregadas (LU et al., 2013; SUZUKI et al., 2013). Além disso, a fosforilação de claudinas parecem desempenhar papel na localização e permeabilidade paracelular (SUZUKI et al., 2013).

As claudinas desempenham funções importantes para manutenção e função de barreira (ANDERSON; ITALLIE, 2009). Estudo mostrou que a deficiência de claudina-1 gera uma perda severa de fluidos e eletrólitos, culminando em mortalidade no prazo de 24 horas após o nascimento (FURUSE et al., 2002). Além disso, a manutenção adequada de claudina-2 e -15 são cruciais para o retorno de Na⁺ ao lúmen intestinal, essencial para a adequada absorção de glicose, de aminoácidos e de lipídeos no intestino delgado (WADA et al., 2013). Diversos estudos associaram

ajuste de expressão de diferentes claudinas no intestino frente ao desafio com dietas deficientes (UENO et al., 2011; SAMPAIO et al., 2016, BROWN et al., 2015).

1.6.2.2 *Ocludina*

A ocludina é uma fosfoproteína tetraspanina (65 kDa), composta por quatro domínios transmembranares: duas alças voltadas para o meio extracelular e uma alça voltada para o meio intracelular, um N-terminal curto e um longo domínio C-terminal citoplasmático (SUZUKI et al., 2013). As duas alças extracelulares da ocludina interagem com as células adjacentes, criando uma barreira apenas para macromoléculas (AL-SADI et al., 2011), enquanto o domínio C-terminal longo interage com ZO-1 para conectar a ocludina ao citoesqueleto (TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001).

No intestino, o nocaute de ocludina não afetou a densidade e organização de junções firmes, nem alterou a função de barreira e o transporte de íons (SAITOU et al., 1998; 2000, SCHULZKE et al., 2005). No entanto, um estudo mostrou que o nocaute de ocludina desencadeia inflamação e hiperplasia do epitélio gástrico, atrofia testicular e perda de grânulos citoplasmáticos da glândula salivar (SAITOU et al., 2000). Além disto, o nocaute de ocludina tanto em células Caco-2, como em camundongos causam aumento da permeabilidade paracelular a macromoléculas (AL-SADI et al., 2011). Um estudo também mostrou que suplementação de zinco durante quadros diarreicos melhorou os escores fecais, diminuiu a permeabilidade intestinal associado ao aumento de ocludina e ZO-1 (ZHANG; GUO, 2009). Logo, esses trabalhos mostram um papel crucial dessa proteína na integridade da barreira e montagem das junções firmes.

1.6.2.3 *Zonulas ocludentes*

As zonulas ocludentes (ZOs) são classificadas como membros homólogos da família de guanilato quinase associadas a membrana (MAGUK do inglês, *membrane-associated guanylate kinase*) (GONZALEZ-MARISCAL et al., 2003). Foram identificado três zonulas ocludentes: ZO-1 (220 kDa), ZO-2 (160 kDa) e ZO-3 (130 kDa) (ULLUWISHEWA et al., 2011). Estas proteínas são compostas por três domínios PDZ (PDZ-1, PDZ-2 e PDZ-3, do inglês *PSD95-DlgA-ZO-1,-2 e -3*), um domínio Src homologia-3 (SH3) e uma região homóloga para a guanilato quinase

associada a membrana (GUK) no lado do N-terminal (ANDERSON; ITALLIE, 2009). Essas estruturas fornecem suporte intracelular para as junções firmes, sendo necessárias para regulação e manutenção dessa estrutura.

Diferentes proteínas transmembranares se ligam ao domínio N terminal. As claudinas ligam-se ao primeiro domínio PDZ, JAMs ligam-se ao terceiro domínio PDZ e ocludina liga-se ao domínio GUK (ZINI et al., 2016). O domínio SH3 liga ZO-1 a mecanismos de sinalização juncional por ligação à proteína de ligação de ácido nucleico associada a ZO1 (**Figura 6**), um regulador transcricional e pós-transcricional da expressão gênica e uma proteína de choque térmico APG2, também conhecida como HSP70RY (FANNING et al., 1998; ZINI et al., 2016). Nocautes de ZO-1 e ZO-2 individuais de ambos os adaptadores são letais ainda no período embrionário (KATSUNO et al., 2008; XU et al., 2008). Estudo mostrou que a depleção de ZO-1 não é capaz de alterar a estrutura de junções firmes, mas desencadeia um atraso na organização de ocludina e claudinas (UMEDA et al., 2004). Além disso, a depleção de um subtipo de zonula ocludentes parecem causar reajuste na expressão de outra. Por exemplo, nocaute de ZO-3 em camundongos leva ao aumento do recrutamento juncional de ZO-2 (ADACHI et al., 2006).

1.6.3 Absorção de carboidratos, proteínas e ácidos graxos

A manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal é de suma importância para a absorção adequada de nutrientes e secreção de eletrólitos (TURNER et al., 2009). Os nutrientes e líquidos absorvidos, por sua vez, são essenciais para suprir as necessidades metabólicas do corpo (FERRARIS; CARREY, 2000). Em relação a absorção de nutrientes, os carboidratos, proteínas e lipídeos são moléculas demasiadamente grandes para serem absorvidas, portanto, são primeiro digeridas de forma mecânica e química para serem absorvidas (BOUDRY et al., 2010).

A digestão dos carboidratos começa na cavidade oral por meio da amilase, depois no lúmen intestinal através de enzimas presentes na borda em escova, ou microvilosidades, dos enterócitos (KOEPPEN; STANTON, 2009). As proteínas são reduzidas a aminoácidos livres e pequenos peptídeos (2-6 aminoácidos) por enteropeptidases e pepsinas (FRENHANI; BURINI, 1999). A digestão dos lipídeos, por sua vez, começa pelas lipases linguais e gástricas, mas é no duodeno onde a

maior parte dos lipídeos são hidrolisados pelas lipases pancreáticas (HAMOSH, 1995). Após a digestão, os macronutrientes reduzidos são absorvidos via transportadores apicais para o interior dos enterócitos e depois para corrente sanguínea através de transportadores basolaterais (BOUDRY et al., 2010).

Na membrana apical, os transportadores de glicose dependente de Na^+ (SGLT, do inglês *sodium-glucose linked transporter-1,-2,-3*) transportam glicose e galactose (BROUDY et al., 2010). Estes transportadores estão presente em todo o intestino delgado, mas é fortemente expresso no duodeno e jejuno (FERRARIS et al., 1993). Existem três tipos de SGLT-1, -2 e -3, sendo o SGLT-1 o principal cotransportador de glicose, galactose e sódio em humanos (BROUDY et al., 2010). O SGLT-1 muda sua conformação ao ligar-se a duas moléculas de Na^+ , permitindo acesso da glicose ao receptor (RODRIGUES et al., 2018). Mutações no SGLT-1 causa uma doença grave de má absorção de glicose-galactose, que pode ser fatal em poucas semanas de vida, se a lactose não for retirada da dieta (WRIGHT, 1998). Outro transportador importante na membrana apical é o GLUT5, um membro da família de facilitadores do transporte de glicose (GLUT) (BROUDY et al., 2010). Esse transportador é específico para a absorção de frutose, sendo encontrado em todo intestino delgado, principalmente nas regiões proximais (DAVID; CINGARI; FERRARIS, 1995).

O transportador de peptídeo-1 (PEPT-1, do inglês, *Peptide Transporter-1*), por outro lado, é o principal cotransportador de di/tripeptídeos e H^+ nos enterócitos intestinais, dependente do gradiente gerado pela bomba Na^+/H^+ (BROUDY et al., 2010). Estudo mostra que o PEPT-1 reconhece como substrato cerca de 400 tipos diferentes de dipeptídeos e 8.000 tripeptídeos (ADIBI, 1971). Após a absorção, os di/tripeptídeos são hidrolisados por peptidases citoplasmáticas e transportados para circulação sistêmica através de transportadores basolaterais (BROUDY et al., 2010). O PEPT-1 é expresso exclusivamente na membrana da borda em escova (OGIHARA, 1996), principalmente no duodeno em humanos (TERADA et al., 2005). Existe um grande interesse clínico pelo transportador PEPT-1 devido sua capacidade de mediar a absorção de fármacos, os fármacos peptideomiméticos, como antibióticos e quimioterápicos (RODRIGUES et al., 2018).

Os lipídeos, por sua vez, fornecem cerca de 9 Kcal/g, sendo uma importante fonte de energia, principalmente nos primeiros meses de vida, onde a fase de crescimento exige essa demanda (UAUY; CASTILLO, 2003). O processo de absorção de lipídeos acontece primeiro através da incorporação de lipídeos hidrolisados por lipases em micelas mistas através da ação detergente dos ácidos biliares (BOUDRY et al., 2010). Estas micelas possuem superfícies hidrofílicas as quais se difundem facilmente pelo conteúdo luminal aquoso e chegam na borda em escova, onde liberam ácidos graxos livres e acilgliceróis que são absorvidos por difusão simples, quando as moléculas tem natureza lipofílica, ou por transportadores específicos (BOUDRY et al., 2010).

Os ácidos graxos de cadeia longa são absorvidos, principalmente, por três transportadores no intestino delgado: proteína de ligação a ácidos graxos da membrana plasmática (FABP do inglês, *fatty acid-binding protein*), proteína de transporte de ácido graxo 4 (FATP4 do inglês, *fatty acid transport protein 4*) e o homólogo de rato da translocase de ácido graxo humano (FAT/CD36 do inglês, *fatty acid translocase*). O FABP também está envolvido no transporte de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (BROUDY et al., 2010) e o FAT/CD36, por sua vez, também está envolvido na absorção de colesterol (HUI; LABONTE; HOWLES, 2008). Estudo aponta que alguns lipídeos podem ser secretados por células intestinais, caracterizando um transporte bidirecional (BERGE, 2000). Dessa forma, para evitar que ácidos graxos livres e 2 monoacilgliceróis retornem ao lúmen intestinal, ocorre o processamento intracelular e liberação basolateral logo após a absorção (BROUDY et al., 2010; HANHOFF; LUCKE; SPENER, 2002).

A absorção de carboidratos e peptídeos é mediada por co-transportadores que utilizam o potencial eletroquímico do sódio como fonte de energia impulsionadora (BROUDY et al., 2010). Diferente dos lipídeos, que são absorvidos por via independente de sódio (NASSIR et al., 2007), mas para isto necessitam da ação emulsificante de ácidos biliares que são reabsorvidos por transportadores apicais de ácidos biliares dependentes de sódio (WADA et al., 2013). Dessa forma, o Na⁺ é o íon mais importante para o transporte transcelular, no qual a manutenção da concentração luminal é de extrema importância para adequada absorção de nutrientes (SCHULTZ; CURRAN, 1970). Um importante estudo comprovou que o retorno passivo

do Na⁺ para o lúmen, através da região paracelular, é dependente da adequada expressão de claudina-2 e -15 (WADA et al., 2013).

Após a absorção apical, os transportadores basolaterais medeiam o transporte de nutrientes dos enterócitos para corrente sanguínea e vice-versa, com o intuito de fornecer nutrientes para o enterócito durante o jejum (BROUDY et al., 2010). O GLUT-2 é o principal transportador basolateral de glicose, galactose e frutose (BROUDY et al., 2010). Sua expressão é constante em todo intestino delgado (LENZEN; LORTZ; TIEDGE, 1996), sendo regulado tanto pelas concentrações luminais de glicose e frutose, com por fatores sistêmicos liberados durante a alimentação (CUI; JIANG; FERRARIS, 2003). O GLUT-2 pode ser recrutado para membrana apical quando os níveis de carboidratos estão altos (KELLETT, 2008), entretanto, estudos mostram que a absorção de glicose e frutose não acontecem caso haja mutação em SGLT-1 e nocaute de GLUT-5, respectivamente (BARONE, 2009; WRIGHT, 2002).

O transporte basolateral de aminoácidos é pouco conhecido (BROUDY et al., 2010), mas SNAT 2 e sistema L foram identificados para transporte basolateral de aminoácidos de carga neutra, sistema T transportam aminoácidos aromáticos, sistema X_{AG} transportam os aminoácidos aniônicos e sistema y⁺L os aminoácidos catiônicos (BROUDY et al., 2010). Ao passo que, os lipídeos são transportados na região basolateral através da proteína de ligação de ácidos graxos intestinais (I-FABP, do inglês *intestinal fatty acid-binding protein*) e da FABP do fígado (L-FABP do inglês, *liver fatty acid-binding protein*) (BROUDY et al., 2010; HANHOFF; LUCKE; SPENER, 2002).

O trato gastrointestinal é o primeiro sistema afetado pela privação nutricional. A desnutrição é reportada por aumentar o transporte basal de íons de um estado neutro ou fluxo absorptivo para secretório, identificado pelo aumento da corrente de curto-circuito basal (BUTZNER; GALL, 1988). Ferraris e Carrey (2000) sugeriram que o aumento do efluxo de íons para o lúmen intestinal na desnutrição podem ser uma resposta adaptativa do epitélio intestinal para aumentar o potencial de membrana e gerar uma força eletromotriz para o transporte de nutrientes. Alguns estudos corroboram com esta hipótese ao mostrarem um aumento da corrente de curto-circuito durante o desafio com glicose no jejuno e íleo desnutrido (BUTZNER; GALL, 1988; CAREY; COOK, 1989; DARMON et al., 1993; YOUNG; LEVIN, 1990b). Apesar dos

esforços, pouco se sabe sobre a absorção e expressão de transportadores de carboidratos, proteínas e lipídeos durante a desnutrição (JACOBI et al., 2013; RIBEIRO et al., 2022; SAMPAIO et al., 2016). Além disso, a diversidade das deficiências nutricionais, gravidade da desnutrição, tempo de desnutrição e segmento intestinal avaliado tornam o estudo da fisiologia intestinal de absorção de nutrientes durante a desnutrição um desafio para ciência. Logo, o presente estudo visou investigar o papel da desnutrição nos principais transportadores apicais de carboidratos, peptídeos e ácidos graxos: SGLT-1, PEPT-1, FATCD/36 e FATP4.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A desnutrição nos primeiros anos de vida é um sério problema de saúde por estar associada ao aumento do risco de mortalidade (BLACK et al., 2008), ciclo vicioso de infecções entéricas subclínica e clínica (SCHORLING et al., 1990; GUERRANT et al., 2008), comprometimento do desenvolvimento físico (BLACK et al., 2008) e cognitivo (GALLER et al., 2012), bem como doenças crônicas na vida adulta (DEBOER et al., 2013; GUERRANT et al., 2012). Dessa forma, o estudo da patofisiologia associada a desnutrição é de suma importância para compreendermos melhor a progressão da doença e para a busca de tratamento mais eficazes.

Neste sentido, diversos modelos animais têm contribuído para o entendimento da fisiopatologia associada à desnutrição (CHALVON-DEMERSAY et al., 2019; WADA et al., 2013). No entanto, apenas três dietas experimentais são baseadas na dieta de populações específicas, sendo fundamentadas apenas nos alimentos mais predominantes da alimentação destas populações e não na quantidade de energia, macronutrientes e micronutrientes consumidos (BLANTON et al., 2016; MAY et al., 2018; TEODÓSIO et al., 1990). Dessa forma, questiona-se o quanto estes modelos representam a clínica da desnutrição infantil.

Além disso, estudos sugerem que alterações morfológicas, funcionais e inflamatórias no intestino causadas pela desnutrição parecem ser as principais responsáveis para estabelecimento de morbidades a longo prazo e, mesmo com o avanço no entendimento dos danos a nível intestinal, a utilização preferencial de dietas experimentais com restrição proteica para estudo da barreira morfofuncional intestinal, limitam os achados e podem não refletir a desnutrição infantil (ATTIA et al., 2017). Dessa forma, compreender as alterações intestinais desencadeadas pela desnutrição pode ser o princípio chave para implementação de tratamentos mais eficazes.

Visto isso, este estudo teve como foco principal formular uma nova dieta de desnutrição, a dieta MAL-ED, com base na dieta complementar de crianças desnutridas de sete países de baixo poder socioeconômico pertencentes ao estudo coorte de desnutrição e infecção entérica (MAL-ED, do inglês *Malnutrition-Enteric Diseases*), assim como validar um novo modelo de desnutrição *in vivo* e avaliar os

efeitos da nova dieta de desnutrição na barreira morfofuncional intestinal. Hipotetizamos que a dieta MAL-ED irá gerar um quadro clínico de desnutrição em camundongos recém-desmamados, assim como irá causar alterações morfológicas, histopatológicas e funcionais no epitélio do intestino delgado. Dessa forma, poderemos contribuir para ciência com o desenvolvimento de um novo modelo murino de desnutrição de relevância clínica e compreender melhor o impacto que este modelo causa na barreira morfofuncional intestinal.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um novo modelo *in vivo* de desnutrição baseado na dieta complementar de crianças com desnutrição de sete países de baixo poder socioeconômico pertencentes ao estudo coorte de desnutrição e infecção entérica - MAL-ED, bem como avaliar os efeitos da nova dieta de desnutrição na barreira morfofuncional intestinal.

3.2 Objetivos específicos

1. Desenvolver uma dieta experimental indutora de desnutrição baseada na dieta complementar de crianças desnutridas (HAZ < -2) de sete países de baixo poder socioeconômico pertencentes ao estudo coorte MAL-ED;
2. Desenvolver e validar um novo modelo *in vivo* de desnutrição de relevância clínica baseado nos parâmetros corporais, como peso, ganho de peso, crescimento, composição corporal e nos níveis séricos de albumina;
3. Investigar os efeitos da nova dieta indutora de desnutrição MAL-ED na morfometria, histopatologia e tamanho total do intestino delgado em período agudo e crônico de consumo;
4. Avaliar os efeitos da nova dieta de desnutrição MAL-ED na barreira morfofuncional do epitélio no intestino delgado utilizando o teste não invasivo de Lactulose/Manitol em período agudo e crônico;
5. Analisar os efeitos agudo da nova dieta indutora de desnutrição MAL-ED nos parâmetros eletrofisiológicos basais e durante a absorção de glicose, glutamina e alanil-glutamina na mucosa intestinal utilizando o modelo de Câmaras de *Ussing*;
6. Identificar os efeitos agudo da nova dieta indutora de desnutrição MAL-ED nos níveis de transcritos e expressão proteica de transportadores intestinais de substratos orgânicos e das proteínas formadoras de junções firmes por meio de PCR em tempo real e de *Western blotting*;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. População e tamanho da amostra

Camundongos machos C57BL/6 ($n = 11/\text{grupo}$) provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 horas), em ambiente com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, água “*ad libitum*” e quantidade de ração controlada diariamente. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e submetidos à aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (n° de protocolo 3941290319), **Anexo A**.

4.2. Formulação da dieta de desnutrição MAL-ED

A nova dieta indutora de desnutrição MAL-ED foi baseada na quantificação da dieta complementar de crianças com e sem desnutrição pertencentes ao estudo coorte “Etiologia, Fatores de Risco e Interações de Infecções Entéricas e Desnutrição e as Consequências para a Saúde e Desenvolvimento Infantil - MAL-ED”. Durante o estudo, foi coletado mensalmente dos 9 aos 24 meses de idade os registros das dietas complementares das últimas 24 horas de 1.463 crianças, de áreas urbanas, periurbanas e rurais de sete países de baixo nível socioeconômico: Bhaktapur, Nepal ($n = 229$); Dacca, Bangladesh ($n = 208$); Fortaleza, Brasil ($n = 169$); Haydom, Tanzânia ($n = 210$); Loreto, Iquitos, Peru ($n = 199$); Venda, África do Sul ($n = 221$); e Vellore, Índia ($n = 227$). A partir disto, foi quantificado o consumo de energia, macronutrientes, fibras, 6 vitaminas (niacina, riboflavin, tiamina, folato e vitaminas A e C) e 6 minerais (cálcio, ferro, magnésio, potássio, fósforo e zinco) e analisado a diferença do percentual dos nutrientes das crianças com desnutrição aguda ($\text{WHZ} < -2$), desnutrição crônica ($\text{HAZ} < -2$) e subnutrição ($\text{WHZ} < -2$) em relação ao percentual da dieta de crianças sem desnutrição, descrito por Maciel et al. (2021). Para formulação da nova dieta de desnutrição MAL-ED, utilizamos o percentual de diferença no consumo de energia, macronutriente, fibras e zinco de crianças com desnutrição ($\text{HAZ} < -2$) e sem desnutrição com 24 meses de idade.

Para que a nova dieta tivesse o padrão alimentar exigido para roedores, a dieta padrão para roedores (AIN93-M) foi usada como base para redução da diferença

de percentual de energia, macronutrientes, fibras e zinco. A formulação e produção das dietas MAL-ED e controle (AIN-93M) foram realizadas pela empresa Rhooster® (Araçoiaba da Serra, São Paulo, Brasil). A composição centesimal da nova dieta de desnutrição foi avaliada pelos seguintes métodos: dumas, perda por secagem, gravimetria, absorção atômica pela empresa CBO® (Valinhos, São Paulo, Brasil).

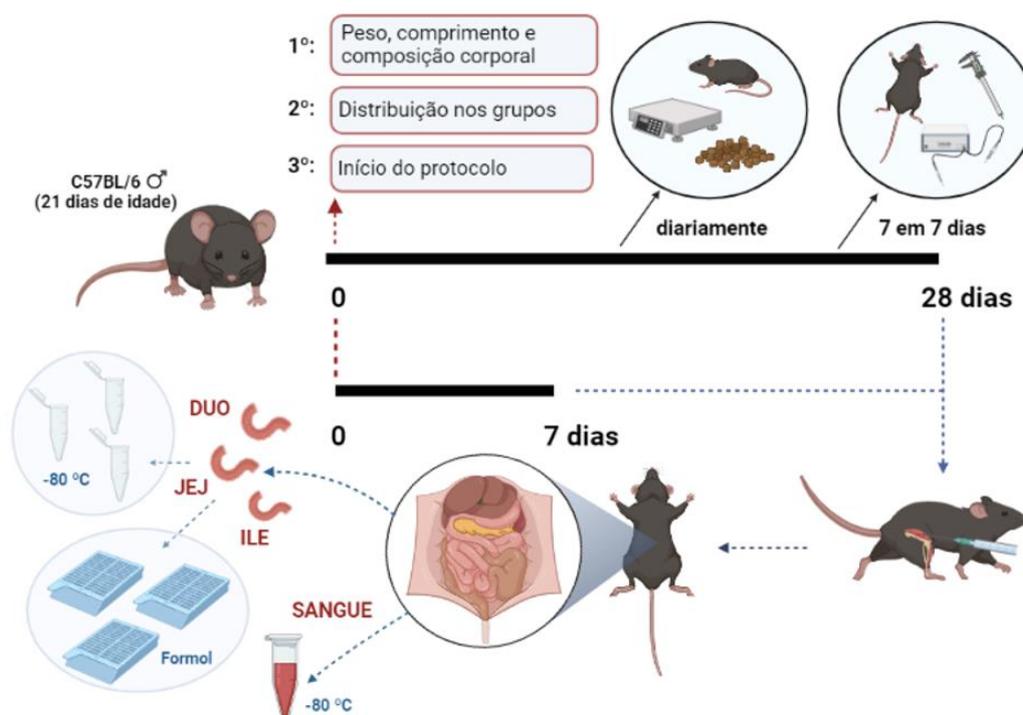
O método de dumas consiste na determinação de nitrogênio na amostra por meio de combustão e leitura do nitrogênio molecular oxidado em equipamento específico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). A perda por secagem é realizada para determinar a umidade na amostra (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). A gravimetria é um método analítico de separação e pesagem dos elementos de uma amostra (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). A empresa aplicou o método de gravimetria para determinação de lipídeos, fibra alimentar e sulfatos. A absorção atômica consiste na determinação quantitativa de metais, semimetais e alguns não metais em amostras (KRUG; NOBREGA; OLIVEIRA, 2004). Estes métodos em conjunto permitiram a quantificação de umidade e voláteis, proteína bruta, extrato etéreo por hidrólise ácida, fibra bruta, cálcio, fósforo e zinco. A quantidade de carboidrato foi estimada pela diferença nas porcentagens de macronutrientes.

4.3 Desenho experimental

O novo modelo murino de desnutrição constituiu-se no tratamento com dieta MA-LED (grupo desnutrido) ou com dieta controle AIN93-M (grupo controle). O modelo foi conduzido conforme Brown et al., (2016) com algumas adaptações. Camundongos C57BL/6 machos com 21 dias de idade tiveram o peso corpóreo, o comprimento da cauda e a composição corporal aferidos para, então, serem distribuídos de forma randômica nos grupos: Controle e Desnutrido. O protocolo foi conduzido por um período total de 28 dias para caracterização temporal dos efeitos da dieta nos parâmetros corporais (**Figura 7**). O consumo de ração foi controlado diariamente para que o grupo desnutrido consumisse a mesma quantidade que o grupo controle. O peso corporal foi mensurado diariamente, o consumo de água a cada dois dias e a cada sete dias os animais foram avaliados quanto ao desenvolvimento corporal e composição corporal. Nos dias 7 e 28 de protocolo, os animais foram anestesiados por via intramuscular com cloridrato de cetamina (90 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg). Após a anestesia, foi feita uma laparotomia

mediana longitudinal para a coleta de sangue, cerca de 1,5 ml, através da punção cardíaca e do tecido intestinal. O intestino foi identificado, seccionado, mensurado o tamanho total e coletado nas porções duodeno, jejuno e íleo. Logo em seguida, os animais foram eutanasiados por meio de exsanguinação. Os segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram divididos em duas porções: uma, com cerca de 4,0 cm para realização do raspado da mucosa e, então, armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a posterior avaliação por RT-PCR e *Western blotting*; e outra porção com cerca de 2,0 cm foram fixadas em formaldeído tamponado a 10% para a avaliação morfométrica e histopatológica. Amostras de sangue foram submetidas a centrifugação por 3.000 rpm por 15 min para separação do soro utilizado na avaliação das concentrações séricas de albumina. Duas linhas experimentais foram conduzidas exclusivamente para coleta de amostras de jejuno para avaliação nas Câmaras de *Ussing* e para aplicação do teste de Lactulose e Manitol.

Figura 7- Desenho experimental do modelo de desnutrição com a dieta MAL-ED.



Fonte: autor.

Animais C57BL/6 machos (21 dias de idade) foram pesados, medido o comprimento total, composição corporal e, em seguida, foram divididos randomicamente nos grupos: controle (consumo de dieta AIN-93M) e desnutrido (consumo da MAL-ED). O protocolo de consumo das dietas foi seguidos por 28 dias (barra preta 28 dias) e sete dias (barra preta 7 dias). O

peso e a ingestão de ração foram avaliados diariamente, enquanto o comprimento total e a composição corporal foram avaliados a cada sete dias. Ao final dos dias 7 e 28, os animais foram anestesiados via intramuscular, submetidos a laparotomia mediana longitudinal para coleta de sangue e tecido intestinal nos três segmentos: duodeno, jejuno e íleo. As amostras coletadas e devidamente identificadas foram acondicionadas em - 80 °C (sangue e intestino) e fixados em formaldeído tamponado a 10%.

4.4. Grupos Experimentais

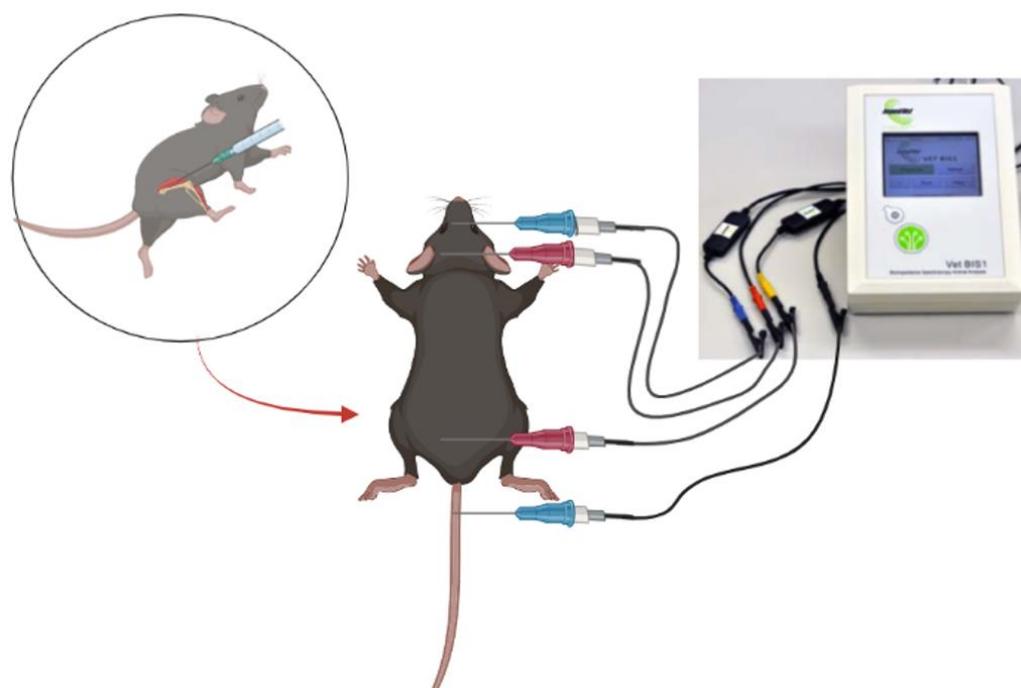
Os grupos experimentais utilizados foram os seguintes:

1. **Controle 7D:** os animais consumiram a dieta controle (AIN-93M) por um total de 7 dias;
2. **Desnutrido 7D:** os animais consumiram a dieta MAL-ED por um total de 7 dias;
3. **Controle 28D:** os animais consumiram a dieta controle (AIN-93M) por um total de 28 dias;
4. **Desnutrido 28D:** os animais consumiram a dieta MAL-ED por um total de 28 dias.

4.5. Análise da composição corporal: Bioimpedância elétrica

Os animais foram submetidos à avaliação corporal por bioimpedância tetra polar (ImpediVET®, Carlsbad, California, EUA) nos dias 0, 7, 14, 21 e 28. Para isto, os camundongos foram anestesiados com cloridrato cetamina (90 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg), colocados sob uma superfície não condutora com membros posteriores e anteriores em perpendicular ao corpo e a cauda foi estendida distalmente. Quatro agulhas (calibre 25x12) foram inseridos na região subdérmica ao longo da linha média dorsal: dois eletrodos centrais e dois eletrodos periféricos (**Figura 8**). Os eletrodos centrais foram inseridos entre as orelhas e as patas traseiras, interceptando a linha imaginária do músculo da coxa com a linha média do corpo, enquanto, os eletrodos periféricos foram inseridos entre os olhos e a região da base da cauda. Os eletrodos periféricos foram inseridos cerca de 1,0 dos eletrodos centrais. As agulhas foram, então, acopladas aos seus respectivos eletrodos e ao dispositivo, conforme especificado pelo fabricante: eletrodo azul entre os olhos; eletrodo vermelho entre as orelhas, eletrodo amarelo entre as patas traseiras e eletrodo preto na base da cauda (**Figura 8**).

Figura 8 - Esquematização do procedimento experimental da bioimpedância elétrica.



Fonte: autor.

Primeiro os animais foram anestesiados por via intramuscular e, em seguida, foram dispostos sob superfície não condutora com membros anteriores e posteriores dispostos perpendicular ao corpo. Foram utilizadas quatro agulhas, que foram inseridas em região subdérmica, entre os olhos, entre as orelhas, entre os músculos das patas anteriores e na base da cauda. As agulhas foram acopladas em eletrodos acoplados ao equipamento. Medidas de comprimento entre os eletrodos centrais (agulhas vermelhas) e peso foram adicionados no equipamento e, por fim, acionado a mensuração.

O comprimento entre os eletrodos centrais foi mensurado e registrado no equipamento, assim como o peso do animal. Em seguida, a corrente elétrica foi acionada, os parâmetros de bioimpedância de resistência e reatância foram obtidos por um único espectro de 4 a 1 MHz numa série de 256 pontos. O dispositivo utiliza uma plotagem de impedância complexa para determinar a água corporal total, fluído extracelular e fluído intracelular, enquanto a massa livre de gordura, massa gorda e índice de massa corporal são calculadas através de um software acoplado ao dispositivo (CARLE, 2010). Os valores de água corporal total foram divididos pelo peso do respectivo animal, com o intuito de normalizar o resultado, e expresso em percentual.

4.6. Avaliação do desenvolvimento corporal

O comprimento corporal dos animais foi mensurado nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 para a avaliação do desenvolvimento corporal dos animais. Para isso, os camundongos foram rapidamente anestesiados por isoflurano (Cristália®, São Paulo, Itapira) (SCHWARZER et al., 2016), em seguida, foram posicionados sob uma superfície plana, de forma alinhada e comprimento corporal total (comprimento corporal + comprimento da cauda) foi medido com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo®, Suzano, São Paulo, Brazil).

4.7. Avaliação das concentrações séricas de albumina

A análise das concentrações séricas de albumina foi medida nos dias 7 e 28 com o intuito de avaliar o estado nutricional de proteínas viscerais. Geralmente as proteínas viscerais são reduzidas quando há deficiência de ingestão de proteína (ACF, 2010). Os níveis de albumina foram medidos através do kit de dosagem da Labteste® (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). As amostras foram preparadas conforme instruções do fabricante: amostra (10 µl de soro mais 1,0 ml do reagente de cor), branco (1,0 ml do reagente de cor) e o padrão (10 µl do padrão mais 1,0 ml do reagente de cor). As soluções foram levemente misturadas, e após 2 min foram realizadas as leituras utilizando o espectro de 630 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro Labquest® (Oregon, EUA).

4.8. Análise morfométrica e estudo histopatológico

Os segmentos obtidos do duodeno, jejuno e íleo foram fixados em formol a 10%. Decorridas 18 h, os fragmentos foram retirados do formol e colocados em álcool etílico a 70% até o processo de parafinização. Após a desidratação, com concentrações crescentes de álcool etílico (70, 80, 90 e 100%), foram realizados o processo de parafinização, cortes histológicos de 5 µm de espessura e a coloração em hematoxilina e eosina. Posteriormente, com o auxílio de um microscópio óptico acoplado ao sistema de aquisição de imagens (LEICA) e o programa Image J versão 1.5a (National Institutes of Health, EUA), foram medidas as áreas de 10 vilos e 10 criptas para cada lâmina, com o intuito de analisar o impacto agudo e crônico da dieta MAL-ED na morfometria intestinal.

Para a análise histopatológica das amostras, as possíveis lesões foram analisadas de acordo com o sistema de escores de severidade do infiltrado

inflamatório sugerido por Erben et al. (2014) com algumas adaptações, **Tabela 4**. As adaptações consistem na utilização apenas do critério de severidade e inclusão do edema no escore 1. A análise histopatológica foi realizada por um patologista.

Tabela 4 – Escores histopatológicos para inflamação no intestino delgado.

Critério	Definição	Escore
Severidade	Normal: menos que 10% de leucócitos na mucosa	0
	Leve: 10 - 25% de leucócitos na mucosa e edema nos vilos	1
	Moderado: 26 – 50% de leucócitos na mucosa, submucosa e edema	2
	Intenso: > 51% de leucócitos transmural e edema nos vilos	3

Fonte: adaptado de Erben et al., (2014).

4.9. Avaliação da barreira funcional do epitélio intestinal – teste Lactulose/Manitol mensuração dos marcadores por HPLC-PAD

Um grupo experimental foi conduzido exclusivamente para avaliação do teste de lactulose e manitol, com o intuito de que o jejum necessário para condução deste teste não interferisse nos demais parâmetros avaliados neste estudo. Inicialmente, os animais foram submetidos a um período de adaptação ao ambiente de coleta, que consistiu em permanecer em gaiolas metabólicas 2 h/dia durante 5 dias antes da aplicação do teste. Nas últimas 24 h antes do teste, todos os animais permaneceram nas gaiolas metabólicas. Durante essas 24 h, 16 h foram correspondentes a alimentação com a dieta isocalórica G (Rhoster®, São Paulo, Brasil), dieta pobre em carboidrato, e 8h de jejum, para evitar que os carboidratos da dieta interferissem na análise posterior. Após jejum, todos os animais receberam por gavagem 200 µl de uma solução contendo 5,0 g de Lactulose (Duphar Laboratories, Southampton, Reino Unido) e 1,0 g de Manitol (Henrifarma Chemicals and Pharmaceuticals LTDA, São Paulo, Brasil) dissolvido em 20 mL de água. Amostras de urina, preservadas em 0,236 mg/mL de clorexidina (Sigma Chemical, St Louis, MO), foram coletadas 24 h após a administração da solução teste. Os animais permaneceram consumindo a dieta isocalórica G durante o período de coleta. Os volumes das amostras foram registrados e centrifugados a 10.000 rpm por 3 minutos,

para, então, 50 µl de uma solução do padrão interno (3,6 mM de melibiose diluído em 2,9 ml de água destilada) ser adicionado a 50 µl de cada amostra. A solução foi centrifugada (10.000 rpm por 3 min) e 50 µl foi usado para determinação dos açúcares. Duas soluções padrões de carboidratos foram usadas para calibrar o sistema cromatografia líquida da alta pressão acoplado ao detector amperométrica pulsada (HPLC-PAD), baseado no método previamente descrito por Barboza et al., (1999). Curvas padrões dos açúcares lactulose, Inositol (padrão interno) e manitol foram medidas concomitantes no mesmo *batch* com as amostras de urinas dos animais por HPLC-PAD (Barboza et al., 1999).

A detecção dos açúcares foi feita no equipamento UltiMate 3000® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), através de, um detector amperométrico pulsado com a forma de onda consistindo no seguinte perfil potencial-duração: amostragem, 0,15 V, 720 ms; oxidação, 0,70 V, 120 ms; redução, -0,30 V, 360 ms. A faixa de saída do detector foi ajustada em 1,0 mA com um tempo de resposta de integração de 3 s. As taxas de excreção de lactulose e manitol foram quantificadas usando um BioAutolon 450 Data System (Dionex, Sunnyvale, Califórnia, EUA).

4.10. Avaliação dos parâmetros eletrofisiológicos basais e durante o transporte de peptídeos e carboidratos por *Câmara de Ussing*

O sistema de câmara de *Ussing* fornece um método valioso, comprovado e muito utilizado para a medição do transporte de eletrólitos, nutrientes e drogas através dos tecidos epiteliais. Utilizamos o método de câmaras de *Ussing* para avaliar corrente de curto-circuito (CCC), resistência elétrica transepitelial (RT) e diferença de potencial (DP) em segmentos do jejuno de animais controles e desnutridos no sétimo dia experimental, sob condições basais e durante o desafio com concentrações crescentes de glutamina, alanil-glutamina e glicose. A porção intestinal do jejuno foi escolhida por apresentar maiores alterações morfológicas no tempo agudo e por ser o maior segmento de absorção do intestino delgado. Todo o protocolo foi seguido conforme descrito por Soares (1996).

O sistema das câmaras de *Ussing* podem ser separados em três partes: a primeira parte compreende as hemicâmaras, que mantém os tecidos intestinais, e os recipientes de soluções perfusantes, que mantém o sistema permanentemente aerado

e com temperatura constante; a segunda parte é composta pela conexão elétrica das hemicâmaras, que correspondem as pontes salinas (cânulas de polietileno com solução Krebs-ágar) e os eletrodos de prata e calomelano (Beckman Instruments Inc., Ivirne, Califórnia, Estados Unidos); e a terceira parte é constituída pelo fixador automático de voltagem BIC modelo #AVC – 300 (Buck & Co. Inc. Franklin, Massachusetts, Estados Unidos). A conexão das hemicâmaras com o fixador de voltagem ocorre por 2 pares de pontes salinas conectadas aos eletrodos.

As pontes salinas juntamente com os eletrodos de calomelano e as soluções que preenche as câmaras possibilitam processos de difusão de íons nas interfaces de contato, originando potenciais de junção líquida. Portanto, mesmo sem os fragmentos dos tecidos, pode ser gerado uma diferença de potencial (DP) devido as junções entre os componentes citados acima. A diferença de potencial gerada pode ser igual a zero, menor que zero ou maior que zero, sendo equivalente a criação de uma bateria e possuindo uma resistência intrínseca. Dessa forma, tentou-se trabalhar com a menor diferença de potencial possível.

O princípio da técnica consiste na medição de diferença de potenciais e corrente de curto-circuito produzidos pelos tecidos vivos como respostas as propriedades do mesmo em gerar fluxos iônicos. Para isto, foi acionado uma tensão antagônica à preparação, cuja a resultante foi uma DP desejada, para medir a CCC produzida e com estes dados foi calculado a resistência inerente do tecido.

4.10.1 Solução perfusora e soluções teste

Duas soluções fisiológicas principais foram preparadas para realização do experimento nas câmaras de Ussing, foram elas: Ringer e Krebs-Ringer Bicarbonato. O Ringer foi utilizado para a irrigação durante a cirurgia e limpeza de resíduos fecais do lúmen no segmento de jejuno após a coleta. Já o Krebs-Ringer Bicarbonato, foi usado tanto como solução perfusora do epitélio jejunal montado nas câmaras quanto como diluente das outras soluções utilizadas no teste. A solução Ringer foi constituída de 111,2 mM de NaCl (6,5 g), 1,878 mM de KCl (0,14 g), 1,081 mM de CaCl₂ (0,12 g), 2,381 mM de NaHCO₃ (0,20 g), 0,08335 mM de NaH₂PO₄ (0,01 g) (MERK Chemicals, Darmstadt, Germany). Foram dissolvidos em 1 L de água destilada a temperatura ambiente, com auxílio de um agitador magnético com placa aquecedora

modelo NUOVA™ II THERMOLYNE® stirring hotplate (Barnstead/Thermolyne Corporation, Dubuque, Iowa, USA) (SOARES, 1996; CLARKE, 2009; SAMPAIO, 2016).

A solução de Krebs-Ringer Bicarbonato, por outro lado, foi composta por 115 mM de NaCl (6,72 g), 25 mM de NaHCO₃⁻ (2,1003 g), 2,4 mM de K₂HPO₄ (0,4181 g), 1,2 mM de CaCl₂.2H₂O (0,1764 g), 1,2 mM de MgCl₂.6H₂O (0,2439 g), 0,4 mM de KH₂PO₄ (0,0544 g), os compostos foram fornecidos pela MERK (MERK Chemicals, Darmstadt, Germany). Sendo esta solução também preparada com auxílio de um agitador magnético com placa aquecedora modelo NUOVA™ II THERMOLYNE®, dissolvida em 1 L de água destilada a temperatura ambiente (SOARES, 1996; CLARKE, 2009; SAMPAIO, 2016). Todos os solutos foram pesados na balança analítica METTLER TOLEDO AB104-S (Mettler instrument Corporation, Hightstown, New Jersey, USA). A osmolaridade das soluções foi confirmada em osmômetro WIDE-RANGE OSMOMETER (Advance Instruments Inc., Newton Highlands, Massachusetts, USA) ficando em torno de 280 a 300 mOsm/L e o pH foi corrigido para pH 7,4 usando um pHmetro QUIMIS® Q400AS (Quimis Aparelhos Científicos, Diadema, São Paulo, Brasil), o que se assemelha a condições fisiológicas, sendo a solução armazenada em geladeira de 2 a 8 °C.

Após a preparação das soluções acima descritas, foram feitas as pontes de Krebs-Ringer Bicarbonato -ágar utilizadas para conectar os eletrodos de corrente e voltagem às câmaras, e conseqüentemente, manter os eletrodos em contato com a solução perfusora que banha o epitélio. Para isto, foi pesado 2,4 g de Ágar (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) na balança analítica METTLER TOLEDO AB104-S e adicionado a 50 ml da solução Krebs-Ringer Bicarbonato dentro de um Becker de 100 ml. A solução foi preparada em banho-maria, fervida em temperatura de 80 a 100 °C e homogeneizada com uma bala magnética pequena em agitação na velocidade 3 por um período de 30 minutos, utilizando para isto um agitador magnético com placa aquecedora modelo NUOVA™ II THERMOLYNE®. Em seguida, a solução foi distribuída nos cartuchos dos eletrodos, evitando a formação de bolhas, que podem interferir na captação do sinal elétrico pelos eletrodos.

Foram preparadas também duas soluções de perfusão, uma solução de Krebs-Ringer Bicarbonato glicosada e outra de Krebs-Ringer Bicarbonato-Manitol,

ambas na concentração de 10 mM por ml de Krebs-Ringer-Bicarbonato. Para preparação do Krebs-Ringer Bicarbonato glicosado, foi dissolvido 0,0901 g de glicose (MERK Chemicals, Darmstadt, Alemanha), em 50 ml de Krebs-Ringer Bicarbonato, Esta solução foi usada para perfusão do lado basolateral do epitélio jejunal nas câmaras. A solução de Krebs-Ringer Bicarbonato-manitol na mesma concentração, foi preparada em paralelo para ser adicionada do lado luminal do jejuno nas câmaras. Para preparar o Krebs-Ringer Bicarbonato-Manitol foi adicionado 0,0911 g de manitol (MERK Chemicals, Darmstadt, Germany) em 50 ml de Krebs-Ringer Bicarbonato.

Também foram feitas duas soluções de viabilidade, uma solução de teofilina e outra de glicose, que foram usadas para confirmar se o tecido testado estava viável ao final do experimento e validar os resultados da câmara em que esse tecido foi utilizado. Ambas as soluções de teofilina e glicose foram feitas na concentração de 250 Mm, para isso, foi pesado 0,0901 g de Theophylline (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) e 0,09008 g de L-Glucose (MERK Chemicals, Darmstadt, Germany), cada uma foi dissolvida em 2 ml de Krebs-Ringer Bicarbonato, separadamente. Estas soluções foram preparadas nesta concentração para que ao serem adicionadas 0,2 ml aos 4,8 ml da solução de perfusão, chegassem ao volume de 5 ml e concentração final de 10 mM.

Utilizamos soluções a 1 mM, 20 mM, 70mM, 200 mM e 700 mM de glicose, L-glutamina (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) e L-alanil-glutamina (Rexim SA, Courbevoie, França) neste trabalho. As soluções desses substratos foram dissolvidas em KRB, de modo que, cada uma delas apresentasse 300 mOsm e a concentração desejada. As soluções com substratos foram preparadas de forma que, para obter cada ponto experimental na concentração desejada para realização da curva dose-resposta. Foi adicionado o volume de 100 µl da solução final de cada concentração dos substratos no reservatório de circulação das câmaras, do lado apical do jejuno montado, retirando deste reservatório, igual volume antes da adição, reduzindo assim a margem de erro no instante da adição e prevenindo também alterações no pH e na osmolaridade Inicial.

4.10.2 Montagem das Câmaras Ussing e coleta da amostra

4.10.2.1 Montagem das câmaras e calibração do sistema

Antes do procedimento cirúrgico para coleta do material, o sistema das Câmaras de *Ussing* foram devidamente montados e ajustados para posterior fase experimental. O amplificador EVC4000 PRECISION V/I CLAMP (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) e pré-amplificadores EVC3 Preamplifier (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) foram ligados pelo menos 1 h antes de iniciar o experimento para que houvesse a estabilização de todo circuito elétrico das câmaras. O amplificador foi colocado o botão Meter na posição mV (milivolts), o botão Zero na posição (+), os potenciômetros do Fluid Res. Compensation e Set Clamp I/V foram zerados e o botão PD (Potential Difference). As cânulas juntamente com os eletrodos (dois de calomel e dois de prata) (Beckman Instruments Inc., Ivrine, Califórnia, Estados Unidos) conectados ao fixador automático de voltagem BIC modelo #AVC – 300 (Buck & Co. Inc. Franklin, Massachusetts, Estados Unidos) foram acopladas aos orifícios de cada uma das hemicâmaras. Após ligados, com o pré-amplificador na posição de Stand by e o botão Dummy Membrane na posição out, foi zerada no voltímetro a diferença de potencial do sistema sem solução, mostrada no display do amplificador em mV. Para isso, foi utilizado o botão de controle grosseiro (Coarse) e o botão de controle fino (Fine) ambos localizados no pré-amplificador. Os cartuchos contendo as pontes de Krebs-Ringer-Bicarbonato -ágar são acopladas a 2 eletrodos de voltagem vermelhos (V1 e V2) e 2 eletrodos azuis de prata para corrente (I1 e I2) (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA), estes são conectados as câmaras de Ussing, I1 e V1 em uma hemicâmara e, I2 e V2 na outra hemicâmara complementar. Após conectados os cartuchos e eletrodos, foram colocados 5 ml de Krebs-Ringer Bicarbonato dentro de cada reservatório de circulação, como não tem tecido montado ainda, o líquido fluíu de um lado para o outro da câmara sem nenhuma resistência.

Em seguida, a aeração carbogênica é ligada, a bomba termoestável começa a aquecer a solução Krebs-Ringer-Bicarbonato para a temperatura de 37,8 °C e o período de 1 a 2 h começa a ser contato para estabilização do sistema. Após o período de estabilização, girou-se o botão de Stand by para Operate no pré-amplificador e foi feita a avaliação de qualidade das pontes de ágar feitas pela conexão dos eletrodos com os cartuchos contendo Krebs-Ringer-Bicarbonato -ágar em seu interior. A avaliação é feita inicialmente olhando a diferença de potencial espontâneo gerada em cada câmara com a utilização somente do Krebs-Ringer-

Bicarbonato. Se a DP fosse maior que 3 mV era avaliado se tinham bolham nos cartuchos e foi feita a troca dos cartuchos dos eletrodos de corrente I1 e I2. As trocas tinham o objetivo de deixar a DP o mais próximo possível de -1,0 a +1,0 mV para cada Câmara. Após a redução da DP para o mais próximo de $\pm 1,0$, esta DP foi zerada utilizando o botão Coarse no pré-amplificador, e em seguida foi zerada também a resistência do fluido (solução de Krebs-Ringer-Bicarbonato), apertando o botão Fluid Res. Compensation, que aplica uma corrente (μA) pré-definida pelo sistema, permitindo assim, ver a DP (mV) no display do voltímetro do amplificador. Diante desta informação, foi girado o potenciômetro do Fluid Res. Compensation até o display do voltímetro mostrar 0 mV de DP, indicando que a resistência do Krebs-Ringer-Bicarbonato foi zerada, indicando que posteriormente apenas a resistência do epitélio será observada (FIELD, 1971; SOARES, 1996).

A fim de evitar que a resistência elétrica do sistema fosse muito alta e que prejudicasse a leitura da resistência do tecido, caso esta fosse muito baixa, não mostrando o real valor, foram verificadas as resistências do sistema de eletrodos, de voltagem e de corrente com a utilização de um multímetro LUATEK modelo LK-96 (China).

4.10.2.2 Coleta de amostra

No dia 7 de consumo das dietas, os animais foram inicialmente conduzidos ao procedimento cirúrgico. Após a anestesia com cloridrato de cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) por via intramuscular, foi feita uma incisão de cerca de 2 cm na porção média do abdômen sobre a linha Alba. O intestino delgado foi exposto e a região correspondente ao jejuno foi devidamente identificada, quanto a sua localização anatômica. Cerca de 8 cm do jejuno foi seccionado e transferido para uma placa de petri contendo solução de Ringer a cerca de 4 °C. A porção foi limpa com solução de Ringer e varetado em bastão de vidro. Em seguida, foi feita uma incisão superficial à margem da inserção mesentérica, profunda o suficiente para cesurar as camadas serosa, muscular longitudinal externa e muscular circular interna. O lado mucoso foi rapidamente dissecado da camada muscular, aberto com bisturi e cortado em segmentos de 1,0 cm. Cada segmento foi colocado cuidadosamente, com o auxílio de pinças, na hemicâmara de acrílico, no qual o lado mucoso ficou voltado para cima. A segunda hemicâmara foi, então, encaixada por pinos na primeira hemicâmara com

tecido e fixadas no suporte das câmaras. Simultaneamente, as câmaras foram preenchidas com 5,0 ml de solução de Krebs glicosado no lado seroso do tecido e igual volume de solução de Krebs-Manitol no lado mucoso. Por conseguinte, as câmaras foram conectadas, e a circulação do perfusato foi liberada. Para a circulação e aeração dos 5 ml das soluções perfusoras Krebs-Glicose e Krebs-Manitol, foi utilizada uma mistura carbogênica de 95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono. A temperatura do perfusato foi mantida em 37,8 °C pela circulação constante de água aquecida entre as paredes da camisa dos reservatórios de circulação dos perfusatos das câmaras, que foram conectados a uma bomba de circulação termoestável (Haake FE2, Berlin, Germany), ligada pelo menos 2 h antes de começar a experimentação.

Com o objetivo de contornar a perda de perfusato por meio da evaporação, uma marcação com um traço horizontal no reservatório de circulação foi feita utilizando uma caneta Marcador CD/Retroprojeter 2.0 azul. Desta forma, quando o volume presente no reservatório ficava abaixo da marcação, este volume era repostado, tanto do lado mucoso quanto do seroso, mantendo assim, praticamente constante, o volume de 5 ml utilizados em cada reservatório (SOARES, 1996).

4.10.3 Medidas elétricas

Foram coletados dados referentes a Diferença de Potencial basal (DP), Resistência transepitelial (RT) Corrente de curto-circuito (CCC). Para registrar a DP, o botão PD foi apertado, uma luz verde ao lado deste botão acendeu, o botão Meter foi mantido virado para mV e no display mostrou a diferença de potencial basal espontâneo entre o lado mucoso e seroso do epitélio do jejuno montado, sem a aplicação de corrente pelo sistema. Já para registrar a RT, usa-se o botão CC (Current Clamp), este botão acionado tem a função de aplicar uma corrente predefinida fixa de 50 μ A através do tecido, e como esta corrente foi determinada pelo operador, por meio do potenciômetro Set Clamp I/V, foi possível calcular a RT. Com a aplicação de uma corrente, uma voltagem foi gerada pela diferença de potencial desencadeada pela corrente e sua ação no transporte de cargas através do tecido. O valor de da voltagem é registrado e mostrada no display do amplificador, como o valor de corrente é de conhecimento do operador, o cálculo da RT é feita por meio da Lei de Ohm, com a fórmula $RT = \Delta DP/i$, onde ΔDP corresponde a voltagem registrada logo após a aplicação da corrente de 50 μ A (DP2) menos a voltagem mostrada na diferença de

potencial basal (DP1), e i corresponde a corrente aplicada pelo sistema, que neste caso foi de 50 μA .

Já a CCC corresponde a corrente necessária para anular ou torna desprezível a resistência de um sistema, neste caso o sistema foi o epitélio intestinal. Para se mensurar a CCC foi apertado o botão VC (Voltage Clamp) e uma luz laranja acendeu ao lado do botão, mostrando que uma voltagem/tensão/DP foi fixada naquele momento. O objetivo agora foi zerar a voltagem/tensão/DP por meio da aplicação de uma corrente capaz de anular a RT do tecido estudado. Para adicionar a corrente foi utilizado o potenciômetro Set Clamp I/V, logo, quando a DP mostrada o display do amplificador foi 0,0 mV, o valor mostrado no potenciômetro foi considerado o valor de CCC.

Após a montagem dos tecidos nas câmaras, foi acionando a função de Clamp de voltagem por meio do botão VC para a observação da resistência inicial do tecido, por meio da corrente. O tecido deveria ser substituído por outro, caso: quando acionado o botão VC, o tecido apresentasse corrente de 0 μA , o que indicaria ausência de transporte e possível morte tecidual; quando mostrasse overload de corrente no sistema, neste caso seria emitido um sinal sonoro e observado no display do amplificador uma corrente superior a 1000 μA . Após a montagem dos tecidos em todas as câmaras e as devidas substituições de tecidos, quando necessárias, foi aguardado um período de 20 minutos para estabilização da diferença de potencial nas câmaras montadas.

4.10.4 Curva dose-resposta da glutamina, alanil-glutamina e glicose

Durante os primeiros 20 min foram feitas medidas elétricas para monitorar a viabilidade dos tecidos. Também foi realizado um teste inicial com glicose (5 mM/ml) para avaliar a responsividade dos tecidos, para isto, substituímos 100 μL de solução de Krebs do laco mucoso por 100 μL de glicose (10 mM) e medimos os valores elétricos, descrito no *subitem 4.10.3*. Segmentos intestinais que não responderam aos testes elétricos iniciais foram substituídos por outro tecido dissecado. Para o teste de co-transporte, as concentrações crescentes de glutamina, alanil-glutamina e glicose foram adicionados a cada 20 minutos, 100 μL da perfusora de Krebs-Ringer-Bicarbonato-Manitol foram substituídos por 100 μL de concentrações crescentes das

soluções testes mencionadas no *subitem 4.10.1*. Ao final do experimento, 200 μ L da solução perfusora de Krebs-Ringer-Bicarbonato-glicose do lado seroso foram substituídos por 200 μ L de solução de teofilina 250 mM e avaliado por 10 min. O mesmo foi feito com a solução de viabilidade com glicose 250mM, só que neste caso foi substituído 200 μ L da solução perfusora de Krebs-Manitol do lado mucoso por 200 μ L de solução de viabilidade com glicose 250 mM e avaliado por 10 min. O teste com teofilina foi realizado com o intuito de testar a viabilidade e responsividade elétrica da membrana. Caso o sistema de voltagem apresentasse uma sobrecarga de corrente, os dados obtidos dessa câmara eram eliminados. Câmaras que não alteraram a corrente de curto circuito com a adição de teofilina também foram excluídas da análise final. Os registros das medidas elétricas da corrente de curto-circuito, diferença de potencial elétrico e resistência elétrica transepitelial foram feitas a cada 5 minutos durante todo o período experimental (120 minutos).

4.10.5 Cálculos dos parâmetros eletrofisiológicos

Os valores de DP1, DP2 e CCC coletados para cada tempo foram preenchidos em planilhas no programa Microsoft Excel® versão 15/Office 2013 (Redmond, Washington, USA). Os valores de CCC, DP e RT foram multiplicados ou divididos pela área do segmento intestinal, correspondente a interface experimental nas hemicâmaras, para normalizar os valores pela área. A CCC foi calculado pela divisão o valor de i pela área intestinal, enquanto a DP foi calculado através da divisão de DP1 pela área intestinal. A RT foi calculada conforme citado no *item 4.10.4*. Os resultados de CCC, RT e DP foram apresentados por variação ou delta (Δ) para o desafio com os substratos, enquanto a resposta basal foi expressa em valores brutos de CCC, RT e DP. O Δ CCC, Δ RT e Δ DP foram definidos como a diferença entre o valor da resposta final e o valor basal/inicial. Os valores de coeficiente de Hill, pD_2 , EC50, resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e resposta teórica foram calculados a partir dos valores CCC no programa GraphPad Prism® versão 8.0.2 (263) (Califórnia, Estados Unidos). O pD_2 corresponde ao logaritmo negativo do EC50 e evidência a potência do substrato, enquanto o EC50 corresponde a dose que causa 50% do efeito máximo. O coeficiente de Hill é usado para definir se uma curva dose resposta segue ou não o padrão clássico de curva dose resposta (coeficiente de Hill = 1).

4.11 Avaliação dos níveis de transcritos de junções Firmes e transportadores intestinais por meio de RT-qPCR

4.11.1 Extração do RNA total

O jejuno foi a região escolhida para análise, pois corresponde a região de maior absorção do intestino delgado e obteve alterações morfológicas significativas no dia 7. Além disso, foram utilizados para a análise o raspado da mucosa do jejuno, uma vez que, experimentos prévios mostraram uma detecção de ciclos quantitativos mais uniforme nos grupos analisados. Para extração de RNA total, foram adicionadas as amostras do raspado da mucosa do jejuno 1,0 ml de Trizol® (Sigma, San Luis, Missouri, EUA) e uma esfera de metal congelada a -20 °C para, então serem submetidas à 50 Hz no TissueLyse® (Qiagen, Hilden, Alemanha) por 2 a 5 minutos. O produto do passo anterior foi centrifugado a 12000_G por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo devidamente identificado, no qual foi adicionado 200 µl de 1-bromo-3-cloropropano (Sigma, San Luis, Missouri, EUA) e, em seguida, agitado por 15 segundos no vortéx. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 3 minutos e, logo em seguida, foram novamente centrifugadas 12000_G por 20 a 30 minutos a 4 °C. A fase aquosa de cada amostra foi, então, pipetada cuidadosamente para um novo tubo, no qual foram adicionados 500 µl de isopropanol e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Após a incubação, procedeu-se a centrifugação a 12.000_G por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi, então, descartado e adicionado 1000 µl de etanol a 75% a 4 °C. As amostras foram rapidamente agitadas no vórtex, centrifugadas a 7.500 g por 5 minutos a 4 °C e, por fim, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi deixado em temperatura ambiente de 5 a 10 minutos para secar e solubilizado em 10 a 30 µl de água MiliQ autoclavada. As amostras foram avaliadas quanto a quantidade e qualidade do RNA isolado através de leituras da absorbância a 260 nm e razão 260/280 nm pelo equipamento Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), respectivamente. O RNA extraído foi armazenado a -80 °C para posterior síntese de cDNA.

4.11.2 Síntese de cDNA

O RNA total isolado armazenado a -80 °C seguiu para a síntese de cDNA através do *GoScript™ Reverse Transcription System* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), de acordo com instruções do fabricante. O protocolo da reação incluiu 2,0 µL da enzima transcriptase reversa *GoScript™*, 4 µL do tampão oligo dT *GoScript™*, 200 ng/µL de RNA extraído das amostras e completou-se o volume total até 20 µL com água livre de nuclease. O protocolo padrão no termociclador QuantStudio5® (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) foi 25°C por 5 minutos, 42 °C por 30 minutos e 70 °C por 15 minutos. O cDNA sintetizado foi armazenado em freezer -20 °C até à amplificação pela Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR).

4.11.3 Reação em cadeia de polimerase quantitativo

A transcrição relativa das proteínas formadoras de junções firmes (claudina-1, -2, -15 e ocludina) e transportadores intestinais (SGLT-1, PEPT-1, CFTR, FATP4, FATCD/36) foi realizada através do equipamento QuantStudio5® (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Para a reação foram utilizados 7,5 µL de GoTaq® qPCR Master (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 2,4µL de cada iniciador (0,8 mM) e 1,0 µL de cDNA das amostras completando com água livre de nuclease até um volume final de 15 µL.

A **tabela 5** mostra a sequência dos oligonucleotídeos iniciadores de DNA (*primers*) dos genes investigados, obtida na plataforma eletrônica *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), e as condições de anelamento para cada gene investigado. Todos os ciclos começaram com a etapa de ativação (2 minutos a 95 °C), seguida da etapa de desnaturação (15 segundos a 95 °C), anelamento (**tabela 5**) e finalizaram com etapa de extensão (1 minuto a 60 °C). Os dados foram obtidos com o software do sistema QuantStudio5® (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e foram baseados nos valores do ciclo de limiar, em que a fluorescência observada é de 10 vezes maior do que a fluorescência basal para cada ensaio de qPCR. Todas as amplificações foram avaliadas quanto à curva de *melting*, realizada para assegurar a especificidade da amplificação e detectar a formação de dímeros de iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico.

Os valores do ciclo quantitativo (Cq/Ct) dos genes foram exportados para o Microsoft Excel® versão 15/Office 2013 (Redmond, Washington, USA). Os níveis de transcritos de cada gene analisado foram calculados de acordo com a método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gene alvo} - \text{Média do Ct gene de referência } 18S)$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 5 – Sequências de oligonucleotídeos iniciadores das junções firmes e transportadores intestinais e as condições de protocolo.

Genes	Sequência de iniciadores	Condições de anelamento
SGLT-1	S - CGGAAGAAGGCATCTGAGAA	20'' - 60 °C
	AS - AATCAGCACGAGGATGAACA	
PEPT-1	S - AGGGGAGAACGGAATCAGGT	20'' - 61 °C
	AS - CTTTTCGCCAGAAGGGAAGA	
FATP4	S - GTTCCAGAAGACAGAGTTGC	20'' - 63 °C
	AS - CTGAATCCAGCATCTTCTGG	
FATCD/36	S - GATGTGGAACCCATAACTGGATTCAC	20'' - 63 °C
	AS - GGTCCCAGTCTCATTTAGCCCAGT	
CFTR	S - GGATGCTGAGGAAGCAACTC	20'' - 60 °C
	AS - CCAGCCTGGA ACTCTCTTTG	
Claudina-1	S - TCTACGAGGGACTGTGGATG	20'' - 63 °C
	AS - TCAGATTCAGCAAGGAGTCG	
Claudina-2	S - CCCACCACCACCAGCTTAAT	20'' - 60 °C
	AS - GAAATGGCTTCCAGGTCAGC	
Claudina-15	S - GCAGGGACCCTCCACATACTTG	20'' - 60 °C
	AS - AGTTCATACTTGGTTCCAGCATAACAGTG	
Ocludina	S - AAGAGCAGCCAAAGGCTTCC	20'' - 60 °C
	AS - GCTCGGGTTCACTCCCATTA	
ZO-1	S - GACCATCGCCTACGGTTTGA	20'' - 60 °C

	AS - AGGTCTCGGGGATGCTGATT	
18S	S- CGGACAGGATTGACAGATTG	20'' - 58 °C
	AS- CAAATCGCTCCACCAACTAA	

Fonte: Autor.

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

4.12 Expressão proteica de junções Firmes e transportadores por meio de *Western Blotting*

A investigação da expressão proteica de junções firmes e transportadores envolvidos na regulação da barreira intestinal foi realizada por meio do *Western Blotting*. O raspado da mucosa do jejuno dos animais foram homogeneizados em tampão de RIPA (Tris 50 mM; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Triton 1%) e, após centrifugação (1500_G/10min), seus sobrenadantes foram separados em tubos devidamente rotulado. A quantidade total de proteínas de cada amostra foi mensurada utilizando-se o *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) com uma curva de BSA de 6 pontos. Os volumes foram ajustados para que as quantidades de proteínas fossem equivalentes em cada amostra para, então, separar as proteínas por eletroforese num gel SDS-PAGE.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas, por eletroforese, para uma membrana de nitrocelulose durante 2 h a 100 V. Seguida a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução de BSA (do inglês, *Bovine Serum Albumin*) a 5% em tampão TBS-T (Tris-NaCl com 1% de Tween 20) por 1 h sob agitação. Após esse período, as membranas foram lavadas 4 vezes, cada lavagem com 5 minutos de duração, utilizando o tampão TBS-T. Os anticorpos primários SGLT-1, PEPT-1, CFTR, claudina-1, -2, -15, ocludina, actina (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA) e ZO-1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) foram diluídos em solução BSA 5% na proporção de 1:200, e deixados em contato com a membrana sobre refrigeração e agitação branda durante todo o período noturno (*over night*).

Seguidas 16-18h, as membranas foram novamente lavadas (4-5 vezes por 5 min cada) e foram incubadas com anticorpos secundários, diluídos em BSA a 5% na proporção 1:1000, durante 1,5 horas sob agitação. Após esse período uma nova

lavagem (4-5 vezes por 5 min cada) foi realizada e as marcações foram reveladas utilizando o *Clarity™ Western ECL Substrate* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA) no transluminador (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA). As bandas foram quantificadas utilizando o programa ImageJ versão 1.5a (National Institutes of Health, EUA) e exportadas para uma planilha no Microsoft Excel® versão 15/Office 2013 (Redmond, Washington, USA). A intensidade das bandas das proteínas alvos foram divididos pelo intensidade das bandas de actina para normalização.

4.13 Análise estatística

Os dados coletados foram digitados em planilha de Microsoft Excel® versão 15/Office 2013 (Redmond, Washington, USA) e verificados duplamente para validar a entrada dos dados. Os dados foram avaliados quanto a normalidade utilizando o teste *Kolmogorov-Smirnov*. Os dados paramétricos normalizados seguiram para a análise pelo teste *t* Student ou análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de *Bonferroni* para os dados pareados. Os dados não paramétricos, por sua vez, foram analisados pelo teste de *Mann-Whitney*. Todos os testes foram aplicados no software GraphPad Prism® versão 8.0.2 (263) (Califórnia, Estados Unidos). Os resultados foram representados por média \pm erro padrão da média (EPM) ou mediana e Q1-Q3, quando indicado. Dados considerados significativos obtiveram valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Composição da dieta MAL-ED

A análise de composição centesimal revelou que a nova dieta de desnutrição MAL-ED possui -8,03% de energia, -37,46% de proteína, - 24,20% de lipídeo, -10,83% de zinco, +5,93% de carboidrato e +45,17% de fibra em relação a dieta controle (**Tabela 6**). Os ingredientes e suas respectivas quantidades para formulação das dietas estão especificados na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Composição nutricional da dieta MAL-ED e controle.

	Dieta Controle	Dieta MAL-ED*	Diferença (%)
Energia (Kcal)	391,69	360,22	-8,03
<i>Macronutrientes</i>			
Carboidrato (g)	61,89	65,66	5,93
Proteína (g)	21,25	13,29	-37,46
Lipídeo (g)	6,57	4,98	-24,20
Fibras (g)	2,9	4,21	45,17
<i>Micronutrientes</i>			
Zinco (mg)	35,0	31,21	-10,83
<i>Ingredientes</i>			
Semola grits (g)	-	54,61	-
Caseína (78,79% de proteínas) (g)	16,40	9,89	-
Amido dextrinizado (g)	15,50	0,00	-
Sacarose (g)	10,00	0,00	-
Óleo de soja (g)	4,00	5,10	-
Celulose MC-101 (g)	5,00	26,00	-

Mix mineral (g)	3,50	3,50	-
Mix vitamínico (g)	1,00	1,00	-
L-cisteína (g)	0,18	0,30	-
Bitartarato de colina (g)	0,25	0,25	-
Tert-butilhidroquinona (g)	0,0008	0,0014	-

Fonte: autor.

Valores referentes a análise da composição centesimal da dieta MAL-ED e dieta controle (AIN-93M), assim como a quantidade de ingredientes usados para formulação de cada dieta.

5.2 Indução da desnutrição pela dieta MAL-ED

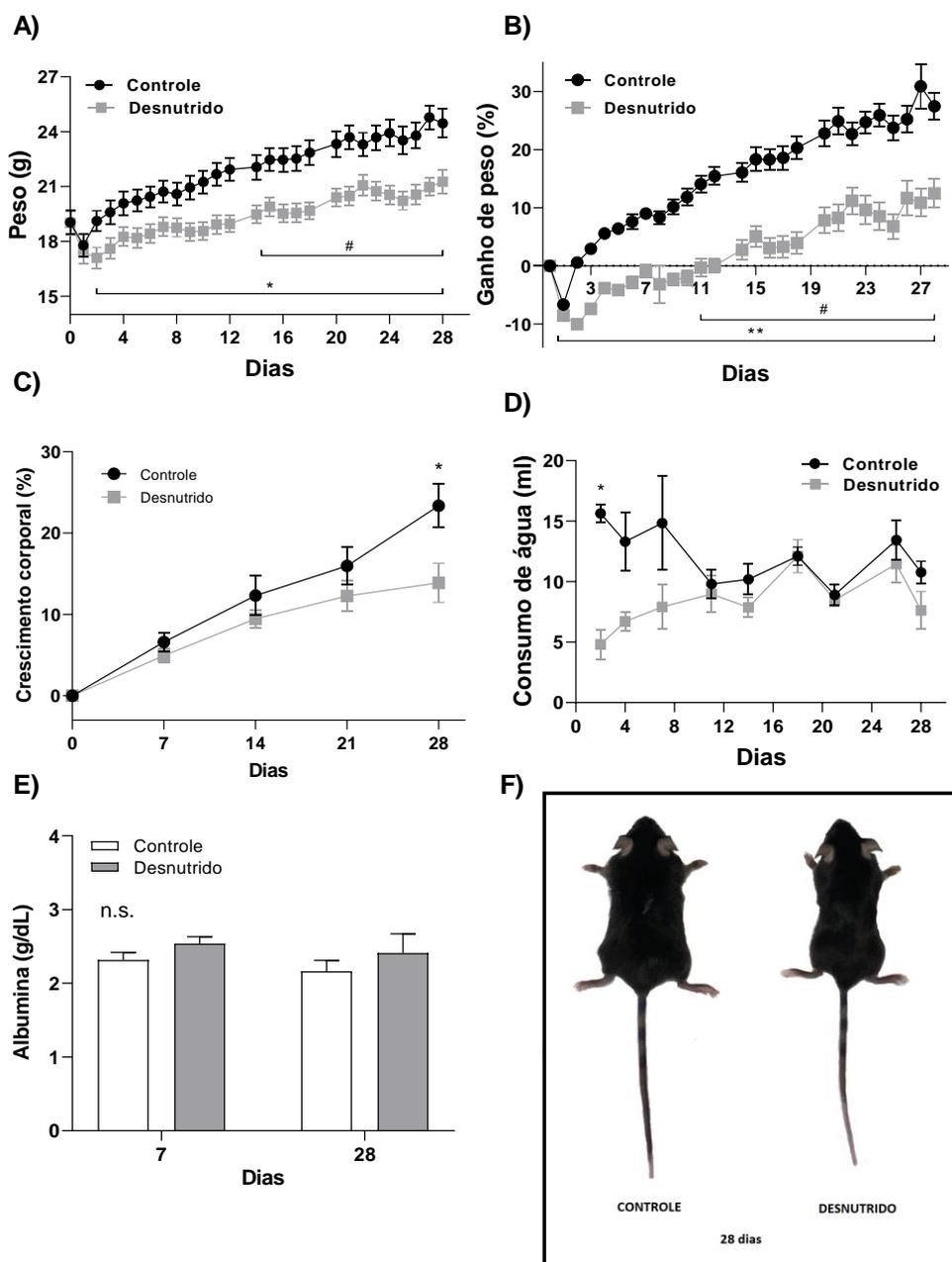
5.2.1 Sinais clínicos desencadeados pelo consumo crônico da dieta MAL-ED em animais recém desmamados

O consumo da dieta MAL-ED *ad libitum* por 28 dias não alterou ($p > 0,05$) o peso e ganho de peso nos animais em relação a dieta controle, uma vez que, o consumo de ração da dieta MAL-ED foi cerca de 8 a 29 g maior que o consumo da ração controle, conforme pode ser visto no **Anexo B (Figura 1A, 1B e C, respectivamente)**. Entretanto, quando o consumo da dieta MAL-ED foi restrita a mesma quantidade consumida da dieta controle, foi observado alterações significativas ($p < 0,05$) nos parâmetros corporais dos animais desnutridos em relação aos controles.

O consumo da dieta de desnutrição MAL-ED controlada diariamente reduziu o peso de forma significativa ($p < 0,05$) a partir do segundo dia em relação a dieta controle (Controle $19,12 \pm 0,56$ g vs. Desnutrido $17,11 \pm 0,56$ g) (**Figura 9A**). O ganho de peso, por sua vez, reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a partir do primeiro dia de desnutrição (Controle $-6,63 \pm 0,28\%$ vs. Desnutrido $-8,55 \pm 0,56\%$) permanecendo reduzido até o 28º dia (Controle $27,47 \pm 2,27\%$ vs. Desnutrido $12,49 \pm 2,46\%$), como pode ser visto na **Figura 9B**. O consumo da dieta MAL-ED também causou diferença significativa ($p < 0,05$) no crescimento corporal quando comparado ao grupo controle no dia 28 (**Figura 9C**). O consumo de água foi ligeiramente maior nos animais desnutridos nos primeiros 6 dias, porém foi significativo ($p < 0,05$) apenas

no dia 2 (**Figura 9D**). Durante o período experimental, observamos que os animais desnutridos consumiram mais rapidamente a ração disponibilizada diariamente que os animais controles, passando por um período de jejum noturno diariamente. Ao analisarmos as concentrações séricas de albumina nos grupos experimentais examinados, não identificamos diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos controle e desnutrido nos dias 7 e 28 (**Figura 9E**). A imagem representativa dos efeitos globais desencadeados pelo consumo crônico da dieta MAL-ED nos animais pode ser vista na **Figura 9F**.

Figura 9 – Sinais clínicos desencadeados pelo consumo crônico da dieta MAL-ED controlada diariamente.



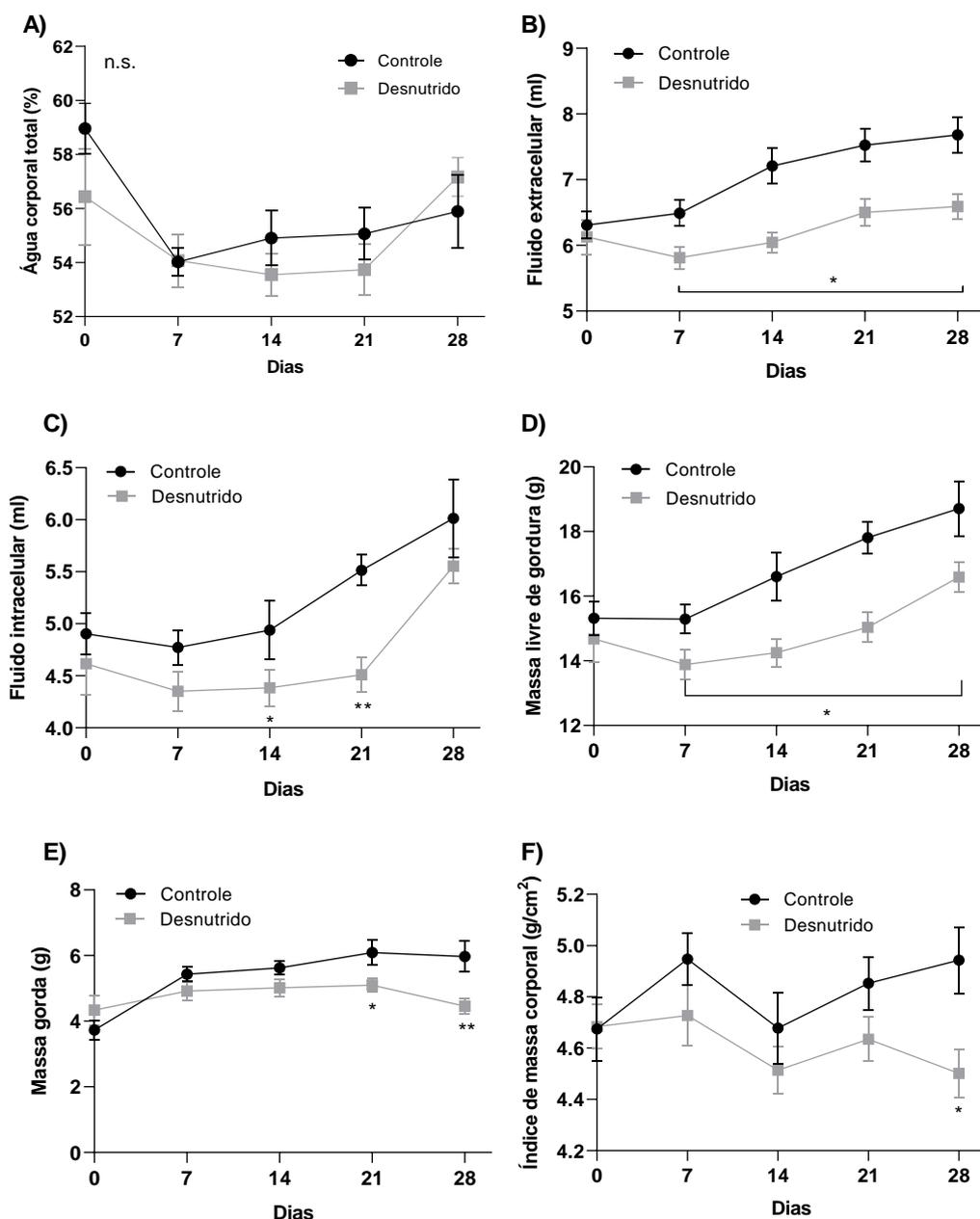
A) Peso (g) e B) ganho de peso (%) dos animais controles e desnutridos por um período total de 28 dias (* $p < 0,05$, teste *t* de *Student* para Desnutrido vs. Controle para cada dia e # $p < 0,05$, análise de variância para comparação do tempo 0 com os outros tempos no grupo desnutrido). C) Percentual de crescimento corporal dos animais controles e desnutridos nos dias 7, 14, 21 e 28 (n.s.= sem significância, teste *t* de *Student* para Controle vs. Desnutrido). Os dados são representativos de um experimento ($n=8-11$ /grupo). D) Consumo de água dos animais controles e desnutridos por um período de 28 dias (** $p < 0,05$, teste *t* de *Student* para Desnutrido vs. Controle para cada dia). Os dados são representativos da média de consumo de água dos animais controles e desnutridos de quatro linhas experimentais diferentes ($n=11$). E) Níveis séricos de albumina plasmática (g/dL) nos dias 7 e 28 de ingesta da dieta controle ou MAL-ED. Os dados são correspondentes a duas linhas experimentais ($n=7$). Os valores estão representados em média \pm EPM (n.s.= $p > 0,05$, teste *t* de *Student* para Desnutrido vs. Controle). F) Imagem representativa dos efeitos globais da dieta MAL-ED nos parâmetros

corporais no 28º dia. Todos os valores são apresentados pela média \pm erro padrão da média (EPM).

5.2.2 Efeitos crônico do consumo da dieta MAL-ED na composição corporal dos animais recém desmamados

Ao avaliarmos a composição corporal, identificamos que a água corporal total não apresentou diferença significativa em nenhum tempo avaliado (**Figura 10A**). Por outro lado, observou-se redução significativa ($p < 0,05$) do fluído extracelular e massa livre de gordura no grupo desnutrido nos dias 7, 14, 21 e 28 (**Figura 10B e 10D**, respectivamente). O fluído extracelular reduziu cerca de 13,15% no dia 7 e 17,52% no dia 28, enquanto a massa livre de gordura reduziu 10,47% e 10,10% nos dias 7 e 28, respectivamente. O fluído intracelular, por sua vez, reduziu ($p < 0,05$) 13,97% e 18,21% nos animais desnutridos apenas nos dias 14 e 21, respectivamente (**Figura 10C**). Em contrapartida, a nova dieta comprometeu as reservas de gordura apenas em período mais tardio (**Figura 10E**). A massa gorda reduziu significativamente ($p < 0,05$) 25,37% no grupo desnutrido em relação ao controle apenas no dia 28 (**Figura 10E**). O índice de massa corporal também foi reduzido significativamente ($p < 0,05$) no dia 28 (Controle $4,94 \pm 0,13$ g/cm² vs. Desnutrido $4,5 \pm 0,09$ g/cm²) (**Figura 10F**).

Figura 10 – Análise da composição corporal dos animais submetidos ao consumo da dieta MAL-ED e dieta controle.



A) Água corporal total (%), B) Fluido extracelular (ml), C) Fluido intracelular (ml), D) Massa livre de gordura (g), E) Massa gorda (g) e F) Índice de massa corporal (g/cm²) dos animais controles (linha preta) e desnutridos (linha cinza) nos tempos (dias) 0, 7, 14, 21, 28. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, teste t de Student para Desnutrido vs. Controle para cada tempo. Os valores da figura apresentam-se em média \pm EPM dos grupos ($n=10$) controle e desnutrido. Os valores de água corporal total foram normalizados pelo peso de cada animal avaliado e apresentados em percentual.

5.3 Efeitos da desnutrição induzida pela dieta MAL-ED na barreira morfofuncional intestinal

5.3.1 Alterações desencadeadas pelo consumo agudo e crônico da dieta MALE-ED na morfometria e histopatologia do intestino delgado

No dia 7, a análise morfométrica revelou que a dieta MAL-ED desencadeou redução significativa ($p < 0,0001$) da área dos vilos no duodeno (-34,37%) e jejuno (-41,37%) dos animais desnutridos, enquanto a área dos vilos no íleo foram maiores (+23,72%) quando comparados com os controles ($p < 0,0001$) (**Figura 11A**). No 28º dia de indução da desnutrição, por outro lado, identificamos que a área dos vilos foram significativamente ($p < 0,0001$) maiores no duodeno (276,38%) e íleo (27,84%) de camundongos desnutridos quando comparados ao controle (**Figura 11A**). No entanto, a área dos vilos no jejuno de animais desnutridos foram 13,52% menores ($p < 0,001$) em relação aos controles no mesmo tempo avaliado (**Figura 11A**). A área das criptas foi significativamente menor no duodeno (24,31%) e maior no íleo (12,42%) no dia 7, sem gerar alterações significativas ($p = 0,243$) no jejuno (**Figura 11B**). Em período mais crônico, identificamos que as áreas das criptas foram maiores ($p < 0,0001$) em todos os segmentos dos animais desnutridos em relação aos controles no dia 28 (**Figura 11B**). Ao avaliarmos os escores histopatológicos, não observamos alterações significativas ($p > 0,05$) em nenhum segmento ao compararmos os animais desnutridos com os controles (**Tabela 7**). Os achados mais importantes são presença de edema nos vilos, mas não observamos diferença entre os grupos. As imagens representativas do duodeno, jejuno e íleo dos animais desnutridos e controles nos dias 7 e 28 podem ser vistas na **Figura 12A e 12B**, respectivamente.

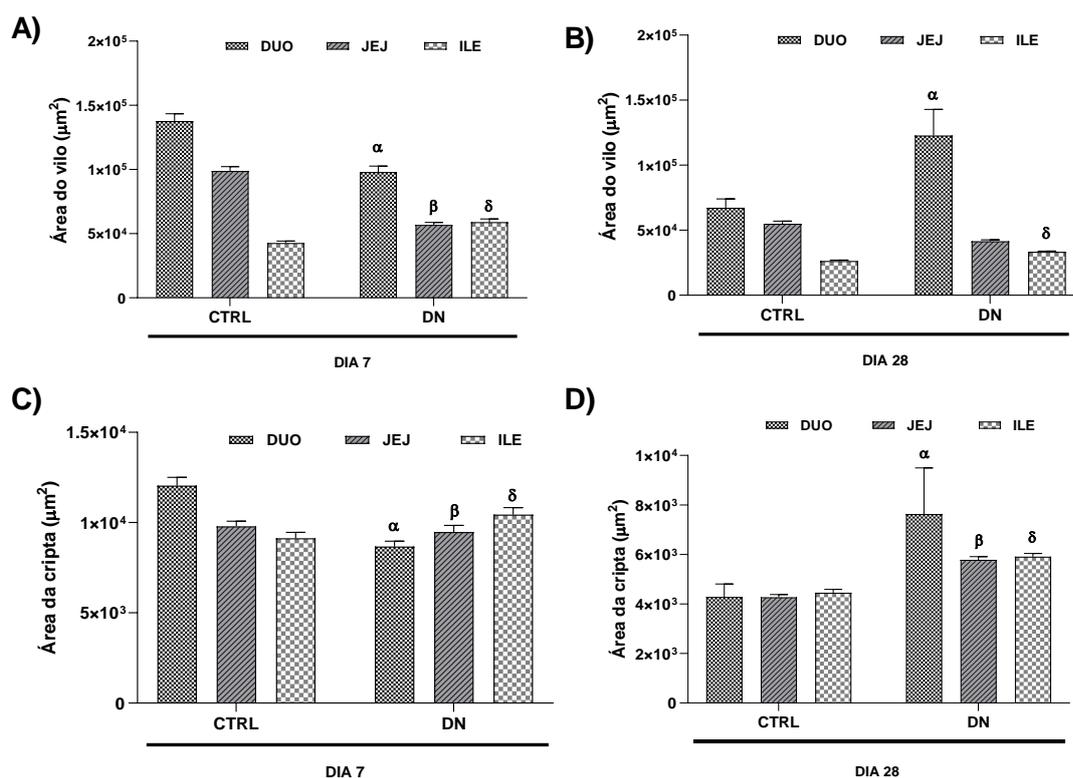
Tabela 7 – Escores histopatológicos desencadeados pelo consumo agudo e crônico da dieta MAL-ED.

Tempo	Grupo	Segmento intestinal	Escore
7 dias	Controle	Duodeno	1 (0 - 1)
		Jejuno	1 (0 -1)
		Íleo	0 (0 -1)
	Desnutrido	Duodeno	0 (0 - 1)
		Jejuno	0 (0 -1)
		Íleo	1 (0 -1)
28 dias	Controle	Duodeno	0 (0 - 0)
		Jejuno	0 (0 -1)
		Íleo	0 (0 -0)

Desnutrido	Duodeno	0 (0 -1)
	Jejuno	1 (0 -1)
	Íleo	0,5 (0 -1)

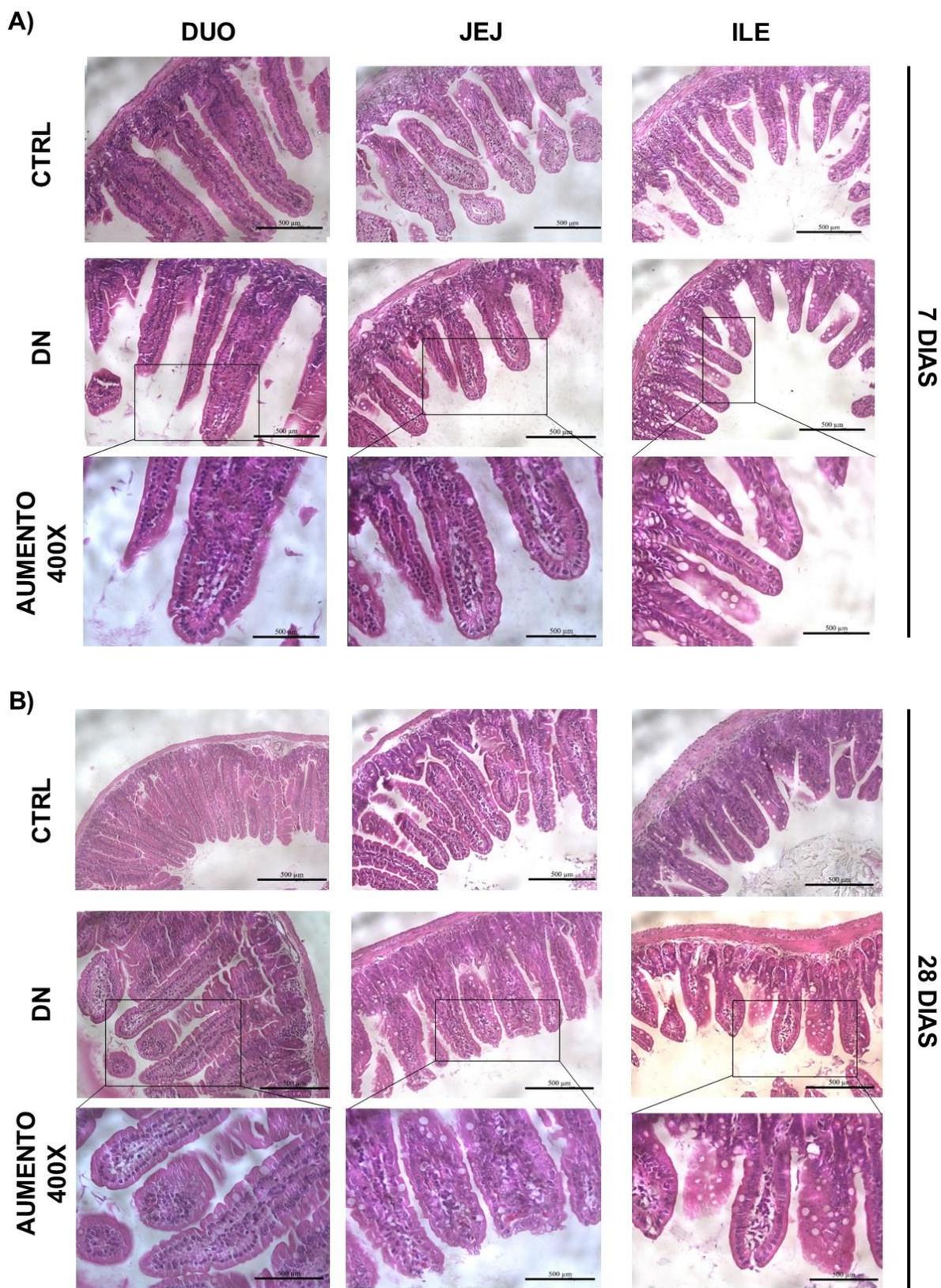
Os escores foram analisados usando o teste *Mann-Whitney*, Desnutrido vs. Controle para cada segmento do intestino nos tempos 7 e 28 dias. Os valores são expressos como mediana, mínimo e máximo.

Figura 11 – Efeitos do consumo agudo e crônico da dieta MAL-ED na morfometria do duodeno, jejuno e íleo.



Efeitos do consumo da dieta de desnutrição MAL-ED na área de vilos e criptas do duodeno, jejuno e íleo nos dias 7 e 28 de consumo. A) Área de vilos no dia 7 (μm^2) e B) área de vilos no dia 28 (μm^2), C) área de cripta (μm^2) no dia 7 e D) área de cripta (μm^2) no dia 28 do duodeno, jejuno e íleo dos grupos controle (CTRL) e desnutrido (DN). Os valores são apresentados em média \pm EPM (teste *Man Whitney*, DN vs. CTRL para cada segmento do intestino nos tempos 7 e 28 dias. α : $p < 0.0001$, comparação duodeno CTRL vs. duodeno DN; β : $p < 0.0001$, jejuno CTRL vs. jejuno DN; δ : $p < 0.0001$, íleo CTRL vs. íleo DN).

Figura 12- Imagens representativas dos segmentos intestinais dos animais controles e desnutridos pela dieta MAL-ED.



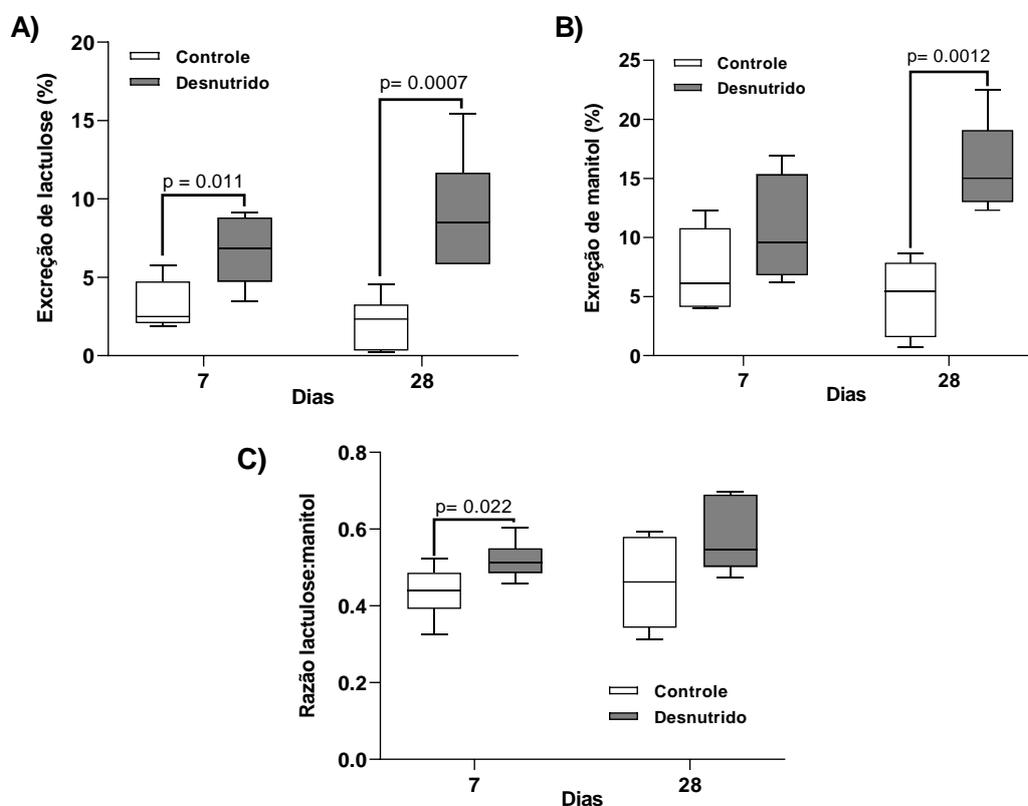
Efeitos do consumo da dieta de desnutrição MAL-ED nos vilos e criptas do duodeno, jejuno e íleo nos dias 7 e 28 de consumo. A) Imagens representativas no dia 7 e B) Imagens representativas no dia 28

do duodeno, jejuno e íleo dos grupos controle (CTRL) e desnutrido (DN). As imagens dos grupos são em aumento de 100x e a imagem em aumento de 400x é referente ao grupo DN em todos os segmentos. A barra de escala (branca) são de 100 μ m.

5.3.2 Alterações desencadeadas pelo consumo agudo e crônico da dieta MAL-ED na permeabilidade da barreira intestinal

A ingesta da dieta MAL-ED desencadeou aumento significativo ($p= 0,011$) de 103,9% na permeabilidade paracelular em relação a ingesta da dieta controle em período agudo (**Figura 13A**). O aumento da taxa de excreção de lactulose permaneceu maior em período crônico, sendo em média 348,1% maior ($p= 0,0007$) nos animais desnutridos em relação ao controle (**Figura 13A**). Com relação a área absorptiva total, não houve alterações significativa em período agudo, entretanto, foi registrado um aumento significativo ($p= 0,0012$) de 28,19% nos animais desnutridos em relação aos controles no dia 28 (**Figura 13B**). O consumo da dieta MAL-ED causou danos na integridade da barreira intestinal no dia 7, com aumento significativo ($p= 0,22$) da razão lactulose:manitol (LM) nos animais desnutridos em relação ao controle (**Figura 13C**). Contudo, não foi observado alterações significativas ($p= 1,014$) na razão LM entre os grupos (Controle: 0,462, 0,343 – 0,592 vs. Desnutrido: 0,547, 0,502 – 0,689) no dia 28 (**Figura 13C**).

Figura 13 – Efeitos do consumo agudo e crônico da dieta MAL-ED na permeabilidade intestinal.

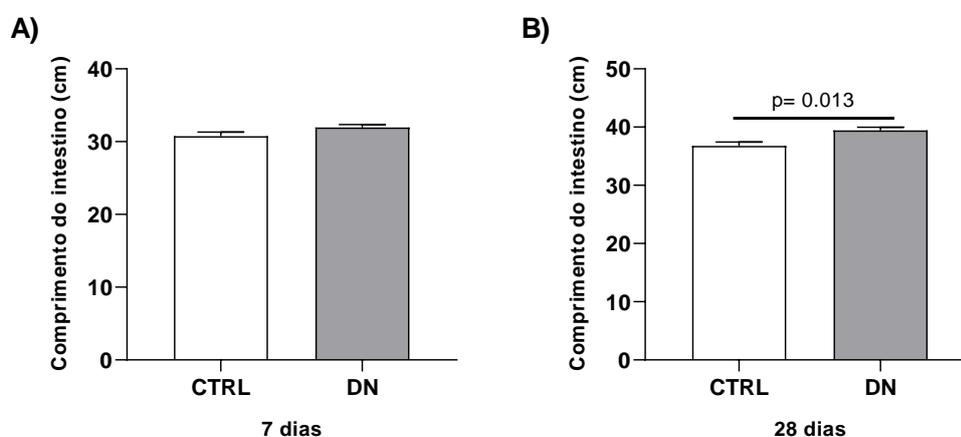


Permeabilidade intestinal nos animais que consumiram dieta controle e dieta MAL-ED. A) Excreção de lactulose (%), B) excreção de manitol (%) e C) razão lactulose/manitol em animais controles (caixa branca) e desnutridos (caixa cinza) no dia 7 e 28. Os dados são correspondentes a um experimento ($n=7-8$) e os valores estão representados em mediana, Q1-Q3 (valor de p especificado nos dados significativos, Desnutrido vs. Controle, teste *Man Whitney*).

5.3.3 Efeitos do consumo agudo e crônico da dieta MAL-ED no tamanho total do intestino delgado

De forma surpreendente, registrou-se um aumento do tamanho total do intestino delgado de animais desnutridos pela dieta MAL-ED em relação ao controle em período crônico. Nenhuma alteração no tamanho total do intestino delgado foi encontrada para o tempo de sete dias (**Figura 14A**), mas cerca de 7,26% do tamanho do intestino foi maior ($p= 0,013$) em animais desnutridos quando comparados ao controle no dia 28 (**Figura 14B**). Também observamos uma quantidade de conteúdo intestinal maior nos animais desnutrido em relação aos controles em ambos os tempos de coleta de amostras, dados não quantificados.

Figura 14 – Efeitos do consumo agudo e crônico da dieta MAL-ED no tamanho do intestino delgado.

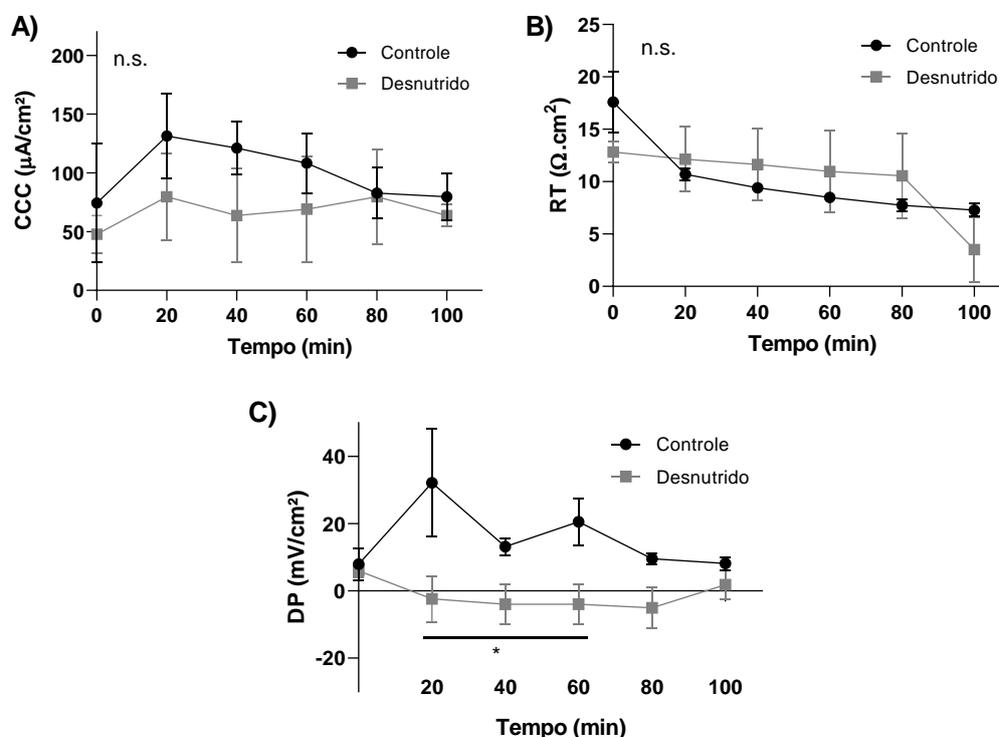


Avaliação do tamanho total do intestino delgado de animais controles (CTRL) e animais desnutridos (DN). A) Comprimento do intestino (cm) no dia 7 e B) Comprimento do intestino (cm) no dia 28. Os resultados são representativos de uma linha experimental ($n=6-8$). Os valores estão representados por média \pm EPM (valor de p especificado nos dados significativos, Desnutrido vs. Controle, teste *Man Whitney*).

5.3.4 Efeitos do consumo agudo da dieta desnutrido MAL-ED na corrente de curto-circuito, na diferença de potencial e na resistência elétrica transepitelial em condições basais

Avaliamos a corrente de curto-circuito (CCC), a diferença de potencial (DP) e a resistência elétrica transepitelial (RT) sem adição de substratos, ou seja, basal por um total de 100 min para cada grupo. Identificamos que a CCC basal do grupo desnutrido se manteve relativamente ($p > 0,05$) inferior ao grupo controle até o tempo de 60 min. No entanto, houve uma redução da CCC basal no grupo controle no tempo de 80 e 100 min, no qual gerou CCC basal semelhante entre os grupos ($p > 0,05$) (**Figura 15A**). A RT basal foi similar ($p > 0,05$) entre os grupos em todo o período experimental, com exceção do tempo 0 e 100 min onde o grupo controle obteve uma RT basal maior que o grupo desnutrido, mas também sem diferença significativa ($p > 0,05$) (**Figura 15B**). A DP, em contrapartida, foi semelhante ($p > 0,05$) entre os grupos no tempo inicial e final, entretanto foi significativamente ($p < 0,05$) menor nos animais desnutridos em relação aos controles nos tempos 20, 40, 60 min (**Figura 15C**).

Figura 15 – Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED na corrente de curto-circuito, diferença de potencial e resistência elétrica transepitelial em condições basais.



Os dados são equivalentes aos valores de CCC, RT e DP sem adição de substratos por um período de 100 min com medições a cada 5 min, porém aqui representados de 20 em 20 min. O segmento analisado foi o jejuno dos animais controles e desnutridos. Os valores estão apresentados em média \pm EPM (*n.s.* = $p > 0,05$, * $p < 0,05$, Desnutrido vs. Controle, teste *Man Whitney*, $n = 3-5$).

5.3.5 Efeitos do consumo agudo da dieta desnutrido MAL-ED na corrente de curto-circuito, na diferença de potencial e na resistência elétrica transepitelial durante o transporte de glutamina, alanil-glutamina e glicose

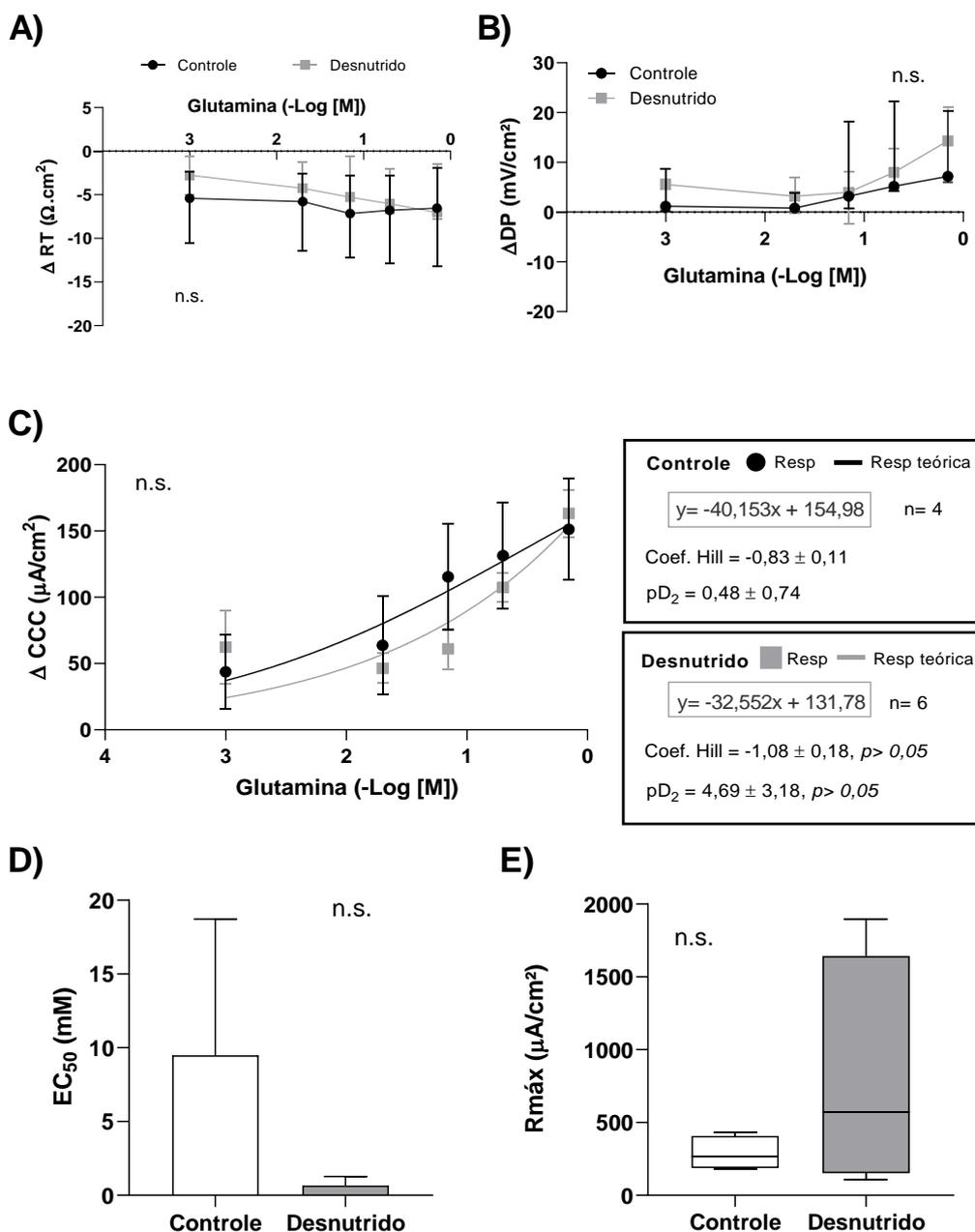
5.3.5.1 Efeitos das concentrações cumulativas de glutamina no jejuno de animais controles e desnutridos

O desafio com concentrações cumulativas de glutamina mostram que os animais desnutridos por sete dias não apresentam respostas diferentes ($p > 0,05$) em relação aos controles nos valores de ΔCCC , ΔRT e ΔDP (**Figura 16**). O ΔRT diminui gradativamente em ambos os grupos com a adição de concentrações maiores de glutamina, enquanto o ΔDP aumenta (**Figura 16A e 16B**, respectivamente). Estes valores são condizente com o aumento do fluxo de corrente conforme adiciona-se concentrações crescentes de glutamina em ambos os grupos (**Figura 16C**). No

entanto, observou-se uma ΔRT menos negativa nos animais desnutridos em relação ao controles, apesar de, não haver diferença significativa ($p > 0,05$) (**Figura 16A**). O ΔDP , em contrapartida, foi bem semelhante ($p > 0,05$) entre os grupos em todas as concentrações avaliadas (**Figura 16B**). O ΔCCC também obteve valores semelhantes ($p > 0,05$) entre os grupos, porém a curva dose resposta mostra alguns parâmetros diferentes (**Figura 16C, 16D, 16E**).

A **Figura 16C** mostra a curva dose resposta da glutamina para ΔCCC dos animais controles e desnutridos. A equação da reta foi diferente para ambos os grupos, bem como o coeficiente de Hill (Controle $-0,83 \pm 0,11$ vs. Desnutrido $-1,08 \pm 0,18$), porém sem diferença significativa ($p = 0,32$) (**Figura 16C**). O pD_2 , por outro lado, foi maior para o grupo desnutrido em relação ao controle, apesar de não haver diferença significativa ($p = 0,11$) (**Figura 16C**). Conseqüentemente encontramos uma menor concentração que causa 50% do efeito máximo (EC_{50}) no jejuno desnutrido quando comparado ao controle, porém sem diferença significativa ($p = 0,4$) (**Figura 16D**). O EC_{50} foi 5,4 vezes menor no jejuno desnutrido em relação ao controle (**Figura 16D**). A Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) a glutamina foi relativamente maior nos animais desnutridos em relação ao controle, mas não foi registrado diferença significativa ($p = 0,68$) (**Figura 16E**).

Figura 16 – Efeitos das concentrações cumulativas da glutamina no jejuno de animais controles e desnutridos.



Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED na variação da A) resistência elétrica transepitelial (ΔRT), B) diferença de potencial (ΔDP), C) corrente de curto-circuito (ΔCCC), D) EC_{50} e E) $R_{máx}$ em resposta a concentrações cumulativas de glutamina no segmento de jejuno dos animais controles e desnutrido. Os resultados de ΔRT , ΔDP e $R_{máx}$ estão representados por mediana e intervalo interquartil (Q1 e Q3) (n.s. = $p > 0,05$, Desnutrido vs. Controle, teste *Man Whitney*). A resposta teórica do ΔCCC na curva dose-resposta da glutamina nos grupos controle corresponde a linha preta e no desnutrido a linha cinza, enquanto a resposta está representada por círculo preto no controle e quadrado cinza no desnutrido. Os valores de ΔCCC e EC_{50} estão representados por média \pm EPM (n.s. = $p > 0,05$, * $p < 0,05$, Desnutrido vs. Controle, teste *t* de Student). Todos os resultados são representativos de uma linha experimental ($n = 4 - 6$).

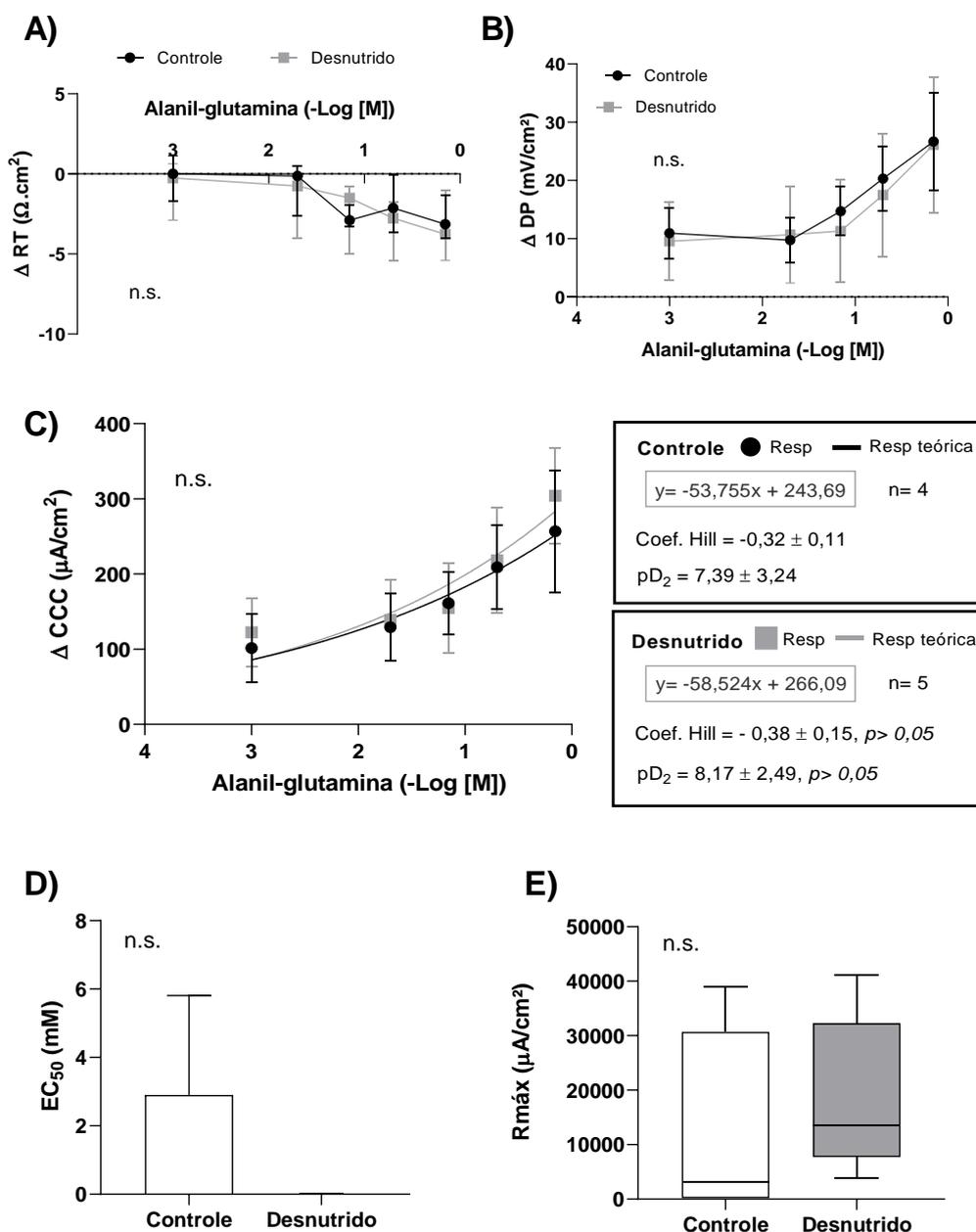
5.3.5.2 Efeitos das concentrações cumulativas de alanil-glutamina no jejuno de animais controles e desnutridos

O desafio com concentrações cumulativas de alanil-glutamina mostram que a dieta MAL-ED não causa alterações significativas ($p > 0,05$) nos valores de Δ CCC, Δ RT e Δ DP no jejuno em período agudo (**Figura 17**). O Δ RT diminui gradativamente em ambos os grupos com a adição de concentrações de alanil-glutamina (**Figura 17A**), ao passo que o Δ DP e o Δ CCC aumentam de acordo com a adição de alanil-glutamina (**Figura 17B e 17C**, respectivamente). Estes valores são condizente com o aumento do transporte transcelular de alanil-glutamina conforme aumenta as concentrações.

Identificamos que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no Δ RT e no Δ DP entre os grupos (**Figura 17A e 17B**, respectivamente). O Δ CCC também foi bem semelhante ($p > 0,05$) entre os grupos, conforme pode ser visto na **Figura 17C**. A curva dose resposta da alanil-glutamina evidência comportamento de absorção de dipeptídeo semelhante entre os animais controles e desnutridos. A equação da reta foi diferente para ambos os grupos, mas nota-se uma certa similaridade. O coeficiente de Hill foi diferente entre os grupos, porém sem diferença significativa (Controle $-0,84 \pm 2,08$ vs. Desnutrido $-1,35 \pm 3,24$, $p = 0,31$) (**Figura 17C**). O coeficiente de Hill de ambos os grupos são próximos a 1,0, indicando que ambos as curvas seguem o padrão de curva dose resposta.

O pD_2 para o grupo desnutrido foi ligeiramente maior ($p > 0,05$) em relação ao controle (**Figura 17C**), assim, o EC_{50} também foi menor no jejuno desnutrido em relação ao controle, mas sem diferença significativa ($p > 0,05$) (**Figura 17D**). A $R_{m\acute{a}x}$ para a alanil-glutamina foi relativamente maior ($p = 0,87$) nos animais desnutridos em relação ao controle (**Figura 17E**).

Figura 17 – Efeitos das concentrações cumulativas da alanil-glutamina no jejuno de animais controles e desnutridos.



Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED na variação da A) resistência elétrica transepitelial (ΔRT), B) diferença de potencial (ΔDP), C) corrente de curto-circuito (ΔCCC), D) EC_{50} e E) $R_{m\acute{a}x}$ em resposta a concentrações cumulativas de alanil-glutamina no segmento de jejuno dos animais controles e desnutrido. Os resultados de ΔRT e $R_{m\acute{a}x}$ estão representados por mediana e intervalo interquartil (Q1 e Q3) (n.s. = $p > 0,05$, Desnutrido vs. Controle, teste *Mann Whitney*). A resposta teórica da ΔCCC na curva dose-resposta da alanil-glutamina nos grupos controle corresponde a linha preta e no desnutrido a linha cinza, enquanto a resposta está representada por círculo preto no controle e quadrado cinza no desnutrido. Os valores de ΔDP , ΔCCC e EC_{50} estão representados por média \pm EPM (n.s. = $p > 0,05$, Desnutrido vs. Controle, teste *t* de Student). Todos os resultados são representativos de uma linha experimental (n = 4 – 5).

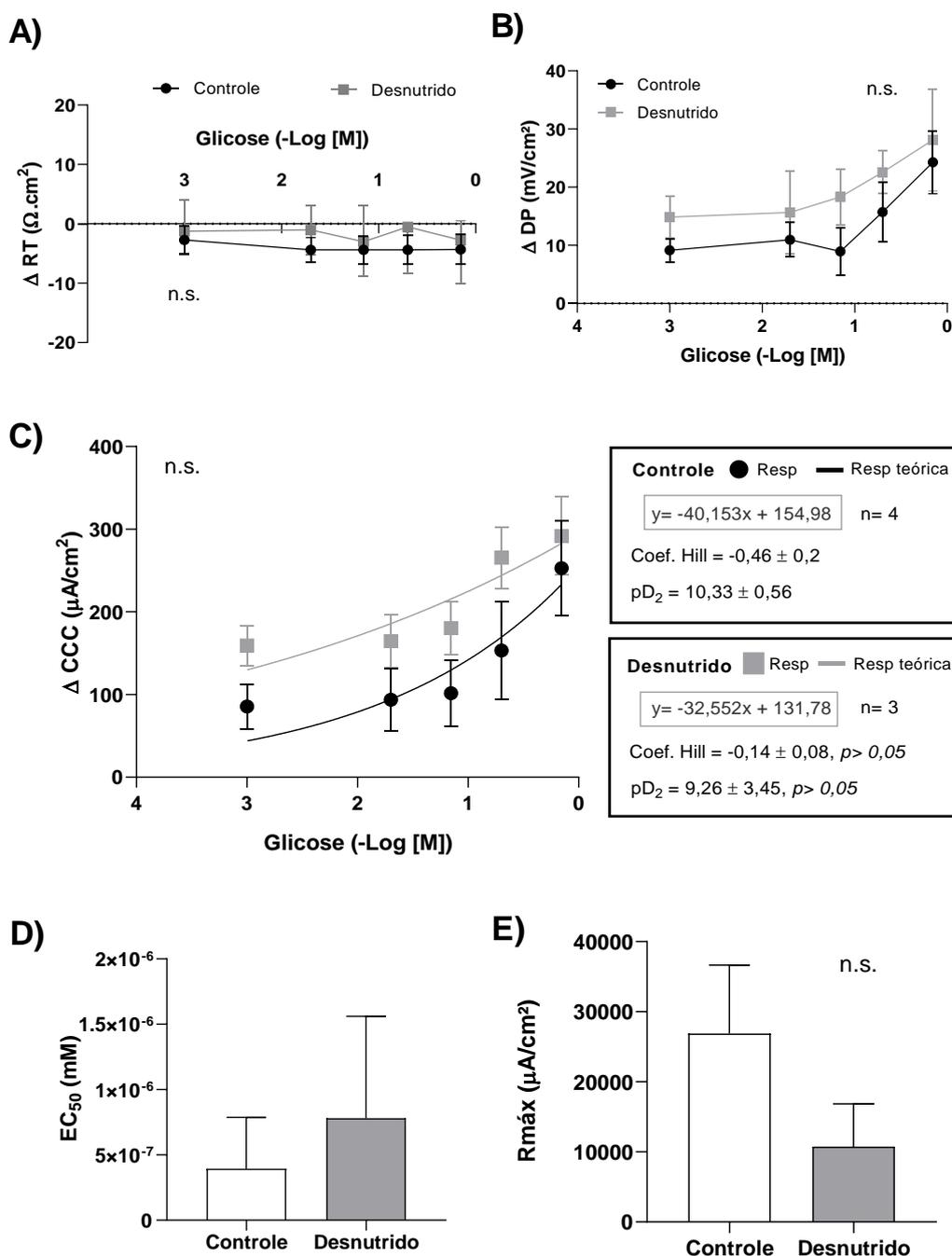
5.3.5.3 Efeitos das concentrações cumulativas de glicose no jejuno de animais controles e desnutridos

O desafio com concentrações cumulativas de glicose não causou respostas diferentes ($p > 0,05$) nos valores de Δ CCC, Δ RT e Δ DP no jejuno desnutrido pela dieta MAL-ED em relação aos controles (**Figura 18**). A resposta do jejuno a concentrações crescentes de glicose foi semelhante aos demais substratos (**Figura 18A**), com redução gradual de Δ RT, a proporção que o Δ DP e o Δ CCC aumentam (**Figura 18B** e **18C**, respectivamente).

O Δ RT e o Δ DP não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) ao compararmos as respostas dos animais desnutridos em relação ao controles (**Figura 18A** e **18B**, respectivamente). O Δ DP foi relativamente maior nos animais desnutridos em relação aos controles, porém sem diferença significativa ($p > 0,05$) (**Figura 18B**). O Δ CCC também foi bem semelhante ($p > 0,05$) entre os grupos, porém a curva dose resposta mostra alguns parâmetros diferentes (**Figura 18C, 18D, 18E**). As curvas dose respostas apresentaram equações da reta diferentes para ambos os grupos, bem como o coeficiente de Hill (Controle $-1,73 \pm 4,16$ vs. Desnutrido $-2,95 \pm 2,97$), porém sem diferença significativa ($p = 0,13$) para ambos os parâmetros (**Figura 18C**). Os coeficientes de Hill foram diferentes de 1,0, significando que as curvas não seguem o padrão de curva dose resposta (**Figura 18C**).

O pD_2 foi relativamente ($p > 0,05$) menor para o grupo desnutrido em relação ao controle (**Figura 18C**), gerando um EC_{50} cerca de 1,98 vezes maior para o jejuno desnutrido em relação ao controle, mas também sem diferença significativa ($p = 0,65$) (**Figura 18D**). No entanto, os $R_{m\acute{a}x}$ foi cerca de 2,5 vezes menor no intestino desnutrido quando comparado ao controle, porém sem apresentar diferença significativa ($p = 0,26$) (**Figura 18E**).

Figura 18 – Efeitos das concentrações cumulativas da glicose na corrente de curto-circuito em animais controles e desnutridos.



Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED na variação da A) resistência elétrica transepitelial (ΔRT), B) diferença de potencial (ΔDP), C) corrente de curto-circuito (ΔCCC), D) EC_{50} e E) $R_{\text{máx}}$ em resposta a concentrações cumulativas de glicose no segmento de jejuno dos animais controles e desnutrido. Os resultados de ΔRT estão representados por mediana e intervalo interquartil (Q1 e Q3) (n.s. = $p > 0,05$, Desnutrido vs. Controle, teste *Mann Whitney*). A resposta teórica do ΔCCC na curva dose-resposta da glicose nos grupos controle corresponde a linha preta e no desnutrido a linha cinza, enquanto a resposta está representada por círculo preto no controle e quadrado cinza no desnutrido. Os valores de ΔDP , ΔCCC , EC_{50} e $R_{\text{máx}}$ estão representados por média \pm EPM (n.s. = $p > 0,05$, * $p < 0,05$,

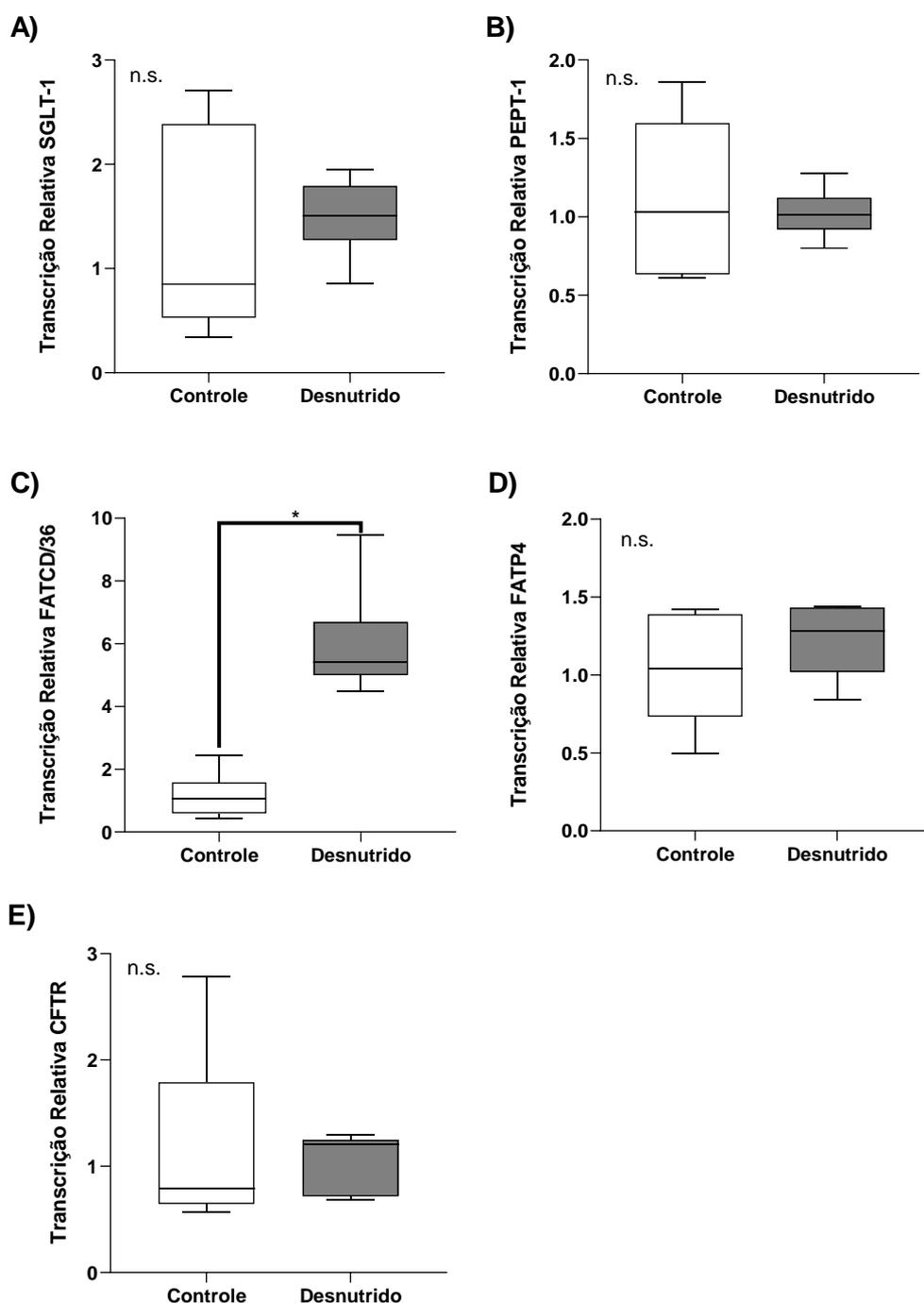
Desnutrido vs. Controle, teste *t* de Student). Todos os resultados são representativos de uma linha experimental ($n= 3 - 4$).

5.3.6 Efeito agudo do novo modelo de desnutrição MAL-ED nos níveis de transcritos dos transportadores intestinais e das proteínas formadoras de junções firmes

O consumo agudo da dieta MAL-ED desencadeou alterações nos níveis de transcritos de FATCD/36. Houve um aumento significativo ($p= 0,022$) de 384% dos níveis de transcritos de FATCD/36 no jejuno de animais desnutridos em relação aos animais controles no dia 7 (**Figura 19C**). Ao avaliarmos os níveis transcritos de SGLT-1, PEPT-1, FATP4 e CFTR não houve diferença significativa ($p> 0,05$) entre os grupos controle e desnutrido (**Figura 19A, 19B, 19D, 19E**, respectivamente).

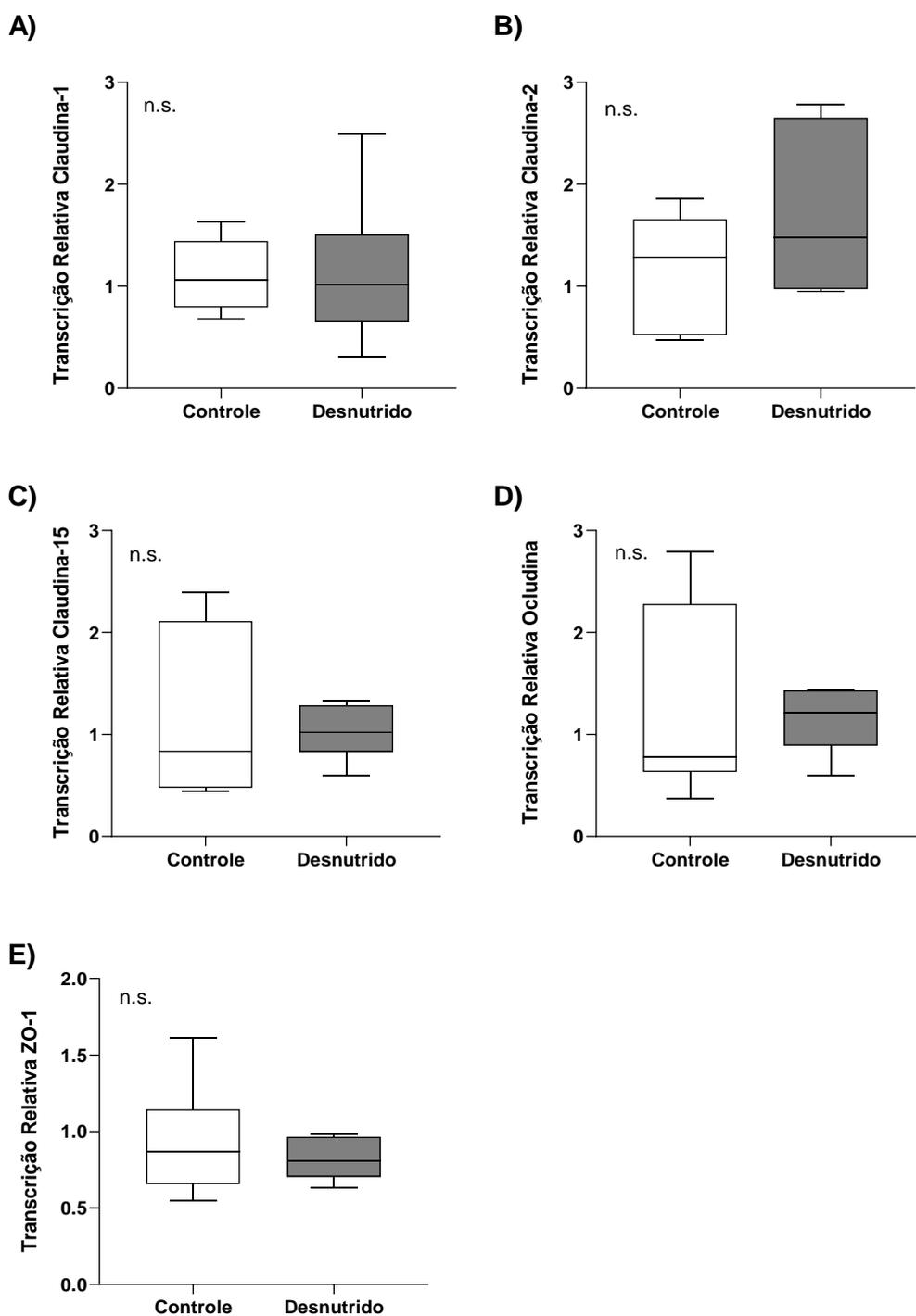
Ao avaliarmos os níveis de transcritos de claudina-1, -2, -15, ocludina e ZO-1, também não observamos diferença significativa ($p> 0,05$) entre os grupos (**Figura 20A, 20B, 20C, 20D, 20E**, respectivamente).

Figura 19 – Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED nos níveis de transcritos dos transportadores intestinais e canal iônico.



Transcrição relativa dos níveis de A) SGLT-1, B) PEPT-1, C) FATP4 e D) FATCD/36 do raspado da mucosa do jejuno dos animais controles (caixa branca) e desnutridos (caixa cinza) no tempo de 7 dias. Os dados são representativos de uma linha experimental ($n=8$). Os valores estão representados em mediana, máximo e mínimo ($*p < 0,05$, teste *Mann Whitney*, Desnutridos vs. Controle).

Figura 20 - Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED nos níveis de transcritos das proteínas formadoras de junções firmes.

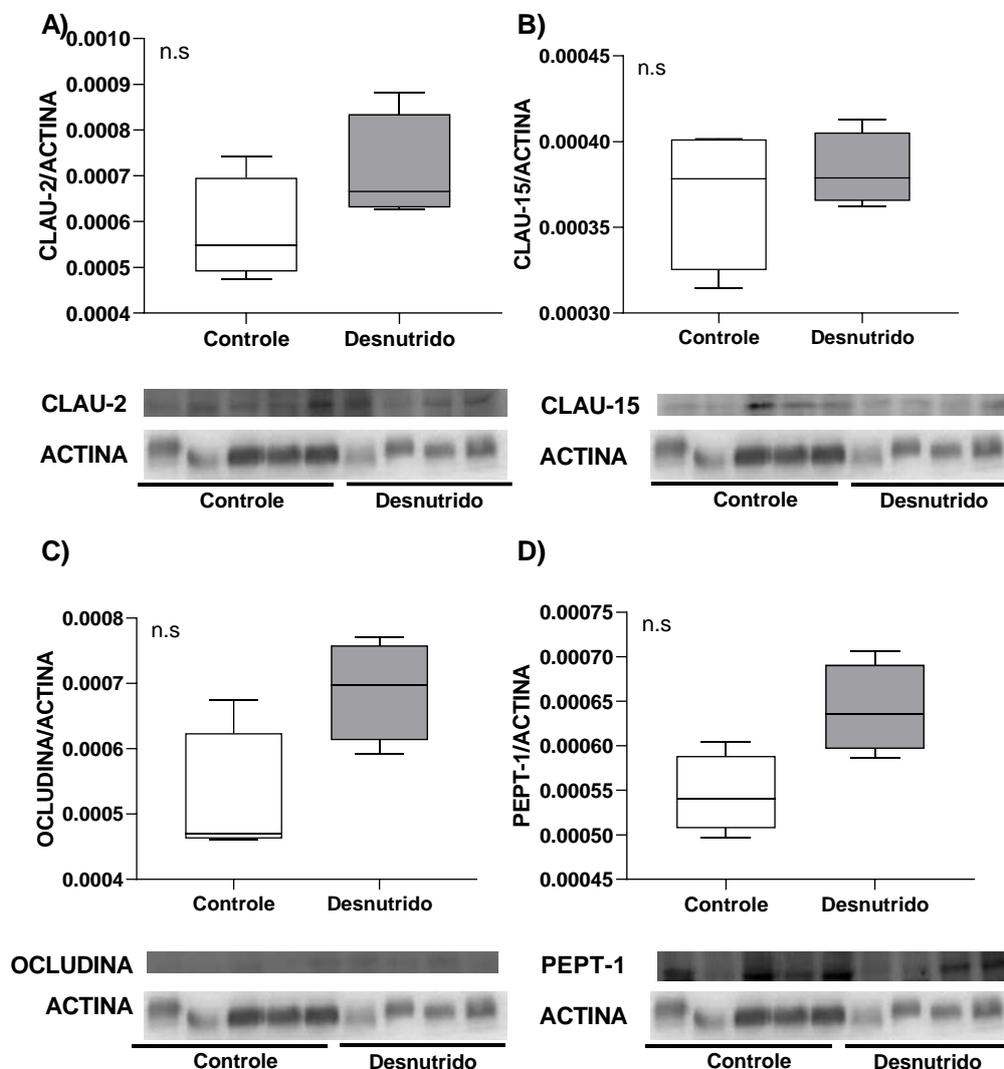


Representação gráfica dos níveis de transcritos de A) claudina-1, B) claudina-2, C) claudina-15 e de D) ocludina do raspado da mucosa do jejuno dos animais controles (caixa branca) e desnutridos (caixa cinza) no tempo de 7 dias. Os valores estão representados em mediana, máximo e mínimo ($*p < 0,05$, teste *Man Whitney*, Desnutridos vs. Controle).

5.3.7 Efeitos agudo do novo modelo de desnutrição MAL-ED na expressão proteica de transportadores intestinais e das proteínas formadoras de junções firmes

Ao avaliarmos a expressão proteica, identificamos que os níveis de claudina-2, -15 e ocludina não diferiram significativamente ($p > 0,05$) entre os grupos, como pode ser visto nas **Figuras 21A, 21B, 21C**, respectivamente. Os níveis de PEPT-1 também não foram alterados ($p > 0,05$) entre os grupos (**Figura 21D**). A expressão de claudina-1 e SGLT-1 também foram avaliadas, no entanto, não detectamos um bom sinal para as amostras, conforme pode ser visto no **Anexo B (Figura 1B e 2B)**.

Figura 21 – Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED na expressão proteica de transportadores intestinal e proteínas formadoras de junções firmes.



Representação gráfica da expressão proteica de A) claudina-2, B) claudina-15, C) ocludina e de D) PEPT-1 do raspado da mucosa do jejuno dos animais controles (caixa branca) e desnutridos (caixa cinza) no tempo de 7 dias. Os valores estão representados em mediana, máximo e mínimo (n.s. = $p > 0,05$, teste *Man Whitney*, Desnutridos vs. Controle).

6 DISCUSSÃO

Desenvolvemos uma nova dieta experimental de desnutrição baseada na dieta de crianças desnutridas de sete países de baixo poder socioeconômico capaz de reduzir rapidamente o peso e o ganho de peso, comprometer as reservas corporais energéticas, impactando no crescimento de camundongos C57BL/6 recém desmamados em período tardio e sem causar edema. A nível intestinal, a dieta MAL-ED desencadeou embotamento da área de vilos no duodeno e jejuno, aumento da permeabilidade paracelular, com indicativo de dano a integridade da barreira epitelial intestinal, associado ao aumento dos níveis de RNAm de FATCD/36 no jejuno e redução da DP basal em período agudo, com adaptações principalmente de área intestinal total em período mais crônico.

Evidências sugerem que grande parte da desnutrição em países de baixa e média renda são provenientes de deficiências nutricionais nas dietas complementares (BROWN; DEWEY; ALLAN, 1998). Contudo, a quantificação dos nutrientes da dieta complementar de crianças e sua associação com a desnutrição infantil é bastante escassa na literatura (CAMPBELL et al., 2018; ERSINO; HENRY; ZELLO, 2016; OWAIS, 2016; RAYMOND, 2017), refletindo diretamente em dietas experimentais de desnutrição com pouca representatividade clínica. A maioria dos modelos experimentais utilizam dietas com drásticas redução de nutrientes específicos, por exemplo: dietas com 0% (BELMONTE et al., 2007), 0,7% (CORWARE et al., 2014), 2% (MAYNERIS-PERXACHS et al., 2016), 4% (BOLICK et al., 2014; EYZAGUIRRE-VELÁSQUEZ et al., 2017) e 7% de proteína (BROWN et al., 2015); modelos experimentais com 15 a 50% a menos de calorias em relação ao grupo controle (JAHNG et al., 2007; NÚÑEZ et al., 2013; PAN et al., 2018; PARK et al., 2017); e dieta com menos de 2 ppm de zinco (BOLICK et al., 2014; MAYNERIS-PERXACHS et al., 2016).

Além disto, as dietas baseadas nos alimentos mais consumidos por crianças desnutridas de determinadas regiões, como a dieta milho vegetal (MAY et al., 2018), a M8 (BLANTON et al., 2016) e a DBR (TEODÓSIO et al., 1990), são dietas com elevada deficiência proteica (~ menos 65%), de lipídeos (menos 50 a 90%), de fibras (menos 56 a 53,6%) e ricas em carboidratos (mais 35 a 37%). No entanto, Maciel et al. (2020) demonstraram que a quantidade de proteínas variaram apenas de

-2,0 a -6,6% na dieta de crianças desnutridas em relação a dieta de crianças saudáveis, a quantidade de lipídeos foi de -12,4 a +6,0%, a deficiência de zinco variou -8,6 a -2,3%, a quantidade de energia variou de -25,9 a +11,2%, os carboidratos variaram apenas de -1,5 a +7,1% e fibras de -8,9 a +37,7%, conferindo deficiências mais moderadas do que os modelos de experimentação animal. Nosso trabalho desenvolveu a primeira dieta de experimentação animal baseada na quantificação de nutrientes da dieta complementar de crianças com desnutrição crônica aos 24 meses, com deficiência moderada em energia (-8%), proteína (-37%), lipídios (-27%) e zinco (-10%) e aumento moderado em carboidratos (+5,9%) e fibras (+45%) em relação a dieta controle.

A nova dieta de experimentação MAL-ED possui maior deficiência em proteínas e lipídeos do que a dieta das crianças com desnutrição crônica aos 24 meses, entretanto, os modelos experimentais utilizam dietas com redução de 65% a 100% de proteína e redução de 50 a 90% de lipídeos (BELMONTE et al., 2007; BROWN et al., 2015; TEODÓSIO et al., 1990). Logo, o percentual de proteínas e lipídeos da dieta MAL-ED não invalidam a representatividade clínica da nova dieta. Além disto, menor quantidade de zinco e maior quantidade de fibras foram associadas com a desnutrição crônica infantil (MACIEL et al., 2020).

A suplementação de zinco tem efeito positivo no crescimento de crianças menores de cinco anos de idade (LIU et al., 2018). Ademias, modelos experimentais vêm demonstrando o papel do zinco na susceptibilidade a doenças infecciosas, porém utilizam dietas com baixíssimo teor de zinco (BOLICK et al., 2013; GIALLOUROU et al., 2018; QS MEDEIROS et al., 2019), enquanto os modelos experimentais baseados na alimentação de populações específicas não abrangem a deficiência de zinco e utilizam dietas com deficiência em fibras (BLANTON et al., 2016; MAY et al., 2018; TEODÓSIO et al., 1990). Desta forma, a nova dieta MAL-ED possui características gerais da dieta complementar de crianças com desnutrição crônica aos 24 meses, consistindo numa dieta de desnutrição com relevância clínica para fase de introdução alimentar, baseada em dados de consumo alimentar e dietético de crianças de diversos países.

Alterações nos parâmetros corporais são os primeiros indícios de desnutrição. A dieta MAL-ED causou rápida redução de peso, menor ganho de peso

e comprometeu o crescimento dos animais em período crônico. Estes resultados corroboram com outros modelos de deficiência nutricional, que relatam alteração de peso e/ou ganho de peso na primeira semana de indução (BROWN et al., 2015; MAY et al., 2018; PAN et al., 2018; QUEIROZ et al., 2014), assim como déficit de crescimento dos animais em período crônico (BROWN et al., 2016; RIBEIRO, 2017). Além disso, estes resultados corroboram com os dados clínicos das crianças com desnutrição crônica pertencentes ao estudo coorte MAL-ED (MACIEL et al., 2021), consolidando a representação clínica da nova dieta experimental de desnutrição. Contudo, o consumo da dieta MAL-ED causou desnutrição apenas quando a quantidade de ração foi controlada diariamente.

A maioria dos estudos não relatam o consumo de ração nos modelos experimentais de desnutrição, assim como não avaliam a relação de dietas deficientes com os níveis de apetite (BROWN et al., 2015; UENO et al., 2011; JANGH et al., 2007). No entanto, a restrição calórica crônica de 15% (PARK et al., 2017) e 30% (PAN et al., 2018) foram reportadas por causar redução dos níveis séricos de leptina, o que pode indicar aumento da sensação de fome, associada com redução de peso e da massa gorda. Logo, a redução de calorias da dieta MAL-ED pode ter ocasionado redução nos níveis de leptina, gerando sensação de fome e aumento do consumo de ração nos animais desnutridos, quando fornecida *ad libitum*.

A dieta MAL-ED também causou alterações na composição corporal dependente do tempo. Esta análise é uma importante ferramenta para a avaliação do estado nutricional, todavia é pouco explorada em modelos *in vivo*. Neste estudo, identificamos uma redução fluído extracelular, sem alterar a água corporal total, apesar de, ocorrer relativo aumento de consumo de água após a primeira semana. Este resultado pode ser decorrente da redução da capacidade de reabsorção de água livre no rim, sinal clínico reportado na desnutrição energético proteica (BANABE; MARTINEZ-MALDONADO, 1998). Além disto, a dieta MAL-ED reduziu rapidamente a massa magra, enquanto o fluído intracelular reduziu apenas em período intermediário, as reservas lipídicas e o IMC reduziram somente em período crônico de consumo. Resposta semelhante foi observada pela desnutrição por DBR em animais recém desmamados, no qual foi relatado redução da água corporal total, fluído extracelular e reservas energéticas a partir do dia 7, enquanto o fluído intracelular reduziu apenas nos dias 7 e 14, não havendo alteração no IMC (RIBEIRO, 2022).

Em geral, sabe-se que o metabolismo de diversos órgãos na desnutrição é sustentado principalmente pela mobilização de gordura, sendo as reservas proteicas acionadas apenas quando o consumo de energia e proteínas é insuficiente para manter o metabolismo proteico (CAHILL, 2006). No entanto, um estudo ressaltou que condições patológicas como infecção e inflamação podem exigir aumento de demanda de aminoácidos, que, por sua vez, aumentam o catabolismo proteico e reduzem primeiro a massa magra em relação a massa gorda (BRIEND; KHARA; DOLAN, 2015). Além disto, estudos tem mostrado que a desnutrição aguda grave e desnutrição crônica causam redução de massa magra e preservação de massa gorda em crianças (LELIJVELD et al., 2016; SKAU et al., 2019), provavelmente como maneira de manter reservas energéticas (WELLS, 2019). Dessa forma, nossos dados sugerem um aumento precoce do catabolismo proteico pela dieta MAL-ED, no qual fatores como disbiose (BROWN et al., 2015) e aumento de inflamação sistêmica (ATTIA et al., 2016; QUEIROZ et al., 2014; GUERRANT et al., 2016; LIMA et al., 2014) podem estar envolvidos, contudo, mais estudos são necessários para compreender melhor a patofisiologia associada a esta condição.

Na clínica, a desnutrição aguda indica recente e severa perda de peso e pode ser dividida em três tipos de manifestação clínica: marasmo, *kwashiorkor* e *kwashiorkor* marasmático. A mensuração de água corporal total e fluído extracelular estimam a formação de edema, principal característica de crianças com *kwashiorkor* (ACF, 2010). Além disto, o *kwashiorkor* é relacionado a atrofia muscular grave, sem perda de gordura subcutânea e baixos níveis séricos de albumina, decorrentes de uma dieta com deficiência proteica (ACF, 2010). O marasmo, por sua vez, é condição geralmente derivada da restrição calórica, sendo diagnosticada pela perda de tecido adiposo e tecido muscular, sem presença de edema e com proteínas viscerais relativamente normais, incluindo albumina (SOETERS et al., 2017). O marasmo também pode gerar déficit de crescimento, mas principalmente está associada a redução de peso (AAKANKSHA et al., 2009). O *kwashiorkor* marasmático, por sua vez, tem um quadro clínico complexo onde é observado características das duas condições (SOUZA, et al., 2016).

Nossos dados mostraram que o consumo da dieta MAL-ED comprometeu as reserva energéticas corporais principalmente em período tardio, sem formação de edema e ausência de alterações nos níveis séricos de albumina. A albumina, apesar

de, ser um marcador nutricional de proteínas viscerais tem sido cada vez menos usada devido seu tempo de meia vida longa e também devido a inespecificidade patológica (KELLER, 2019). Dessa forma, uma vez que, a dieta MAL-ED é deficiente em energia e proteínas, nossos dados sugerem que esta é capaz de desenvolver nos animais um quadro clínico semelhante ao *kwashiokor* marasmático.

A desnutrição infantil também tem sido associada com alterações na barreira morfofuncional intestinal, mais especificamente atrofia de vilos e aumento da permeabilidade intestinal (AMADI et al., 2017; LIMA et al., 2005; 2007; SULLIVAN et al., 1991). No entanto, em modelos animais observamos que essas alterações morfológicas são complexas e multifatoriais. Brown et al. (2016) relataram ausência de alterações morfológicas no duodeno, jejuno e íleo e dano a integridade da barreira epitelial intestinal ao induzir desnutrição por dieta semelhante a DBR em período crônico. Ueno et al. (2011), ao induzirem desnutrição materno-fetal por DBR, identificaram atrofia de altura de vilo, da profundidade de cripta e da razão vilo:cripta, bem como dano na barreira morfofuncional. Sampaio et al. (2016), por sua vez, observaram redução de profundidade de cripta, sem alterações na resistência elétrica em período agudo em modelo de desnutrição por DBR, enquanto a desnutrição energético proteica em leitões causou aumento de profundidade em criptas e ausência de alterações na resistência elétrica no jejuno (JACOBI et al., 2013).

Além disto, o aumento de linfócitos na lâmina própria (BURMAN, 1965; STANFIELD, 1965), aumento da atividade de células T CD3+ e de macrófagos (WELSH, 1998) é bem reportado na desnutrição aguda grave infantil, porém os modelos animais, em geral, são inconclusivos em relação ao infiltrado de células inflamatórias na submucosa intestinal (ATTIA et al., 2017). Um estudo mostrou que o consumo de uma dieta com apenas 2% de proteína por 14 dias gerou aumento de licocalina-2 e mieloperoxidase, marcadores de inflamação intestinal, nas fezes (MAYNERIS-PERXACHS et al., 2016). Assim, a moderada deficiência de proteínas da dieta MAL-ED pode explicar a ausência de infiltrado inflamatório na submucosa intestinal nos períodos avaliados. Nossos resultados corroboram com a literatura principalmente em período agudo, ao observarmos redução de área de vilos no duodeno e jejuno, redução de área de criptas no duodeno, aumento da permeabilidade intestinal e dano a integridade da barreira funcional epitelial intestinal.

Entretanto, em período crônico observamos aumento de área intestinal total, diferente do esperado em casos de desnutrição.

O aumento de área intestinal indicado pela análise morfométrica, pelo teste LM e pelo tamanho total do intestino delgado neste estudo, ocorreram juntamente com ausência de alterações na razão L:M e o reestabelecimento do fluído intracelular nos animais desnutridos em período crônico. Essa associação é importante, uma vez que, o fluído intracelular é medido para estimar o consumo de oxigênio, requisitos calóricos, taxa metabólica basal e desempenho no trabalho (EARTHMAN et al., 2010). Estudo recente sugeriu que a função intestinal em período mais longos de consumo de dieta multideficiente é mantida, ao identificar dano a integridade da barreira, embotamento de vilos no jejuno e redução de fluído intracelular em tempo agudo e intermediário, mas reestabelecimento da integridade da barreira intestinal associado a ausência de alterações no fluído intracelular em período crônico (RIBEIRO, 2022). Além disso, uma importante revisão sugeriu que a manutenção da função de órgãos que adquirem energia e nutrientes é essencial para sobrevivência durante a desnutrição ou fome (FERRARIS; CAREY, 2000). O reestabelecimento de fluído intracelular associado ao aumento da área absorptiva e manutenção da integridade da barreira funcional gerada neste estudo pode ser decorrente da depleção de reservas lipídicas, utilizada para manutenção da função intestinal, uma vez que, a conservação da adequada absorção de nutrientes é de extrema importância para manutenção da vida.

Em relação a eletrofisiologia intestinal, estudos mostram que a desnutrição comumente causa aumento da CCC basal nos tecidos de jejunos e íleos (BUTZNER; GALL, 1988; CAREY; COOK, 1989; DARMON et al., 1993; 1996; YOUNG; LEVIN, 1990a), indicando um estado secretório (FERRARIS; CAREY, 2000). Este estado secretório no intestino desnutrido parece estar relacionado ao aumento da secreção de ânions, como Cl^- (BUTZNER; GALL, 1988). Ferraris e Carey (2000) sugeriram que o estado secretório durante a desnutrição pode ser uma resposta adaptativa a absorção de nutrientes, pois este aumenta o potencial de membrana e gera uma maior força eletromotriz para absorção de nutrientes. Apesar de, a DP basal não ser reportada nos modelos de desnutrição (JACOBI et al., 2013; SAMPAIO et al. 2016; UENO et al., 2011), esta hipótese é corroborada com o aumento da CCC quando glicose é adicionado no lado mucoso do intestino desnutrido (CAREY; COOK, 1989; DARMON et al., 1993; YOUNG; LEVIN, 1990b; SAMPAIO et al., 2016), mesmo com

a redução da proliferação e migração celular no epitélio intestinal e redução da atividade enzimática de sacarase, maltase e lactase (BUTZNER; GALL, 1988). Entretanto, a dieta MAL-ED não alterou a CCC, RT tanto basal, como durante cotransporte de glicose e peptídeos/dipeptídeo, porém reduziu a DP basal no jejuno.

O aumento da CCC basal e da CCC durante absorção de glicose não é observado em todos os modelos experimentais de desnutrição. A restrição calórica crônica (-70%) por 270 dias foi capaz de aumentar o transporte intestinal de glicose, frutose e prolina por mg de tecido, enquanto a restrição calórica por 24 dias aumentou apenas a absorção de frutose (FERRARIS; CAO; PRABHAKARAM, 2001). Além disto, a desnutrição aguda por DBR diminuiu a CCC basal no íleo de camundongos recém desmamados (SAMPAIO et al., 2016) e quando consumida por período crônico não alterou a corrente de curto-circuito basal no jejuno (UENO et al., 2011). Nossos resultados mostram uma relativa redução da CCC basal e aumento da RT basal, mesmo sem diferença significativa, que pode ter influenciado no transporte de íons lúmen-enterócito e basolateral-lúmen, reduzindo a DP basal nos animais desnutridos.

Em relação ao transporte de carboidratos e peptídeos na barreira morfofuncional, o consumo agudo da dieta MAL-ED não causou alterações significativas, apesar de mostrar uma maior afinidade a glutamina. Estudos mostram que a expressão de transportadores de carboidratos e proteínas aumentam de acordo com a quantidade de nutrientes na dieta (FERRARIS, 2001; GILBERT; WONG; WEBB KE, 2008). Por exemplo, dietas com altos níveis de carboidrato aumentam os níveis de transcritos de SGLT-1 (MIYAMOTO et al., 1993), enquanto a expressão de PEPT-1 aumentam apenas quando a dieta é deficiente em proteínas (ADIBI, 2003; GILBERT; WONG; WEBB KE, 2008). No entanto, pouco se sabe sobre a expressão dos transportadores intestinais na desnutrição. Sampaio et al. (2016) observaram ausência de alterações nos transportadores intestinais SGLT-1 e PEPT-1 no íleo, mesmo com a diminuição da CCC basal e aumento da resposta máxima da CCC a glicose no lado mucoso na desnutrição aguda por DBR. Estudo mais recente também não observou aumento de expressão do transportador SGLT-1 e PEPT-1 nos dias 7, 14 e 21 de desnutrição por DBR (RIBEIRO, 2022). No presente estudo, também não observamos alterações na expressão de PEPT-1 durante a desnutrição aguda, mesmo com o embotamento da área de vilos, condizentes com a ausência de alterações significativa no EC_{50} e pD_2 para o dipeptídeo alanil-glutamina.

A glutamina e a glicose são considerados nutrientes primários para a manutenção da homeostase corporal (POCHINI et al., 2014), sendo a glutamina o aminoácido mais abundante (NEWSHOLME et al., 2003). Este aminoácido desempenha importante função no metabolismo celular, dentre eles é considerado combustível para o intestino, onde desempenha uma função adicional na manutenção da integridade da barreira morfofuncional do epitélio intestinal (POCHINI et al., 2014; ZIEGLER et al., 2000). Estudos mostram que a glutamina sozinha (LIMA et al., 2005; LIMA et al., 2014) ou em combinação com zinco e vitamina A (LIMA et al., 2014) melhoram o escore Z peso para altura, impediram a ruptura e melhoraram da função da barreira epitelial intestinal, bem como protegeu contra as deficiências no desenvolvimento cerebral induzidas pela desnutrição (LADD et al., 2010) e melhorou o aprendizado verbal em meninas (LIMA et al., 2013).

Neste estudo, não encontramos alterações nos transportes de glutamina e glicose, apesar de, o EC_{50} para glutamina ter sido relativamente menor nos animais desnutridos. Este resultado sugere que mesmo com o embotamento de vilos existe manutenção de transportadores de glicose e peptídeos, provavelmente com o intuito de manter a captação adequada de nutrientes essenciais para sobrevivência, conforme sugerido por Ferraris (2001). Portanto, nossos resultados sugerem que a glutamina possa ser utilizada como tratamento eficaz para este modelo, uma vez que, observamos um relativo aumento de afinidade para a glutamina.

Ademais, um importante estudo mostrou que a restrição proteica materno-fetal regulou positivamente a proliferação celular em todos os segmentos intestinais e aumentou a abundância de transportadores SGLT-1, GLUT-2 e PEPT-1 apenas no duodeno dos animais quando adultos (PINHEIRO et al., 2013), sugerindo uma adaptação fisiológica para aumento de absorção de carboidrato e peptídeos em segmentos mais proximais. Assim, a análise de transportadores nos demais segmentos intestinais, principalmente no duodeno são de grande importância para melhor compreensão da patofisiologia gerada pela dieta MAL-ED no transporte de nutrientes.

A adequada absorção de nutrientes também depende de um complexo sistema que envolve adequada expressão de proteínas formadoras de junções firmes. No presente estudo, a dieta MAL-ED em período agudo não causou alterações na

expressão de claudina-1, -2, -15, ZO-1 e ocludina, mas aumentou os níveis de RNAm de FATCD/36. Estudo mostrou que a adequada absorção de carboidratos, proteínas e lipídeos dependem da expressão de claudina-2 e -15, devido a função de reestabelecer a adequada concentração de sódio no lúmen necessário para o cotransporte dos nutrientes na borda em escova (WADA et al., 2013). Apesar dos esforços, a expressão de junções firmes é complexa e pouco compreendida durante o processo de desnutrição.

A desnutrição materno fetal por DBR causou redução da resistência transepitelial associado com aumento da expressão de claudina-3 (UENO et al, 2011). No entanto, ausência de alterações na resistência transepitelial e na expressão de claudina-2 e ocludina também foram observadas no íleo desnutrido por 7 dias (SAMPAIO et al., 2016). O aumento da expressão de ocludina, por si só, também é reportada por aumentar a resistência transepitelial (BALDA et al., 1996), mas a desnutrição energético-proteica em leitões reduziu a resistência transepitelial sem alterar a expressão de ocludina (JACOBI et al., 2013). Ademais, o consumo de DBR por 14 dias causou redução da permeabilidade paracelular, com indicativo de dano a integridade de barreira, sem alterar a expressão de ocludina e claudina-2 (RIBEIRO, 2022). Outro estudo mostrou que lesões e disjunção da barreira epitelial intestinal de crianças com desnutrição aguda grave foram associados com a redução da expressão de claudina-4 e ausência de marcação de E-caderina (AMADI et al., 2017).

Neste estudo, a ausência de alterações na resistência transepitelial durante o desafio da glutamina, alanil-glutamina e glicose corrobora com a ausência de alterações na expressão de ocludina, claudina-2 e -15 e transportadores intestinais. No entanto, seria de grande importância avaliar os parâmetros eletrofisiológicos e expressão de transportadores intestinais e junções firmes nos demais segmentos intestinais durante o desafio com a dieta MAL-ED, uma vez que, a dieta MAL-ED desencadeou dano à integridade da barreira e aumentou a permeabilidade paracelular em período agudo. Além disto, avaliação de junções aderentes no período agudo seria importante, uma vez que, a principal função deste complexo é a manutenção da integridade da barreira intestinal (TURNER, 2009).

Um achado importante no nosso trabalho foi o aumento dos níveis de transcritos do transportador FATCD/36, um transportador de ácidos graxos de cadeia

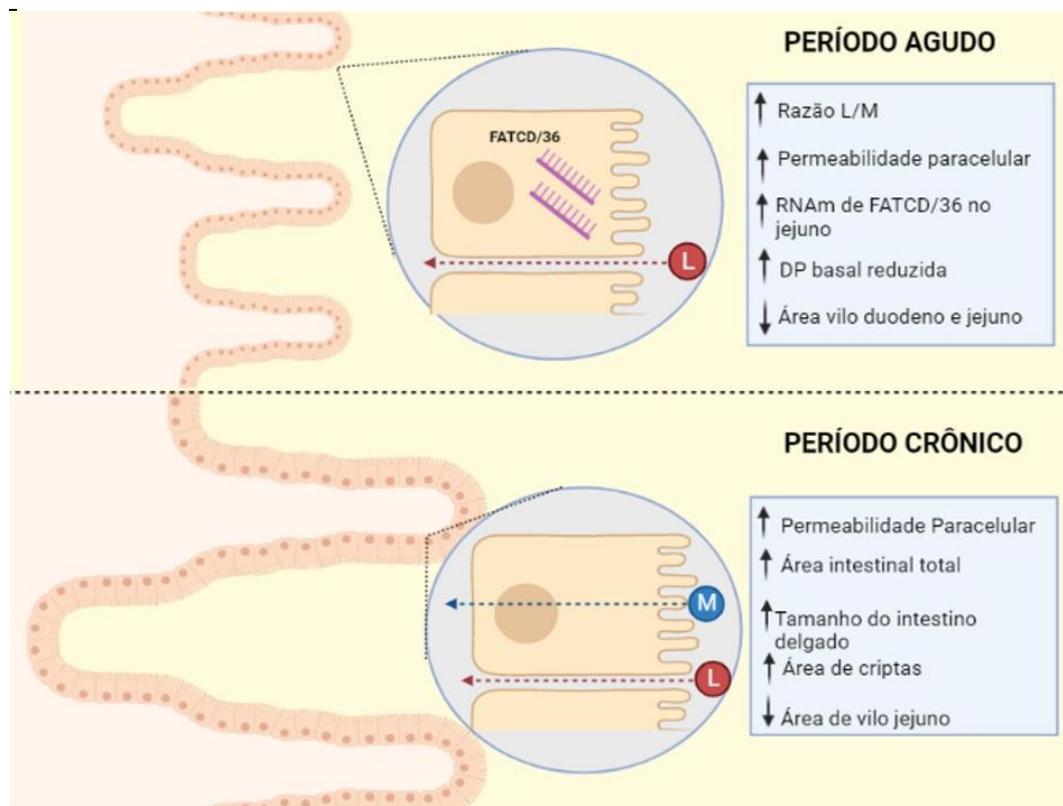
longa e colesterol (HUI; LABONTE; HOWLES, 2008). Evidências bioquímicas mostram que a desnutrição energético proteica pode provocar deficiência de ácidos graxos essenciais (SMIT; MUSKIET; BOERSMA, 2004). Essa deficiência pode ser decorrente de múltiplos fatores como digestão, absorção, transporte, biossíntese e metabolismo alterados (SMIT; MUSKIET; BOERSMA, 2004). Fatores como redução da secreção de ácido gástrico (GRACEY, M et al., 1973; MATA et al., 1972) degradação de ácidos biliares por ação bacteriana (GRACEY, 1981; SUSKIND, 1975; VITERI; SCHNEIDER, 1974), diminuição da ação de lipases (VITERI; SCHNEIDER, 1974; WATERLOW, 1992), e alterações morfológicas no intestino (SNIPES, 1968; WATERLOW, 1992; LOPEZ-PEDROSA et al., 1998) são as principais alterações que prejudicam a digestão e absorção adequada de ácidos graxos na desnutrição.

Além disso, a deficiência de ácidos graxos essenciais per se reduz o fluxo biliar, o que diminui a digestão dos lipídeos da dieta (ALESSANDRI et al., 1990; MINICH; VONK; VERKADE, 1997; SNIPES, 1968). Estudo recente também mostrou que o metabolismo de ácidos biliares é alterado em crianças com enteropatia ambiental, condição que gera desnutrição (ZHAO et al., 2021). A expressão de transportadores de ácidos graxos na desnutrição é pouco avaliada, apesar de, especular-se que o transporte de ácidos graxos pode estar alterado na desnutrição energético proteica (SMIT; MUSKIET; BOERSMA, 2004). Dessa forma, o aumento nos níveis de RNAm de FATCD/36 na desnutrição aguda pela dieta MAL-ED pode ser indicativo de uma provável tentativa de aumento de captação de lipídeos, com o intuito de aumentar a captação de energia e manutenção da homeostase. No entanto, mais estudos são necessários para compreender melhor a absorção de lipídeos na desnutrição.

As limitações deste estudo incluem a ausência de análise de biomarcadores de desnutrição como IgA anti-LPS, zonulina, e proteína de ligação a ácidos graxos intestinais (I-FABP), que foi associado com desnutrição crônica infantil (GUERRANT et al., 2016); bem como ausência da análise de microbiota para verificar se o novo modelo gera disbiose, condição associada à desnutrição (BROWN et al., 2015). As análises dos parâmetros eletrofisiológicos basais nas porções do duodeno, íleo e cólon também poderiam explicar quais segmentos contribuem para o aumento da permeabilidade paracelular indicado pelo teste LM. Além disso, avaliar os parâmetros eletrofisiológicos no co-transporte de peptídeos e carboidratos, bem como

avaliar a expressão de transportadores intestinais, principalmente de glicose e glutamina, e junções firmes nas porções do duodeno e íleo em período agudo contribuiriam para melhor compreensão do impacto da dieta MAL-ED na adequada absorção de nutrientes. Contudo, esse estudo inova com o desenvolvimento de um novo modelo experimental de desnutrição que representa a clínica de crianças desnutridas em fase de introdução alimentar de sete países em desenvolvimento, possibilitando uma melhor compreensão da patofisiologia gerada pela desnutrição nos diversos sistemas do corpo, assim como o desenvolvimento de intervenções mais adequadas para esta população. Ademais, identificamos que a desnutrição moderada causa um impacto maior na barreira morfofuncional intestinal em período agudo, mostrando um relativo aumento da afinidade do jejuno desnutrido a glutamina, indicando que a glutamina possa ser um possível tratamento eficaz em período agudo. A representação dos danos intestinais pela dieta MAL-ED estão representados na **Figura 22**.

Figura 22 – Imagem representativa dos danos agudos e crônicos gerados pelo consumo da dieta MAL-ED na barreira morfofuncional intestinal.]



Fonte: Autor.

O consumo agudo da dieta MAL-ED desencadeou diminuição de área de vilos no duodeno e jejuno, aumento da permeabilidade paracelular intestinal (seta vermelha e círculo com

L), com indicativo de dano na barreira epitelial intestinal. A dieta MAL-ED não alterou corrente de curto-circuito e resistência basal, mas reduziu a diferença de potencial basal no jejuno dos animais. Além disso, o consumo agudo da dieta MAL-ED ocasionou redução da diferença de potencial basal no jejuno dos animais desnutridos. Também foi verificado que aumento nos níveis de transcritos de FATCD/36 no jejuno desnutrido em período agudo (indicado em roxo). No período crônico, observamos permanência do aumento da permeabilidade paracelular (seta vermelha e círculo com L) e da redução de área nos vilos do jejuno, associado a uma resposta adaptativa de ausência de dano na integridade da barreira epitelial intestinal, aumento de área absorptiva total (seta azul e círculo com M), aumento do tamanho do intestino delgado e aumento de área de criptas em todos os segmentos intestinais.

7 CONCLUSÃO

Desenvolvemos uma nova dieta de desnutrição, com moderada deficiência em energia, proteína, lipídeos e zinco e aumento moderado de carboidratos e fibras, capaz de gerar desnutrição em modelos animais. A nova dieta MAL-ED reduziu o peso e ganho de peso, comprometeu o crescimento e as reservas energéticas em período mais crônico, sem causar edema e com níveis séricos de albumina normais. Assim, propomos um novo modelo murino de desnutrição de relevância clínica para a fase de introdução alimentar, com base em dados da alimentação complementar de crianças desnutridas de sete diferentes países. A dieta MAL-ED também causou aumento da permeabilidade paracelular, dano a integridade da barreira epitelial intestinal, redução de área absorptiva no duodeno e jejuno, associado a redução da diferença de potencial basal e aumento dos níveis de RNAm de FATCD/36 em período agudo, bem como aumento de área intestinal total e permeabilidade paracelular em período crônico.

REFERÊNCIAS

- ACF INTERNATIONAL. Taking Action Nutrition for Survival, Growth & Development. **White Paper**, p. 1–52, 2010.
- ADACHI, M. et al. Normal establishment of epithelial tight junctions in mice and cultured cells lacking expression of ZO-3, a tight-junction MAGUK protein. **Mol. Cell. Biol**, v. 26, p. 9003–9015, 2006.
- ADIBI, S. A. Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption. **J Clin Invest**, v. 50, p. 2266–75, 1971.
- AHMED, T. et al.. Malnutrition: Report of the FISPUGHAN Working Group. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr**, v. 55, n. 5, p. 626–631, 2012.
- AHSAN, A. K. et al. Zinc Micronutrient Deficiency and Its Prevalence in Malnourished Pediatric Children as Compared to Well-Nourished Children: A Nutritional Emergency. **Glob Pediatr Health**, v. 8, p. 2333794X211050316, 2021.
- ALAM, M. A. et al. Erratum: Impact of early-onset persistent stunting on cognitive development at 5 years of age: Results from a multi-country cohort study. **PLoS ONE**, v. 15, n. 2, p. 1–16, 2020.
- ALESSANDRI, J. M. et al. Diet-induced alterations of lipids during cell differentiation in the small intestine of growing rats: effect of an essential fatty acid deficiency. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr**, v. 10, p. 504–515, 1990.
- AL-SADI, R. et al. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 300, n. 6, p. G1054–G1064, 2011.
- ALVES, A. P ; DÂMASO, A. R. ; PAI, V. D. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 3, p. 264–271, 2008.
- AMADI, B. et al. Impaired Barrier Function and Autoantibody Generation in Malnutrition Enteropathy in Zambia. **EBioMedicine**, v. 22, p. 191–199, 2017.
- AMASHEH, M et al. Barrier effects of nutritional factors. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1165, p. 267-273, 2009.
- ANDERSON, J, M.C.; ITALLIE, M. V. I. Physiology and Function of the Tight Junction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 2, p. a002584, 2009.
- ANGELOW, S; AHLSTROM, R.; YU, A. S. L. Biology of claudins. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 295, p. F867–876, 2008.
- ATTIA, S. et al. Mortality in children with complicated severe acute malnutrition is related to intestinal and systemic inflammation: An observational cohort study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 104, n. 5, p. 1441–1449, 2016.

ATTIA, S. et al. Starved Guts: Morphologic and Functional Intestinal Changes in Malnutrition. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 65, n. 5, p. 491-495, 2017.

BADR, G. et al. T lymphocytes from malnourished infants are short-lived and dysfunctional cells. **Immunobiology**, v. 216, n. 3, p. 309–315, 2011.

BARKER, D. J. P. et al. Trajectories of Growth among Children Who Have Coronary Events as Adults. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 17, p. 1802–1809, 2005.

BARONE, S. et al. The Slc2a5 (Glut5) is essential for the absorption of fructose in the intestine and generation of fructose-induced hypertension. **J Biol Chem**, v. 284, p. 5056–5066, 2009.

BARRETO, M. L. et al. Effect of vitamin A supplementation on diarrhoea and acute lower-respiratory-tract infections in young children in Brazil. **Lancet**, v. 344, n.8917, p. 228-31, 1994.

BARTELT, Luther A et al. Cryptosporidium Priming Is More Effective than Vaccine for Protection against Cryptosporidiosis in a Murine Protein Malnutrition Model. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 7, p. 1–29, 2016.

BARTELT, L. A. et al. Cross-modulation of pathogen-specific pathways enhances malnutrition during enteric co-infection with *Giardia lamblia* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 7, p. 1–28, 2017.

BARTELT, L. A.; BOLICK, D. T.; GUERRANT, R. L. Disentangling Microbial Mediators of Malnutrition: Modeling Environmental Enteric Dysfunction. **Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 3, p. 692-707, 2019.

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

BATOOL, R. et al. Protein–Energy Malnutrition: A Risk Factor for Various Ailments. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 55, n. 2, p. 242-53, 2015.

BECKER, P.J. et al. Consensus statement of the Academy of Nutrition and Dietetics/American Society for Parenteral and Enteral Nutrition: indicators recommended for the identification and documentation of pediatric malnutrition (undernutrition). **J Acad Nutr Diet**, n. 114, p. 1988-2000, 2014.

BÉHAR, M. et al. Desnutrición severa de la infancia. III. Aspectos patológicos. *Rev Col Med Guatemala* 1956;7:235.

BELMONTE, L. et al. Effects of glutamine supplementation on gut barrier, glutathione content and acute phase response in malnourished rats during inflammatory shock. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 20, p. 2833–2840, 2007.

BENABE, J.E.; MARTINEZ-MALDONADO, M. The impact of malnutrition on kidney function. **Miner Electrolyte Metab**, v. 24, p. 20-26, 1998.

BERGE, K. E. et al. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. **Science**, v. 290, p. 1771–1775, 2000.

BERKMAN, D. S. et al. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: A follow-up study. **Lancet**, v. 359, n. 9306, p. 564–571, 2002.

BHARGAVA, S. K. et al. Europe PMC Funders Group Relation of Serial Changes in Childhood Body-Mass Index to Impaired Glucose Tolerance in Young Adulthood. **N Engl J Med**, v. 350, n. 9, p. 865–875, 2012.

BHUTTA, Z. A. et al. The Lancet Nutrition Interventions Review Group, et al. Evidence-based interventions for improvement of maternal and child nutrition: what can be done and at what cost? **Lancet**, v. 382, n. 9890, p. 452–77, 2013.

BLACK, R. E. et al. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. **Lancet**, v. 371, n. 9608, p. 243–260, 2008.

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

BLANTON, L. V. et al. Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children. **Science**, v. 351, n. 6275, 2016.

BOLICK, D. T. et al. Zinc deficiency alters host response and pathogen virulence in a mouse model of enteroaggregative *escherichia coli*-induced diarrhea. **Gut Microbes**, v. 5, n. 5, p. 618–627, 2014.

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

BOUMA, S. Diagnosing Pediatric Malnutrition. **Nutr Clin Pract**, v. 32, n.1, p. 52-67, 2017.

BRIEND, A.; KHARA, T.; DOLAN, C. Wasting and stunting-similarities and differences: Policy and programmatic implications. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 36, n. 1, p. S15–S23, 2015.

BROOKS, W. A. et al. Zinc for severe pneumonia in very young children: Double-blind placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 363, n. 9422, p. 1683–1688, 2004.

BROWN, J.L; POLLITT, E. Malnutrition, poverty and intellectual development. **Scientif American**, p. 38-43, 1996.

BROWN, K.; DEWEY, K; ALLAN L. Complementary feeding of young children in developing countries: a review of current scientific knowledge. **Geneva (Switzerland): WHO**, 1998.

BROWN, E. M. et al. Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model. **Nature Communications**, v. 6, p. 7806, 2015.

BRUNSER, O. M. D.; CASTILHO, C. M. D.; ARAYA, M. M. D. Fine structure of the small intestinal mucosa in infantile marasmic malnutrition. **Gastroenterology**, v. 70, p. 495-507, 1976.

BURMAN, D. The jejunal mucosa in kwashiorkor. **Arch Dis Child**, v. 40, n. 213, p. 526-3, 1965.

BUTSCH, W. S.; HEIMBURGER, D. C. Malnutrition and Disease Outcomes. Org. In: **Gastroenterology, Nutrition and Gastrointestinal Disease**. Totowa: Humana Press Inc., p 31-57, 2008.

BUTZNER, J; GALL, D. Impact of protein calorie malnutrition on the developing intestine. **Biol. Neonate**, v. 54, p. 151-5, 1988.

CAHILL, G. F. Fuel Metabolism in Starvation. **Annual Review of Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 1-22, 2006.

CAMPBELL, R. K. et al. Infant and young child feeding practices and nutritional status in Bhutan. **Matern Child Nutr**, v. 14, n. 4, p. e12762, 2018.

CAREY, H. V.; COOKE, H. J. Tonic activity of submucosal neurons influences basal ion transport. **Life Sci**, v. 44, p. 1083-88, 1989.

CHALVON-DEMERSAY, T. et al. Modifying the Dietary Carbohydrate-to-Protein Ratio Alters the Postprandial Macronutrient Oxidation Pattern in Liver of AMPK-Deficient Mice. **The Journal of Nutrition**, v. 147, p. 1669-1676, 2017.

CHEN, P. et al. Association of vitamin A and zinc status with altered intestinal permeability: Analyses of cohort data from northeastern Brazil. **Journal of Health, Population and Nutrition**, v. 21, n. 4, p. 309-315, 2003.

CLARKE, L.L. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v. 296, n. 6, p. G1151-66, June 2009.

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

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

CORWARE, K. et al. Protein energy malnutrition increases arginase activity in monocytes and macrophages. **Nutr. Metab. (Lond.)**, v. 11, p. 51, 2014.

CUI, X. L.; JIANG, L.; FERRARIS, R. P. Regulation of rat intestinal GLUT2 mRNA abundance by luminal and systemic factors. **Biochim Biophys Acta**, v. 1612, p. 178-185, 2003.

CZERKINSKY, Cecil; HOLMGREN, Jan. Vaccines against enteric infections for the developing world. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1671, 2015.

DANAIEI, G. et al. Risk factors for childhood stunting in 137 developing countries: a comparative risk assessment analysis at global, regional, and country levels. **PLoS Med**, v. 13, n. 11, p. e1002164, 2016.

DANIELS, M. C.; ADAIR, L. S. Growth in Young Filipino Children Predicts Schooling Trajectories through High School. *The Journal of Nutrition*, v. 134, n. 6, p. 1439–1446, 2004.

DARMON, N. et al. Oxidative stress may contribute to the intestinal dysfunction of weanling rats fed a low protein diet. **J. Nutr**, v. 123, p. 1068–75, 1993.

DARMON, N. et al. Anaphylactic intestinal response to milk proteins during malnutrition in guinea pigs. **Am. J. Physiol**, v. 270, p. G442–48, 1996.

DAVID, E. S.; CINGARI, D.S.; FERRARIS, R. P. Dietary induction of intestinal fructose absorption in weaning rats. **Pediatr Res**, v. 37, p. 777–82, 1995.

DE AQUINO, C. C. et al. Effect of Hypoproteic and High-Fat Diets on Hippocampal Blood-Brain Barrier Permeability and Oxidative Stress. **Front Nutr.**, v. 9, n. 5, p. 131, 2019.

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

DEBOER, M. D. et al. Systemic inflammation, growth factors, and linear growth in the setting of infection and malnutrition. **Nutrition**, v. 33, p. 248–253, 2017.

DE FILIPPO, C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 33, p. 14691-6, 2010.

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

DE MEDINA, Fermín Sánchez et al. Intestinal inflammation and mucosal barrier function. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 20, n. 12, p. 2394–2404, 2014.

DEWEY, K. G.; HUFFMAN, S. L. Maternal, infant, and young child nutrition: combining efforts to maximize impacts on child growth and micronutrient status. **Food Nutr Bull**, v. 30, n. 2 Suppl, p. S187–9, 2009.

DIPASQUALE, Valeria; CUCINOTTA, Ugo; ROMANO, Claudio. Acute Malnutrition in Children: Pathophysiology, Clinical Effects and Treatment. **Nutrients**, v. 12, n. 8, p. 1-9, 2020.

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

ERSINO, G.; HENRY, C.J.; ZELLO, G. A. Suboptimal feeding practices and high levels of undernutrition among infants and young children in the rural communities of Halaba and Zeway, Ethiopia. **Food Nutr Bull**, v. 37, p. 409–24, 2016.

EYZAGUIRRE-VELASQUEZ, J. et al. Protein Malnutrition During Juvenile Age Increases Ileal and Colonic Permeability in Rats. **Short Communication: Gastroenterology**, v. 64, n. 5, p. 707–712, 2017.

FAHMIDA, U. et al. Linear Growth of Stunted Infants With Low Haemoglobin. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, n. 2, p. 301–309, 2007.

FALL, C. H. D. et al. Adult metabolic syndrome and impaired glucose tolerance are associated with different patterns of BMI gain during infancy data from the New Delhi birth cohort. **Diabetes Care**, v. 31, n. 12, p. 2349–2356, 2008.

FANNING, A.S. et al. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. **J Biol Chem**, v. 273, n. 45, p. 29745–53, 1998.

FAO. State of Food and Agriculture 2013: Food systems for better nutrition. Rome, Italy, 2013.

FERNÁNDEZ-RIEJOS, P. et al. Role of leptin in the activation of immune cells. **Mediators Inflamm**, v. 2010, p. 1–8, 2010.

FERRARIS, R. P. et al. Site density of mouse intestinal glucose transporters declines with age. **Am J Physiol**, v. 264, p. G285–293, 1993.

FERRARIS, R. P. Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. **The Biochemical journal**, v. 360, n. 2, p. 265–276, 2001.

FERRARIS, R.P.; CAREY, H. V. Intestinal transport during fasting and malnutrition. **Annu Rev Nutr**, v. 20, p. 195–219, 2000.

FERREIRA, H. S. et al. Short stature of mothers from an area endemic for undernutrition is associated with obesity, hypertension and stunted children: A population-based study in the semi-arid region of Alagoas, Northeast Brazil. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 8, p. 1239–1245, 2009.

FINCAN, G. S. Ö. et al. Investigation of myorelaxant activity of 9-aryl3,4,6,7-tetrahydroacridine-1,8-(2H,5H,9H,10H)-diones in isolated rabbit gastric fundus. **Med Chem Res**, v. 21, p. 1817–1824, 2012.

FLORÊNCIO, T.T. et al. Short stature, abdominal obesity, insulin resistance and alterations in lipid profile in very low-income women living in Maceió, north-eastern Brazil. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**, v. 14, n. 2, p. 346–348, 2007.

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

FOLLIS, R. H. Jr. A kwashiorkor-like syndrome observed in monkeys fed maize. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 96, n. 2, p. 523-528, 1957.

FRENHANI, P. B.; BURINI, R. C. Mecanismos de ação e controle da digestão de proteínas e peptídios em humanos. **Arq Gastroenterol.**, v. 36, n. 3, p.139-147, jul./set. 1999.

FURUSE, M. et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: A lesson from claudin-1-deficient mice. **Journal of Cell Biology**, v. 156, n. 6, p. 1099–1111, 2002.

GALLER, J. R. et al. Infant Malnutrition Is Associated with Persisting Attention Deficits in Middle Adulthood. **Journal of Nutrition**, v. 142, n. 4, p. 788–794, 2012.

GALLER, J. R. et al. Malnutrition in the first year of life and personality at age 40. **Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines**, v. 54, n. 8, p. 911–919, 2013.

GARENNE, M. et al. Incidence and duration of severe wasting in two African populations. **Public health nutrition**, v. 12, n. 11, p. 1974–1982, 2009.

GAUR, A. Et al. Os Editores da Enciclopédia. "marasmo". Enciclopédia Britannica, 27 de agosto de 2009, <https://www.britannica.com/science/marasmus>. Acesso em: 18 de junho de 2022.

GEORGIEFF, M. K. Nutrition and the developing brain: Nutrient priorities and measurement. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 2, p. 614–620, 2007.

GERUDE, M.F. et al. **Terapia Nutricional**. São Paulo: Atheneu, 2002.

GIALLOUROU, N. et al. A novel mouse model of *Campylobacter jejuni* enteropathy and diarrhea. **PLoS Pathog**, v. 14, n. 3, p. 1–23, 2018.

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

GLINOER, D.; DELANGE, F. The potential repercussions of maternal, fetal, and neonatal hypothyroxinemia on the progeny. **Thyroid**, v. 10, n. 10, p. 871-887, 2000.

GLOBAL NUTRITION REPORTS. **The state of global nutrition**. Bristol, UK: Development Initiatives, p. 31, 2021.

GONZALEZ-MARISCAL et al. Tight junction proteins. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 81, p. 1–44, 2003.

GONZÁLEZ-TORRES, C. et al. Effect of malnutrition on the expression of cytokines involved in Th1 cell differentiation. **Nutrients**, v. 5, n. 2, p. 579–593, 2013.

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

GRACEY, M et al. Microbial contamination of the gut: another feature of malnutrition. **Am J Clin Nutr**, v. 26, n. 11, p. 1170-4, 1973.

GRACEY, M. S. Nutrition bacteria and the gut. **Br. Med. Bull.**, v. 37, p. 71–75, 1981.

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

GLOBAL NUTRITION REPORTS. Brazil: The burden of malnutrition at a glance. Disponível em: <https://globalnutritionreport.org/resources/nutrition-profiles/latin-america-and-caribbean/south-america/brazil/>. Acesso em: 12 janeiro 2022.

GROVER, Z.; EE, L. C. Protein Energy Malnutrition. **Pediatric Clinics of North America**, v. 56, n. 5, p. 1055–1068, 2009.

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

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

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

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

HALLAM, M. C.; REIMER, R. A. Postnatal prebiotic fiber intake in offspring exposed to gestational protein restriction has sex-specific effects on insulin resistance and intestinal permeability in rats. **Journal of Nutrition**, v. 144, n. 10, p. 1556–1563, 2014.

HAMOSH, M. Lipid metabolism in pediatric nutrition. **Pediatr Clin North Am**, v. 42, p. 839–59, 1995.

HANHOFF, T.; LUCKE, C.; SPENER, F. Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins. **Mol Cell Biochem**, v. 239, p. 45–54, 2002.

HEADEY, D. et al. Impacts of COVID-19 on childhood malnutrition and nutrition-related mortality. **The Lancet**, v. 396, n. 10250, p. 519–521, 2020.

HARPER, K. M. et al. Environmental enteric dysfunction pathways and child stunting: A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1–23, 2018.

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

HUGHES, S. M. et al. Dendritic Cell Anergy Results from Endotoxemia in Severe Malnutrition. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 4, p. 2818–2826, 2009.

HUI, D.Y.; LABONTE, E. D.; HOWLES, P. N. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. III. Intestinal transporters and cholesterol absorption. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 294, p. G839–843, 2008.

HURNEY; MAJELLA. Short Changed: The Human and Economic Cost of Child Undernutrition in Papua New Guinea. **Frontier economics**, June, 2017.

HOLICK, M. F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. **J Clin Invest**, v. 116, n.8, p. 2062-2072, 2006.

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

HUGHES, S. M. et al. Dendritic Cell Anergy Results from Endotoxemia in Severe Malnutrition. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 4, p. 2818–2826, 2009.

IBGE. POF 2008-2009: desnutrição cai e peso das crianças brasileiras ultrapassa padrão internacional. IBGE, 2010. Disponível em: [https://censo2010.ibge.gov.br/noticias-censo.html?busca=pof-20082009-desnutricao-cai-peso-criancas-brasileiras-ultrapassa-padrao-internacional&idnoticia=1699&view=noticia#:~:text=busca-POF%202008%2D2009%3A%20desnutri%C3%A7%C3%A3o%20cai%20e%20peso%20das%20crian%C3%A7as%20brasileiras,Mundial%20de%20Sa%C3%BAde%20\(OMS\)](https://censo2010.ibge.gov.br/noticias-censo.html?busca=pof-20082009-desnutricao-cai-peso-criancas-brasileiras-ultrapassa-padrao-internacional&idnoticia=1699&view=noticia#:~:text=busca-POF%202008%2D2009%3A%20desnutri%C3%A7%C3%A3o%20cai%20e%20peso%20das%20crian%C3%A7as%20brasileiras,Mundial%20de%20Sa%C3%BAde%20(OMS).). Acesso em: 24 de maio de 2022.

IBRAHIM, M. K. et al. Impact of Childhood Malnutrition on Host Defense and Infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 30, p. 919–971, 2017.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/nutricaoobromatologia/files/2013/07/NormasADOLFOLUTZ.pdf>. Acesso em: 24 de maio de 2022.

IRENA, A. H.; MWAMBAZI, M.; MULENGA, V. Diarrhea is a Major killer of Children with Severe Acute Malnutrition Admitted to Inpatient Set-up in Lusaka , Zambia. **Nutrition Journal**, v. 10, n. 1, p. 110, 2011.

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

ISLAM, M.A.; RAHMAN, M.M.; MAHALANABIS, D. Maternal and socioeconomic factors and the risk of severe malnutrition in a child: A case-control study. **Eur. J. Clin. Nutr**, v. 48, p. 416–424, 1994.

JAHNG, J. W. et al. Chronic food restriction in young rats results in depression- and anxiety-like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter. **Brain Res**, v. 1150, p. 100–107, 2007.

KELLER U. Nutritional Laboratory Markers in Malnutrition. **J Clin Med**. V. 8, n. 6, p. 775, 2019.

KELLETT, G. L. et al. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. **Annu Rev Nutr**, v. 28, p. 35–54, 2008.

KLEMM, R. D. et al. Newborn vitamin A supplementation reduced infant mortality in rural Bangladesh. **Pediatrics**, v.122, n. 1, p.42-50, 2008.

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

KOSEK M. et al. Assessment of environmental enteropathy in the MAL-ED cohort study: theoretical and analytic framework. **Clin Infect Dis**, v. 1, n. 59, p. S239-47, 2014.

KOTLOFF, K. L. The burden and etiology of diarrheal illness in developing countries. **Pediatr Clin North Am**, v. 64, n. 4, p. 799–814, 2017.

LADD, F. V. et al. Zinc and glutamine improve brain development in suckling mice subjected to early postnatal malnutrition. **Nutrition**, v. 26, n. 6, p. 662-70, 2010.

LEE, G. O. et al. Infant Nutritional Status, Feeding Practices, Enteropathogen Exposure, Socioeconomic Status, and Illness Are Associated with Gut Barrier Function As Assessed by the Lactulose Mannitol Test in the MAL-ED Birth Cohort. **Am J Trop Med Hyg**, v. 97, n. 1, p. 281-290, 2017.

LELIJVELD N. et al. Chronic disease outcomes after severe acute malnutrition in Malawian children (ChroSAM): a cohort study. **Lancet Glob Health**, v. 4, p. e654–e662, 2016.

LENZEN, S.; LORTZ, S.; TIEDGE, M. Effect of metformin on SGLT1, GLUT2, and GLUT5 hexose transporter gene expression in small intestine from rats. **Biochem Pharmacol**, v. 51, p. 893–896, 1996.

LIMA, A. A. et al. Intestinal barrier function and weight gain in malnourished children taking glutamine supplemented enteral formula. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 40, n. 1, p. 28-35, 2005.

LIMA, A. A. et al.. Zinc, vitamin A, and glutamine supplementation in Brazilian shantytown children at risk for diarrhea results in sex-specific improvements in verbal learning. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 68, n. 3, p. 351-8, 2013.

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

LIMA, A. A. M et al. Determinant Variables, Enteric Pathogen Burden, Gut Function, and Immune-Related Inflammatory Biomarkers Associated with Childhood Malnutrition: A Prospective Case-Control Study in Northeastern Brazil. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 36, n. 12, p. 1177–1185, 2017.

LIMA, A. A. M. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* Subclinical Infection and Coinfections and Impaired Child Growth in the MAL-ED Cohort Study. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 66, n. 2, p. 325-333, 2018.

LINDENBAUM, J; KENT, T. H.; SPRINZ, H. Malabsorption and jejunitis in American Peace Corps volunteers in Pakistan. **Ann. Intern. Med**, v. 65, p. 1201–1209, 1966.

LINDENBAUM, J.; GERSON, K. T. H.; SPRINZ H. Recovery of small-intestinal structure and function after residence in the tropics. I. Studies in Peace Corps volunteers. **Ann Intern Med**, v. 74, n. 2, p. 218-222, 1971.

LIU, E. et al. Effect of zinc supplementation on growth outcomes in children under 5 years of age. **Nutrients**, v. 10, n. 3, p. 377, 2018.

LOPEZ-PEDROSA, J. M. et al. Gil, Severe malnutrition alters lipid composition and fatty acid profile of small intestine in newborn piglets. **J. Nutr**, v. 128, p. 224–233, 1998.

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

MACIEL, B. L. L. et al. Higher Energy and Zinc Intakes from Complementary Feeding Are Associated with Decreased Risk of Undernutrition in Children from South America, Africa, and Asia. **J Nutr**, v. 151, n. 1, p. 170-178, 2021.

MADARA, J. L.; PAPPENHEIMER, J. R. Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia. **J. Membr. Biol**, v. 100, p. 149–164, 1987.

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

MAL-ED, Network Investigators. Early childhood cognitive development is affected by interactions among illness, diet, enteropathogens and the home environment: findings from the MAL-ED birth cohort study. **BMJ Glob Health**, v. 3, n. 4, p. e000752, 2018.

MATA, L. J. et al Gastrointestinal flora of children with protein–calorie malnutrition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 25, p. 118–126, 1972.

MAY, T. et al. Choline Supplementation Prevents a Hallmark Disturbance of Kwashiorkor in Weanling Mice Fed a Maize Vegetable Diet: Hepatic Steatosis of Undernutrition. **Nutrients**, v. 10, n. 653, p. 1-15, 2018.

MAYNERIS-PERXACHS, J. et al. Protein- and zinc-deficient diets modulate the murine microbiome and. **Am J Clin Nutr**, v. 104, p. 1253–1262, 2016.

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

MCCORMICK, B. J. J. et al. Early Life Child Micronutrient Status, Maternal Reasoning, and a Nurturing Household Environment have Persistent Influences on Child Cognitive

Development at Age 5 years: Results from MAL-ED. **J Nutr**, v. 149, n. 8, p. 1460-1469, 2019a.

MCCORMICK, B. J. J. et al. Intestinal permeability and inflammation mediate the association between nutrient density of complementary foods and biochemical measures of micronutrient status in young children: results from the MAL-ED study. **Am J Clin Nutr**, v. 110, n. 4, p. 1015-1025, 2019b.

MEHUS, A.A.; PICKLO, M.J. Brain and Hepatic Mt mRNA Is Reduced in Response to Mild Energy Restriction and n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency in Juvenile Rats. **Nutrients**, v. 9, p. 1145, 2017.

MOORE, S. R. et al. Early childhood diarrhoea and helminthiases associate with long-term linear growth faltering. *Int J Epidemiol*, v. 30, n. 6, p. 1457–1464, 2001.

MOORE, S. E. et al. Birth weight predicts response to vaccination in adults born in an urban slum in Lahore, Pakistan. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 2, p. 453–459, 2004.

MOORE, S. R. et al. Prolonged episodes of acute diarrhea reduce growth and increase risk of persistent diarrhea in children. **Gastroenterology**, v. 139, n. 4, p. 1156–1164, 2010.

MINICH, D. M.; VONK, R. J.; VERKADE, H. J. Intestinal absorption of essential fatty acids under physiological and essential fatty acid deficient conditions. **J. Lipid Res**, v. 38, p. 1709–1721, 1997.

MIYAMOTO, K. et al. Differential responses of intestinal glucose transporter mRNA transcripts to levels of dietary sugars. **Biochem. J.**, v. 295, p. 211–215, 1993.

NASSIR, F. et al. CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. **J Biol Chem**, v. 282, p. 19493–19501, 2007.

NEUBIG, R. R. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 597–606, 2003.

NEWSHOLME, P. et al. Glutamine and glutamate—their central role in cell metabolism and function. **Cell Biochem. Funct**, v. 21, p. 1–9, 2013.

NGO, J.; ORTIZ-ANDRELLUCCHI, A.; SERRA-MAJEM, L. Malnutrition: Concept, Classification and Magnitude. *Encyclopedia of Food and Health* / Benjamin Caballero, Paul M. Finglas, Fidel Toldrá (eds), p. 610-630, 2016.

NÚÑEZ, I. N. et al. Effect of a probiotic fermented milk on the thymus in Balb/c mice under non-severe protein – energy malnutrition. **British Journal of Nutrition**, v.110, p. 500–508, 2013.

NUSRAT A. et al. Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 23, p. 10629-10633, 1995.

OGIHARA H. et al. Immuno-localization of H_p/peptide cotransporter in rat digestive tract. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 220, p. 848–52, 1996.

OLOFIN, I. et al. Associations of suboptimal growth with all-cause and cause-specific mortality in children under five years: a pooled analysis of ten prospective studies. *PloS One*, v. 8, p. e64636, 2013.

OWAIS, A. et al. Minimum acceptable diet at 9 months but not exclusive breastfeeding at 3 months or timely complementary feeding initiation is predictive of infant growth in rural Bangladesh. *PLoS One*, v. 11, n. 10, p. e0165128, 2016.

PAN, F. et al. Predominant gut *Lactobacillus murinus* strain mediates anti-inflammatory effects in calorie-restricted mice. *Microbiome*, v. 6, n. 54, p. 1–17, 2018.

PARK, Y. C. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Effects of mild calorie restriction on lipid metabolism and inflammation in liver and adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 30, p. 1-7, 2017.

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

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, v. 14, n. 3, p. 141–153, 2014.

PINHEIRO, D. F. et al. Maternal protein restriction affects gene expression and enzyme activity of intestinal disaccharidases in adult rat offspring. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 46, n. 3, p. 281–289, 2013.

PIRES, G. L. A. et al. Estudo morfométrico e estereológico digital da mucosa do intestino delgado de crianças eutróficas e desnutridas com diarreia persistente. *Jornal de Pediatria*, v. 79, p. 329-336, 2003.

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

PLATTS-MILLS, J. A. et al. Association between enteropathogens and malnutrition in children aged 6 – 23 mo in Bangladesh : a case-control study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 105, n. 5, p. 1132–1138, 2017.

PLOTNIKOV, A. et al. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, v. 1813, n. 9, p. 1619–1633, 2010.

POCHINI, L et al. Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function relationships and relevance to human health. *Front Chem*, v. 2, n. 61, p. 1-23, 2014.

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

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

QS MEDEIROS, P. H. et al. A murine model of diarrhea, growth impairment and metabolic disturbances with *Shigella flexneri* infection and the role of zinc deficiency. **Gut Microbes**, v. 10, n. 5, p. 615–630, 2019.

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

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

RAY, J. G. et al. Vitamin B12 and the risk of neural tube defects in a folic-acid-fortified population. *Epidemiology*, v. 18, n.3, p. 362-366, 2007.

RAYMOND, J et al. Analysis of nutritional adequacy of local foods for meeting dietary requirements of children aged 6–23 months in rural central Tanzania. **Arch Public Health**, v. 75, p. 60, 2017.

REED, K. K.; WICKHAM, R. Review of the Gastrointestinal Tract: From Macro to Micro. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 25, n. 1, p. 3–14, 2009.

RIBEIRO, S. A. Consumption of a multi-deficient diet causes dynamic changes in the intestinal morphofunctional barrier, body composition and impaired physical development in post-weaning mice. **Br J Nutr**, v. 29, p.1-30, 2022.

ROGAWSKI, E. T. Epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* infections and associated outcomes in the MAL-ED birth cohort. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 7, p. e0005798, 2017.

SACHDEV, H.; GERA, T.; NESTEL, P. Effect of iron supplementation on mental and motor development in children: systematic review of randomised controlled trials. **Public Health Nutr**, v.8, n. 2, p. 117-132, 2005.

SALAMEH, E. et al. Animal Models of Undernutrition and Enteropathy as Tools for Assessment of Nutritional Intervention. **Nutrients**, v.11, n. 9, p. 2233, 2019.

SAMPAIO, I. C. et al. Impact of acute undernutrition on growth, ileal morphology and nutrient transport in a murine model. **Braz J Med Biol Res**, v. 49, n. 10, p. 1–10, 2016.

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

SAITOU, M. et al. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. **J Cell Biol**, v. 141, p. 397–408, 1998.

SAITOU, M. et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. **Mol Biol Cell**, v. 11, p. 4131–4142, 2000.

SAWAYA, A. L. et al. Association between chronic undernutrition and hypertension. **Matern Child Nutr**, v. 1, n. 3, p. 155–163, 2005.

SAZAWAL, S. et al. Effect of zinc supplementation on mortality in children aged 1–48 months: a community-based randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 369, n. 9565, p. 927-934, 2007.

SCHNEEBERGER, E.E.; LYNCH, R. D. The tight junction: A multifunctional complex. **Am J Physiol-Cell Physiol**, v.286, p.1213–1228, 2004.

SCHULTZ S. G., CURRAN, P. F. Coupled transport of sodium and organic solutes. **Physiol Rev** v. 50, p. 637–718, 1970.

SCHWARZER, M. et al. *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. **Science**, v. 351, n. 6275, p. 854-7, 2016.

SESSO, R. et al. Malnutrition is associated with increased blood pressure in childhood. **Nephron - Clinical Practice**, v. 97, n. 2, p. 61–67, 2004.

SKAU, J. K. H. et al. Stunting, wasting and breast-feeding as correlates of body composition in Cambodian children at 6 and 15 months of age. **Br J Nutr.**, v. 121, p. 688–698, 2019.

SMIT, E. N.; MUSKIET F. A.; BOERSMA, E. R. The possible role of essential fatty acids in the pathophysiology of malnutrition: a review. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 71, n. 4, p. 241-50, 2004.

SNIPES, R. L. The effects of essential fatty acid deficiency on the ultrastructure and functional capacity of the jejunal epithelium. **Lab. Invest**, v. 18, p. 179–189, 1968.

SOARES, A. M. **Secreção paracelular de sódio durante a absorção de substratos sódio dependente em mucosa ileal de coelho montada em câmara de Ussing**. 1996. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996.

SOETERS, P. et al. Defining malnutrition: A plea to rethink. **Clin Nutr**, v. 36, p. 896–901, 2017.

SONG, J. C. et al. Regulation of epithelial transport and barrier function by distinct protein kinase C isoforms. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 281, n. 2, p. C649-661, 2001.

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

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

STEVENSON, B. R. et al. Phosphorylation of the tight-junction protein ZO-1 in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. **Biochemical Journal**, v. 263, n. 2, p. 597–599, 1989.

SUBRAMANIAN, S. et al. Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. **Nature**, v. 510, p. 417–421, 2014.

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

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

SUSKIND, R. M. Gastrointestinal changes in the malnourished child, **Pediatr. Clin. North Am**, v. 22, p. 873–883, 1975.

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

SUZUKI, H. et al. Model for the architecture of claudin-based paracellular ion channels through tight junctions. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 2, p. 291–297, 2015.

TALBERT, A. et al. Diarrhoea Complicating Severe Acute Malnutrition in Kenyan Children: A Prospective Descriptive Study of Risk Factors and Outcome. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1–8, 2012.

TAMURA, T.; PICCIANO, M. F. Folate and human reproduction. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 5, p. 993-1016, 2006.

TERADA T. et al. Expression profiles of various transporters for oligopeptides, amino acids and organic ions along the human digestive tract. **Biochem Pharmacol**, v. 70, p. 1756–63, 2005.

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

THACHER, T. D. et al. Nutritional rickets around the world: Causes and future directions. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 26, n. 1, p. 1–16, 2006.

THAXTON, G. E et al. New Insights into the Pathogenesis and Treatment of Malnutrition. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 47, n. 4, p. 813-827, 2018.

TIELSCH, J. M. et al. Effect of daily zinc supplementation on child mortality in southern Nepal. **Lancet**, v. 370, n. 9594, p. 1230–1239, 2007.

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

TURNER J. R. et al. Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. **Am J Physiol**, v. 273, n. 4, p. C1378-1385, 1997.

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

UAUY, R.; CASTILLO, C. Lipid requirements of infants: implications for nutrient composition of fortified complementary foods. **J Nutr**, v. 133, p. 2962S–29672S, 2003.

UENO, P. M. et al. Alanyl-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis in vitro and in a murine model of weanling undernutrition. **AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 301, n. 4, p. G612–G622, 2011.

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

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

UNICEF; WHO; WORLD BANK GROUP. Levels and trends in child malnutrition. **Joint Child Malnutrition Estimates**, 21 edition. 2021.

VAN WOUWE, J. P. V.; VELDHUIZEN, M. Growth Characteristics in Laboratory Animals Fed Zinc-Deficient, Copper-Deficient, or Histidine-Supplemented Diets. **Biological Trace Element Research**, v. 55, n. 1–2, p. 71–77, 1996.

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

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

VICTORA, C. G. et al. Worldwide timing of growth faltering: revisiting implications for interventions. **Pediatrics**, v. 125, p. e473–80, 2010.

VITERI, F. E.; SCHNEIDER, R. E. Gastrointestinal alterations in protein-calorie malnutrition. **Med. Clin. NorthAm**, v. 58, p. 1487–1505, 1974.

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

WALKER C. F.; BLACK, R. E. Zinc and the risk for infectious disease. **Annu Rev Nutr**, v. 24, p. 255-75, 2004.

WATERLOW, J. C. Protein-energy malnutrition, **Edward Arnold**, London, 1992.

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

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

WELLS, J. C. K. Body composition of children with moderate and severe undernutrition and after treatment: a narrative review. **BMC medicine**, vol. 17, n. 1, p. 215, 2019.

WHO. **Management of severe malnutrition: a manual for physicians and other senior health workers**. Geneva: WHO, 1999.

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

WHO. **Complementary feeding**. WHO, 2022. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/complementary-feeding#tab=tab_1. Acesso em: 26 julho 2022.

WONG, V. Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction. **Am J Physiol**, v. 273, n. 6, p. C1859-1867, 1997.

WONG, S. C. et al. Growth and the growth hormone-insulin like growth factor 1 axis in children with chronic inflammation: Current Evidence, Gaps in Knowledge, and Future Directions. **Endocrine Reviews**, v. 37, n. 1, p. 62–110, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Malnutrition**. Geneva: WHO, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>. Acesso em: 10 dezembro 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Children: improving survival and well-being**. WHO: 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/children-reducing-mortality>. Acesso em: 01 março 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Underweight among children under 5 years of age (number in millions) (JME)**. WHO, 2022. Disponível em: [https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/gho-jme-underweight-numbers-\(in-millions\)](https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/gho-jme-underweight-numbers-(in-millions)). Acesso em: 31 de maio de 2022.

WORLD FOOD PROGRAMME. HungerMap LIVE: Global insights and key trends. WFP, 2022. Disponível em: <https://hungermap.wfp.org/global-summary.pdf> (hungermapdata.org). Acesso em: 29 julho 2022.

WRIGHT, E. M. I. Glucose galactose malabsorption. **Am J Physiol**, v. 275, p. G879–882, 1998.

YOUNG, A.; LEVIN, R. J. Diarrhoea of famine and malnutrition: investigations using a rat model. 2. Ileal hypersecretion induced by starvation. **Gut**, v. 31, p. 162–69, 1990a.

YOUNG, A.; LEVIN, R. J. Diarrhoea of famine and malnutrition: investigations using a rat model. 1. Jejunal hypersecretion induced by starvation. **Gut**, v. 31, p. 162–69, 1990b.

ZHANG, B.; GUO, Y. Supplemental zinc reduced intestinal permeability by enhancing occludin and zonula occludens protein-1 (ZO-1) expression in weaning piglets. **Br J Nutr**, v. 102, n. 5, p. 687-93, 2009.

ZHAO X et al. Bile Acid Profiling Reveals Distinct Signatures in Undernourished Children with Environmental Enteric Dysfunction. **J Nutr**, v. 151, n. 12, p. 3689-3700, 2021.

ZIEGLER, T. R et al. Glutamine and the gastrointestinal tract. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** v. 3, p. 355–362, 2000.

ZIHNI, C. et al. Tight junctions: From simple barriers to multifunctional molecular gates. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 9, p. 564–580, 2016.

ZHONG, W. et al. Dietary Zinc Deficiency Exaggerates Ethanol-Induced Liver Injury in Mice: Involvement of Intrahepatic and Extrahepatic Factors. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–14, 2013.

ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DA PESQUISA NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



**UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ**

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Desenvolvimento de um novo modelo murino de desnutrição infantil baseado no estudo coorte multicêntrico MAL-ED e suas consequências para barreira morfofuncional intestinal", protocolada sob o CEUA nº 3941290319 (ID 000977), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima e equipe; Samilly Albuquerque Ribeiro; Francisco Adelvane de Paulo Rodrigues; Herlice do Nascimento Veras; Alexandre Havt Bindá; Ivna Viana Costa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 16/05/2019.

We certify that the proposal "Development of a new murine model of child malnutrition based on the multicenter cohort study MAL-ED and its consequences for morphofunctional intestinal barrier", utilizing 78 isogenics mice (78 males), protocol number CEUA 3941290319 (ID 000977), under the responsibility of **Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima and team; Samilly Albuquerque Ribeiro; Francisco Adelvane de Paulo Rodrigues; Herlice do Nascimento Veras; Alexandre Havt Bindá; Ivna Viana Costa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 05/16/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2019 a 05/2020**

Área: **Departamento de Fisiologia E Farmacologia**

Origem: **Biotério Setorial da FAMED**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **21 a 27 dias**

N: **78**

Linhagem: **C57BL/6**

Peso: **5 a 12 g**

Local do experimento: Todos os experimentos serão realizados no setor de experimentação animal do Laboratório de doenças infecciosas, o Pré-clínico, de acordo com as informações reportadas acima.

Fortaleza, 17 de junho de 2019

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

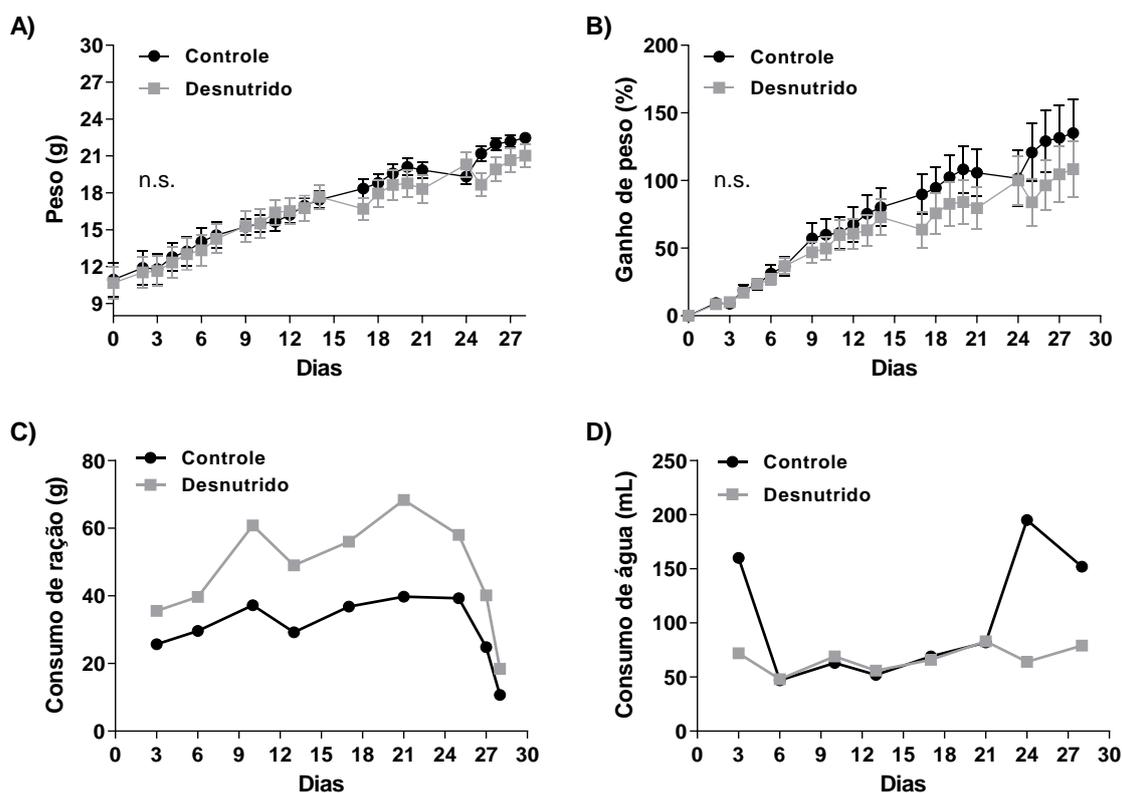
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

ANEXO B – EFEITOS DO CONSUMO DA DIETA MAL-ED *ad libitum* NOS PARÂMETROS CORPORAIS

Figura 1 – Efeitos do consumo da dieta MAL-ED *ad libitum* no peso, ganho de peso e crescimento corporal.



(A) Peso (g), (B) ganho de peso (%), (C) consumo de ração (g) e (D) consumo de água (mL) dos animais controles e desnutridos sob protocolo *ad libitum* por um período total de 28 dias. n.s.= sem significância, teste *t* de Student para Desnutrido vs. Controle para cada dia. Todos os dados são representativos de um experimento ($n=10-12$ /grupo) e os valores são apresentados pela média \pm erro padrão da média (EPM) para peso e ganho de peso e valores por caixa para consumo de água e ração.

ANEXO C – RESULTADO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE SGLT-1 E CLAUDINA-1

Figura 1 – Expressão proteica de SGLT-1 nos animais controles e desnutridos pela dieta MAL-ED.

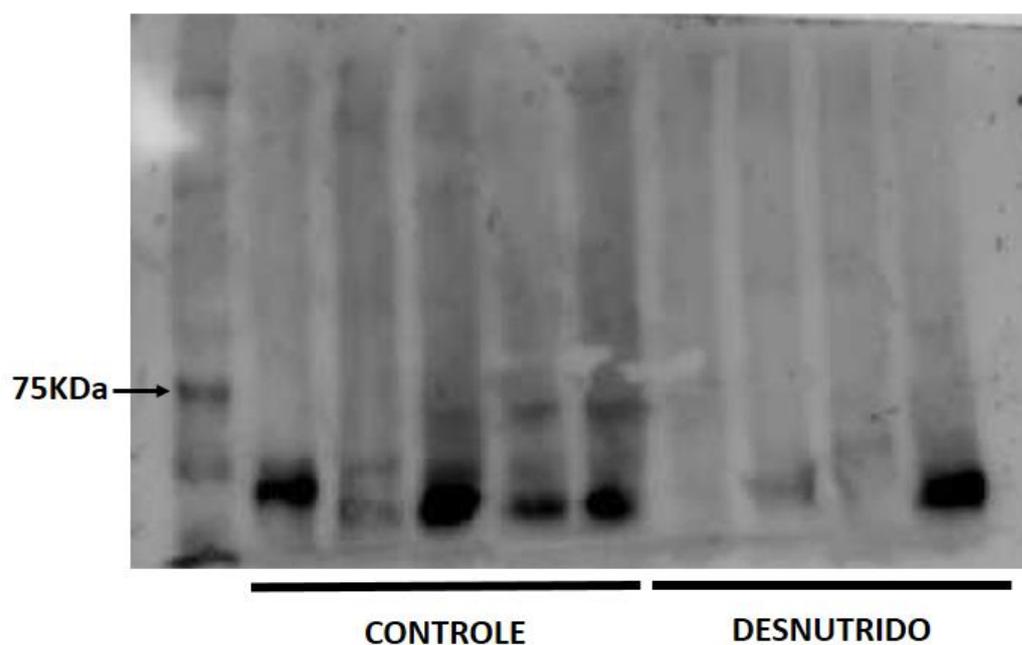
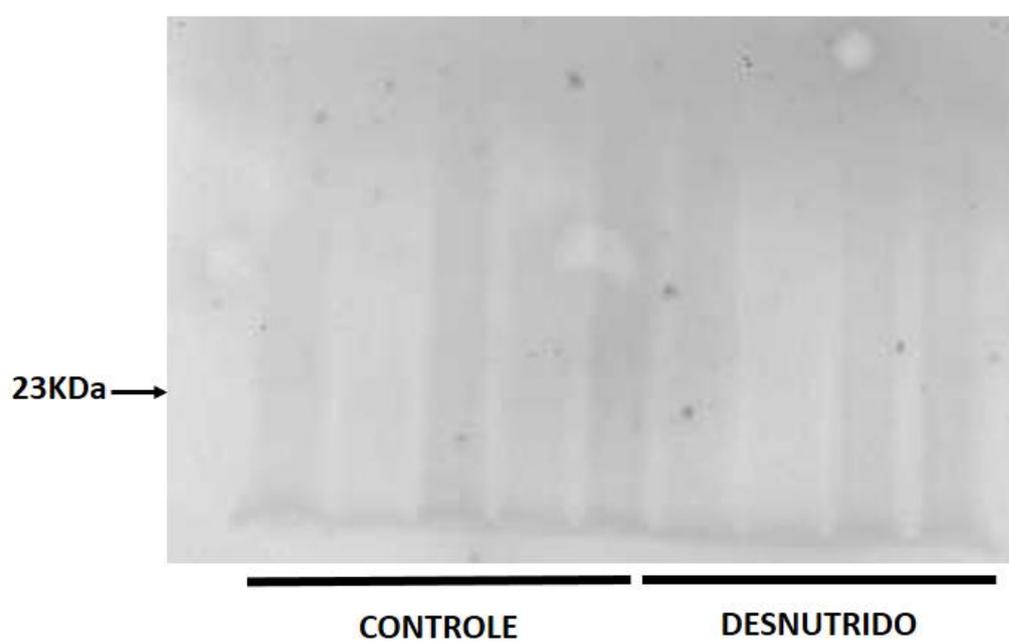


Figura 2 - Expressão proteica de claudina-1 nos animais controles e desnutridos pela dieta MAL-ED.



ANEXO D – ARTIGO CIENTÍFICO RELACIONADO A TESE EM FASE DE CONCLUSÃO PARA PUBLICAÇÃO

NOVO MODELO MURINO DE DESNUTRIÇÃO BASEADO NA DIETA COMPLEMENTAR DE CRIANÇAS DESNUTRIDAS CAUSA DANO NA BARREIRA EPITELIAL MORFOFUNCIONAL DO INTESTINO DELGADO

Samilly A Ribeiro,¹ José K de Sousa,¹ Enock LR Braga,¹ Xhaulla MQC Fonseca,¹ Mônica O Belém,¹ Lyvia MVC Magalhães,¹ Alexia FSM Melo,¹ Thiago M de Freitas,¹ Cristiane C de Aquino,¹ Armênio A dos Santos,¹ Alexandre B Havt,¹ Bruna LL Maciel,² Aldo AM Lima¹.

¹Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará

²Nutrition Postgraduation Program, Department of Nutrition, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

Corresponding author: Samilly A Ribeiro

Mailing address: Coronel Nunes de Melo Street, 1315 (Zip code: 60430-270), Biomedicine Center, Infectious Diseases Laboratory, Federal University of Ceará Fortaleza, Ceará

Email address: samilly.ribeiro@hotmail.com

Telephone: (85) 98729-8280

ABSTRACT

Background: A desnutrição é um grave problema de saúde pública, capaz de gerar risco de morte e sequelas no desenvolvimento físico e neurocognitivo infantil a longo prazo. Sugerimos uma nova dieta de desnutrição baseado na dieta complementar de crianças de sete países de baixa renda no desenvolvimento de um quadro clínico similar de desnutrição em camundongos recém desmamados.

Objective: Desenvolver e validar um novo modelo murino de desnutrição baseada na dieta complementar de crianças desnutridas de sete países de baixo poder socioeconômico pertencentes ao estudo coorte Malnutrition-Enteric Diseases (MAL-ED).

Methods: Para formulação da dieta de desnutrição MAL-ED, foi utilizado a diferença do percentual de energia, macronutrientes, fibras e zinco da dieta das crianças sem desnutrição vs. com desnutrição (Escore Z altura para idade; HAZ < -2) para reduzir da composição da dieta AIN-93M. Posteriormente, camundongos machos C57BL/6 (21 dias de idade) foram submetidos ao consumo da dieta controle (AIN-93) ou dieta MAL-ED, controlada diariamente, por 28 dias. O peso foi mensurado todos os dias; a composição corporal e o comprimento do corpo foram medidos a cada sete dias; razão lactulose:manitol (LM), morfometria e albumina foram avaliados no dia 7 e 28.

Results: A dieta MAL-ED possui -8.03% de energia, -37.46% de proteína, -24.20% de lipídeo, -10.83% de zinco e +5.93% de carboidrato e +45.17% de fibra que a dieta controle. A dieta MAL-ED foi capaz de causar desnutrição, com redução de ganho de peso e peso ($p < 0.05$) a partir do 1 e 2º dia, respectivamente, bem como desencadeou alterações na composição corporal ao longo do tempo, dano na integridade da barreira intestinal apenas em período agudo, aumentou a permeabilidade paracelular em ambos os tempos, reduziu área de vilos no duedeno e jejuno em período agudo e aumento compensatório da área intestinal em período crônico, sem comprometer o crescimento corporal e alterar os níveis séricos de albumina ($p > 0.05$).

Conclusions: A nova dieta MAL-ED foi capaz de desencadear desnutrição, com redução de peso, ganho de peso, dano na integridade da barreira em período agudo, aumento da permeabilidade paracelular e aumento da área intestinal em período crônico, provavelmente como adaptação a escassez de nutrientes da dieta. Este trabalho propõe o primeiro modelo de murino de desnutrição de relevância clínica, com base em dados da alimentação complementar e dietética de crianças desnutridas de sete diferentes países. .

Palavras-chave: Desnutrição; composição da dieta na desnutrição infantil; barreira epitelial intestinal; composição corporal na desnutrição.

INTRODUCTION

A desnutrição nos primeiros anos de vida é um sério problema de saúde por estar associada ao aumento do risco de mortalidade (1), ciclo vicioso de infecções entéricas clínicas e subclínicas (2), comprometimento do desenvolvimento físico (1) e cognitivo (3), assim como doenças crônicas na vida adulta (4,5). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) têm mostrado uma redução nas taxas de desnutrição nos últimos 20 anos, porém os dados ainda são alarmantes, no qual cerca de 149.2 milhões de crianças menores de 5 anos foram acometidas por desnutrição crônica e 45,4 milhões por desnutrição aguda em 2019 (6). Além disso, estima-se que a crise socioeconômica causada pela pandemia de COVID-19 e outros fatores associados terá um impacto crônico no número de crianças afetadas pelo déficit de estatura nos próximos anos (7).

A desnutrição é uma patologia complexa, geralmente associada a infecções e que levam a diversos danos nos sistemas corporais (8, 9, 10), em particular danos à barreira epitelial intestinal (11, 12, 13, 14). Diversos modelos animais têm contribuído para o entendimento da fisiopatologia associada à diferentes deficiências nutricionais. Por exemplo, a restrição calórica crônica (-15%) causa redução de peso e níveis mais baixos de proteína 1 monócito-quimioatraente (MCP-1) no fígado e adipócitos de camundongos (15). Enquanto, a severa deficiência de proteína em camundongos recém-desmamados desencadeia maior comprometimento de ganho de peso, aumento da inflamação intestinal, maiores alterações no perfil metabólico e na microbiota do que a dieta deficiente em zinco (16). Modelo de transferência de microbiota de crianças desnutridas e saudáveis também contribuiu para compreensão do papel da microbiota no desenvolvimento da desnutrição (17). Além disso, alguns modelos genéticos de experimentações pré-clínicas, mesmo não refletindo a clínica, têm demonstrado o impacto da deleção de proteínas de barreira epitelial intestinal no peso (18, 19). Neste sentido, nota-se a importante contribuição dos modelos animais *in vivo* de desnutrição para o avanço no conhecimento do papel das deficiências

nutricionais para o desenvolvimento saudável, entretanto, questiona-se o quanto estes modelos representam similaridade clínica com a desnutrição infantil.

Na literatura, existem apenas três dietas baseadas na composição alimentar de uma determinada população: a dieta básica regional (RBD), que mimetiza a composição alimentar da região no semiárido brasileiro (20); a dieta Milho Vegetal, que foi baseada em alimentos predominantes de crianças de Malawi com Kwashiorkor (21); e a M8, outra dieta baseada nos alimentos mais consumidos pela população de Malawi (17). Contudo, estas dietas são fundamentadas apenas nos alimentos mais predominantes destas populações, sem representar a quantidade de energia, macronutrientes e micronutrientes consumidas. Logo, a representação clínica é limitada na maioria dos modelos animais de desnutrição. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo formular uma nova dieta de desnutrição, dieta MAL-ED, com base num estudo recente que quantificou a energia, macronutrientes e micronutrientes da dieta complementar de crianças desnutridas de sete países de baixo poder socioeconômico pertencentes ao estudo coorte de desnutrição e infecção entérica (MAL-ED, do inglês Malnutrition-Enteric Diseases) (22). Nossa hipótese é que a nova dieta MAL-ED irá induzir um quadro clínico de desnutrição em camundongos recém-desmamados, consistindo no primeiro modelo murino de desnutrição que mimetizar as deficiências nutricionais comuns nas dietas de crianças em fase de alimentação complementar.

MÉTODOS

Animais e comitê de ética

Camundongos machos C57BL/6 ($n= 11/grupo$) do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 horas), em ambiente com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, água “*ad libitum*” e quantidade de dieta controlada diariamente. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e submetidos à aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (nº de protocolo 3941290319).

Dietas

A formulação da nova dieta indutora de desnutrição MAL-ED foi baseada na quantificação da dieta complementar de crianças com e sem desnutrição pertencentes ao estudo coorte Etiology, Risk Factors and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Child Health and Development (Malnutrition-Enteric Diseases; MAL-ED), descrito por Maciel et al. (22). A quantificação da dieta complementar foi feita através de registros alimentares das últimas 24 horas coletados de 1.463 crianças, de áreas urbanas, periurbanas e rurais de sete países de baixo nível socioeconômico: Bhaktapur, Nepal ($n = 229$); Dacca, Bangladesh ($n = 208$); Fortaleza, Brasil ($n = 169$); Haydom, Tanzânia ($n = 210$); Loreto, Iquitos, Peru ($n = 199$); Venda, África do Sul ($n = 221$); e Vellore, Índia ($n = 227$). Maciel et al. (22) quantificaram o consumo de energia, macronutrientes, fibras, 6 vitaminas (niacina, riboflavin, tiamina, folato e vitaminas A e C) e 6 minerais (cálcio, ferro, magnésio, potássio, fósforo e zinco) da dieta complementar da população descrita acima. Para formulação da nova dieta de desnutrição, utilizamos o percentual de diferença no

consumo de energia, macronutriente, fibras e zinco de crianças com desnutrição (HAZ < -2) vs. sem desnutrição com 24 meses de idade.

Para que a nova dieta de desnutrição tivesse o padrão alimentar exigido para roedores, essa diferença de percentual em energia, macronutrientes e micronutrientes foi subtraída dos valores nutricionais da dieta padrão para roedores AIN93-M, dieta controle. A formulação e produção das dietas MAL-ED e controle (AIN-93M) foram realizadas pela empresa Rhoster® (Araçoiaba da Serra, São Paulo, Brasil). A composição centesimal da nova dieta de desnutrição foi avaliada pelos seguintes métodos: dumas, perda por secagem, gravimetria, absorção atômica pela empresa CBO® (Valinhos, São Paulo, Brasil). Estes métodos em conjunto permitiram a quantificação de umidade e voláteis, proteína bruta, extrato etéreo por hidrólise ácida, fibra bruta, cálcio, fósforo e zinco, enquanto a quantidade de carboidrato foi estimada pela diferença nas porcentagens de macronutrientes.

Desenho experimental

O novo modelo murino de desnutrição foi conduzido de acordo com Brown et al., (23), com algumas adaptações. Camundongos C57BL/6 machos (21 dias de idade) tiveram seu peso corporal, comprimento total aferidos para serem distribuídos aleatoriamente nos grupos Controle (dieta AIN93-M) e Desnutrido (dieta MAL-ED). O protocolo foi conduzido por um período total de 28 dias para caracterização temporal dos efeitos da dieta sobre os parâmetros corporais, histopatologia e barreira epitelial intestinal. O consumo de ração foi controlado diariamente para que o grupo desnutrido consumisse a mesma quantidade que o grupo controle. O peso corporal foi aferido diariamente e a cada sete dias os animais foram avaliados quanto ao desenvolvimento corporal e composição corporal. Nos dias 7 e 28, os animais foram anestesiados por via intramuscular com cloridrato de cetamina (90 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg), sangue e tecido intestinal foram coletados para posterior análise e, por fim, os animais foram eutanasiados por meio de *exsanguinação*.

Avaliação do desenvolvimento corporal

O comprimento corporal dos animais foi mensurado nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 para avaliarmos o desenvolvimento corporal dos animais. Para isso, os camundongos foram rapidamente anestesiados por isoflurano (Cristália®, São Paulo, Itapira) (24), em seguida, foram posicionados sob uma superfície plana, de forma alinhada e comprimento corporal foi medido com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo® Precision Measuring Tools, Suzano, São Paulo, Brazil).

Análise da composição corporal: Bioimpedância elétrica

Os camundongos foram submetidos à avaliação corporal por tetra bioimpedância polar (ImpediVET®, Carlsbad, Califórnia, EUA) nos dias 0, 7, 14, 21 e 28. Para isso, os camundongos foram anestesiados, conforme mencionado no tópico desenho experimental, e colocados sob uma superfície não condutora com os membros dispostos perpendicularmente ao corpo e a cauda estendida distalmente. Quatro agulhas (calibre 25x12) foram inseridos na região subdérmica ao longo da linha medial dorsal. Os eletrodos centrais foram inseridos entre as orelhas e entre as patas traseiras, enquanto os eletrodos periféricos foram inseridos entre os olhos e na cauda, conforme especificado pelo fabricante. As agulhas foram conectadas a eletrodos

acoplados ao aparelho. O comprimento do animal entre os eletrodos centrais foi medido e registrado no equipamento, assim como o peso corporal do animal. Em seguida, a corrente elétrica foi acionada, os parâmetros de bioimpedância de resistência e reatância foram obtidos por um único espectro de 4 a 1 MHz em uma série de 256 pontos. O dispositivo usa um gráfico de impedância complexo para determinar a água corporal total, fluido extracelular e o fluido intracelular, enquanto a massa livre de gordura, a massa gorda e o índice de massa corporal são calculados por meio de software (ImpediVET®, Carlsbad, Califórnia, EUA) acoplado ao aparelho (25).

Avaliação da barreira epitelial intestinal com os biomarcadores lactulose e manitol

Um grupo experimental foi exclusivamente conduzida para avaliação da barreira epitelial intestinal utilizando o teste de lactulose e manitol. Os animais foram submetidos a um período de adaptação ao ambiente de coleta, que consistiu em permanecer em gaiolas metabólicas 2h/dia durante 5 dias antes da aplicação do teste. Nas últimas 24h antes do teste, todos os animais permaneceram em tempo integral nas gaiolas metabólicas. Durante essas 24h, 16h os animais foram alimentados com a dieta isocalórica G (Rhostrer®, São Paulo, Brasil), dieta pobre em carboidrato, e 8h de jejum, para evitar que os carboidratos da dieta interfiram na análise posterior. Após jejum, todos os animais receberam 200 µl da solução por gavagem, contendo 5,0 g de Lactulose (Duphar Laboratories, Southampton, Reino Unido) e 1,0 g de Manitol (Henrifarma Chemicals and Pharmaceuticals LTDA, São Paulo, Brasil) dissolvido em 20 ml de água. Amostras de urina, preservadas em 0,236 mg/ml de clorexidina (Sigma Chemical, St Louis, MO), foram coletadas 24 h após a administração da solução teste. Os animais permaneceram consumindo a dieta isocalórica G durante o período de coleta. Os volumes das amostras foram registrados e centrifugados a 10.000 rpm por 3 min, para, então, 50 µl de uma solução do padrão interno (3,6 mM de melibiose diluído em 2,9 ml de água destilada) ser adicionado a 50 µl de cada amostra. A solução foi centrifugada (10.000 rpm por 3 min) e 50 µl foi usado para determinação dos açúcares no equipamento UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, EUA). Duas soluções padrão de carboidratos foram usadas para calibrar o sistema no início e entre os testes de cada grupo. Os padrões continham 60 µM dos seguintes açúcares: glucosamina, manitol, melibiose e lactulose (grupo I) e inositol, sorbitol, glicose e lactose (grupo II). Curvas padrões dos açúcares e as amostras foram medidas por cromatografia líquida de alta pressão com detecção amperométrica pulsada, conforme descrito anteriormente (26).

Morphometric and histopathological analysis

Amostras do duodeno, jejuno e íleo foram seccionadas transversalmente e fixadas em tampão de formaldeído a 10% por 18 h. Após o período de fixação, o material foi desidratado, incluído em parafina, cortado em seções de 5,0 µm em micrótomo de impacto (Polycut S, Leica, Alemanha) e corado com hematoxilina e eosina (H&E). Posteriormente, com o auxílio de um microscópio óptico acoplado ao sistema de aquisição de imagens (LEICA) e software ImageJ versão 1.5a (National Institutes of Health, EUA) foram medidas as áreas de todos os vilos e criptas correspondentes para cada lâmina do grupo, com o intuito de analisar o impacto agudo e crônico da dieta MAL-ED na morfometria intestinal.

Para a análise histopatológica, as possíveis lesões foram analisadas de acordo com o sistema de escores de severidade do infiltrado inflamatório sugerido por Erben et al. (27) com algumas adaptações. Os critérios de severidade foram: **escore 0**, achados histológicos normais, menos que 10% de leucócitos na mucosa; **escore 1**, leve, 10 - 25% de leucócitos na mucosa e edema nos vilos; **escore 2**, moderado, 26 - 50% de leucócitos na mucosa, submucosa e edema; **escore 3**, intenso, > 51% de leucócitos transmural e edema nos vilos. As análises foram realizadas para todos os segmentos do intestino delgado coletados nos tempos 7 e 28 dias. A análise histopatológica foi realizada por um patologista.

Análise dos níveis séricos de albumina

Os níveis de albumina foram medidos através do kit de dosagem da Labteste® (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Preparamos as amostras conforme instruções do fabricante: amostra (10 µl de soro mais 1,0 ml do reagente de cor), branco (1,0 ml do reagente de cor) e o padrão (10 µl do padrão mais 1,0 ml do reagente de cor). As soluções foram levemente misturadas, e após 2 min foram realizadas as leituras utilizando o espectro de 630 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro Labquest® (Oregon, EUA).

Statistical analysis

Os dados coletados foram digitados em planilha de Microsoft Excel® versão 15/Office 2013 (Remond, Washington, USA) e verificados duplamente para validade da entrada dos dados. Dados paramétricos foram avaliados quanto a quanto a normalidade utilizando o teste Kolmogorov-Smirnov. Os dados paramétricos normalizados seguiram para a análise pelo teste *t* ou análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Bonferroni para os dados pareados. Os dados não paramétricos, por sua vez, foram analisados pelo teste de *Mann-Whitney*. Todos os testes foram aplicados no software GraphPad Prism® (Califórnia, Estados Unidos). Os resultados foram representados por média ± erro padrão da média (SEM) ou mediana quando indicado, máximo e mínimo. Dados considerados significativos obtiveram valores de $p < 0,05$.

Results

Composição da dieta MAL-ED

A análise de composição revelou que a nova dieta de desnutrição MAL-ED possui - 8.03% de energia, -37.46% de proteína, - 24.20% de proteína, -10.83% de zinco, +5.93% de carboidrato e +45.17% de fibra em relação a dieta controle, (**Tabela 1**). Os ingredientes e suas respectivas quantidades para formulação das dietas estão especificados na **tabela 1**.

Induction of malnutrition by the new MAL-ED diet

Os sinais clínicos de desnutrição só foram registrados quando a dieta foi controlada diariamente. A nova dieta de indutora de desnutrição foi capaz de reduzir de forma precoce o peso dos animais. No dia 2, os animais desnutridos registraram 10,51% a menos de peso ($p < 0,05$) quando comparado com os animais controles (**Figura 1A**). O peso permaneceu reduzido ($p < 0,05$) no grupo desnutrido (-13,04%) até o dia 28, quando comparado com o grupo controle (**Figura 1A**). O ganho de peso, por outro

lado, reduziu significativamente ($p < 0,05$) no grupo desnutrido desde o dia 1 (Controle $-6,63 \pm 0,28\%$ vs. Desnutrido $-8,55 \pm 0,56\%$) até o dia 28 (Controle $27,47 \pm 2,27$ vs. Desnutrido $12,49 \pm 2,46\%$) (**Figura 1B**). Em relação ao comprimento corporal, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no percentual de crescimento dos animais desnutridos em relação ao controle em nenhum tempo analisado, indicando ausência de comprometimento do crescimento (**Figura 1C**). A imagem representativa dos efeitos globais da dieta nos animais no dia 28 pode ser vista na **Figura 1D**.

Impact of the MAL-ED diet on body composition

A ingestão da dieta MAL-ED desencadeou redução significativa ($p < 0,05$) da água corporal total nos dias 7, 14, 21 e 28 dias (**Figura 2A**). As alterações na água corporal total foram principalmente associadas a uma redução no líquido extracelular. O líquido extracelular reduziu significativamente ($p < 0,05$) no grupo desnutrido comparado ao grupo controle nos dias 7, 14, 21 e 28 (**Figura 2B**), enquanto o fluido intracelular reduziu significativamente ($p < 0,05$) no grupo desnutrido comparado ao controle apenas nos dias 14 e 21 (**Figura 2C**). Em relação à massa corporal, o consumo da dieta MAL-ED resultou em redução significativa ($p < 0,05$) da massa livre de gordura nos tempos 7, 14, 21 e 28 (**Figura 2D**). Em contrapartida, a nova dieta compromete as reservas de gordura apenas em período mais tardio, com redução significativa ($p < 0,05$) de 16,35% e 25,46% da massa gorda do grupo desnutrido em relação ao controle no dia 21 e 28, respectivamente (**Figura 2E**). O índice de massa corporal foi reduzido significativamente ($p < 0,05$) somente no dia 28 (Controle $4.94 \pm 0.13 \text{ g/cm}^2$ vs. Desnutrido $4.5 \pm 0.09 \text{ g/cm}^2$) (**Figura 2F**).

Avaliação da integridade da barreira epitelial intestinal

A ingesta da dieta MAL-ED em período agudo desencadeou aumento significativo ($p = 0.011$) de 172,9% na permeabilidade paracelular em relação a ingesta da dieta controle (**Figura 3A**). O aumento da taxa de lactulose permaneceu 120% maior ($p = 0.0007$) nos animais desnutridos em relação ao controle em período crônico (**Figura 3A**). Com relação a área absorptiva total, em período agudo não houve alterações significativas, entretanto, foi registrado um aumento significativo ($p = 0.0012$) de 28,19% nos animais desnutridos em relação aos controles no dia 28 (**Figura 3B**). O consumo da dieta MAL-ED causou danos na integridade da barreira intestinal no dia 7, com aumento significativo ($p = 0.22$) da razão lactulose:manitol nos animais desnutridos em relação ao controle (**Figura 3C**). Contudo, não foi observado alterações significativas ($p = 1.014$) na razão lactulose/manitol entre os grupos (Control: 0.279, 0.312-0.592 vs. Malnourished: 0.222, 0.474-0.697) no dia 28 (**Figura 3C**).

Impacto do consumo da dieta MAL-ED na morfometria e histopatologia intestinal

A análise morfométrica revelou que a dieta MAL-ED desencadeou no dia 7 uma redução da área dos vilos nos animais desnutridos no duodeno (34,37%) e jejuno (41,37%), enquanto a área dos vilos no íleo foram 23,72% maiores ($p < 0.0001$) quando comparados com os controles (**Figura 4A**). A área das criptas foi significativamente menor no duodeno (24,31%) e maior no íleo (12,42%) no dia 7, sem gerar alterações significativas ($p = 0.243$) no jejuno (**Figura 4B**). Ao avaliarmos a morfometria intestinal no 28º dia de indução da desnutrição, identificamos que a área dos vilos foram significativamente ($p < 0.0001$) maiores no duodeno (276,38%) e íleo (27,84%) de camundongos desnutridos quando comparados ao controle (**Figura 4A**).

No entanto, a área dos vilos no jejuno de animais desnutridos foram 13,52% menores ($p < 0.001$) em relação aos controles (**Figura 4A**). As áreas das criptas, por sua vez, foram maiores ($p < 0.0001$) em todos os segmentos dos animais desnutridos em relação aos controles no dia 28 (**Figura 4B**). As imagens representativas do duodeno, jejuno e íleo dos animais desnutridos e controles nos dias 7 e 28 podem ser vistas na **figura 4C**.

Avaliação das concentrações séricas de albumina

Ao analisarmos as concentrações séricas de albumina nos grupos experimentais examinados, não identificamos diferença significativa ($p > 0.05$) entre os grupos controle e desnutrido nos dias 7 e 28 do protocolo experimental (**Figura 5**).

DISCUSSION

O presente estudo desenvolveu, de forma inovadora, uma dieta indutora de desnutrição, altura-por-idade z-escore < -2 , de âmbito internacional. A nova dieta de desnutrição MAL-ED causou redução precoce de peso, ganho de peso, comprometeu a composição corporal, com indicativo de dano na integridade da barreira epitelial intestinal em período agudo, aumento da permeabilidade paracelular, embotamento de vilos em período agudo, aumento da área absorptiva total em período crônico, sem alterar a taxa de crescimento e os níveis séricos de albumina dos camundongos recém-desmamados.

A deficiência de energia, macronutrientes e micronutrientes continua sendo um grave problema de saúde devido ao aumento do risco de morte (29) e as consequências a longo prazo (30, 31). Neste contexto, o estudo coorte MAL-ED tem contribuído para uma melhor compreensão da relação entre desnutrição e infecções entéricas subclínica e clínicas na primeira infância, inflamação sistêmica, déficit de crescimento, e danos na barreira epitelial intestinal (32, 33, 34, 35, 36). Além disto, foi realizado a quantificação da alimentação complementar de crianças de 9 a 24 meses pertencentes ao estudo coorte MAL-ED, dessa forma fazendo possível verificar a diferença entre a quantidade de macronutrientes, micronutrientes e energia da dieta de crianças com desnutrição aguda, subnutrição ou desnutrição crônica e crianças sem desnutrição (22). A partir desse estudo, desenvolvemos uma nova dieta de desnutrição com o intuito de desenvolver um modelo de experimentação animal que represente a clínica de crianças desnutridas em países de baixo renda socioeconômica.

A nova dieta indutora de desnutrição contém deficiência moderada em energia (-8.03%), proteína (-37.46%), lipídios (-24.40%) e zinco (-10.83%) e aumento moderado em carboidratos (+5.93%) e fibras (+45.17%) em relação a dieta controle. Na literatura, grande parte dos modelos *in vivo* utilizam dietas com drásticas reduções de um determinado macronutriente, micronutriente ou energia, assim divergindo da realidade da composição da dieta associada com desnutrição nessas crianças. Modelos de deficiência proteica, por exemplo, utilizam dietas com 0% (37), 0,7% (38), 2% (16), 4% (39, 40) e 7% de proteína (23) para induzir desnutrição, enquanto modelos experimentais que investigam o papel do zinco para o desenvolvimento saudável utilizam dietas com menos de 2 ppm de zinco (16, 41) e modelos de deficiência energética utilizam de -15 a -30% de energia em relação ao grupo controle (15, 42, 43). A quantificação de proteína em crianças com subnutrição, desnutrição

aguda e desnutrição crônica, nas diferentes faixas etárias, variam apenas de -2.0 a -6.6% em relação a dieta de crianças saudáveis. A deficiência de zinco em crianças desnutridas varia -2.3 a -8.6% e a quantidade de energia varia de 11.2 a -25.9% (22). Os modelos animais baseados na alimentação de populações específicas geralmente utilizam dietas indutoras de desnutrição com elevada deficiência proteica e são ricas em carboidratos. A RBD, por exemplo, contém baixo teor de energia (-14.62%), proteínas (-65.15%), lipídeos (-90.74%) e alto teor de carboidrato (+37.27) e fibras (+260.5%) em relação a dieta controle (20). A Maize vetegal, dieta baseada na alimentação de crianças com kwashiorkor do Malawi, contém menos proteínas (-65.03%), lipídeos (-52.11%) e fibras (-46.43%) e mais carboidrato (+34.94%) do que a dieta controle (21). A dieta M8, baseada na quantidade de energia e nutrientes da dieta malauiana, por sua vez, contém 26.1% de carboidrato, 4.36% de proteína, 3.66% de lipídeos e 155kcal/g, e não houve comparação com dieta controle (17). Ao compararmos a composição da nova dieta indutora de desnutrição com a dieta das crianças MAL-ED, verificamos que a dieta MAL-ED possui composição semelhante a dieta de crianças com desnutrição crônica, apesar de, apresentar uma maior deficiência em proteínas e lipídeos. Visto que, os modelos experimentais utilizam dietas com elevada redução de diversos nutrientes específicos e poucas dietas refletem a complexidade da deficiência alimentar observada na clínica, a nova dieta MAL-ED possui características gerais de crianças com desnutrição crônica aos 24 meses e parece representar melhor a clínica de avaliação nessas crianças.

A dieta MAL-ED reduziu o peso e ganho de peso de forma precoce, comprometeu a composição corporal ao longo do tempo, sem alterar a taxa de crescimento em animais recém desmamados. Alterações nos parâmetros corporais são os primeiros indícios clínicos de desnutrição. A redução de peso e ganho de peso no presente estudo corroboram com outros modelos de deficiência nutricional, que relatam alteração de peso e/ou ganho de peso na primeira semana de indução (14, 21, 23, 43). Com relação ao impacto da desnutrição no crescimento corporal, os estudos mostram que as deficiências nutricionais geralmente comprometem o crescimento dos animais (17, 23), diferente do observado no presente estudo. Contudo, é importante salientar que os estudos que avaliam o crescimento corporal utilizam dietas com exacerbada redução de nutrientes e/ou energia.

A análise da composição corporal também é uma importante ferramenta para a avaliação do estado nutricional, todavia é pouco explorada em modelos *in vivo*. Ribeiro et al. (44) verificou que a desnutrição induzida por RBD em animais recém desmamados acarreta redução precoce de água corporal total, fluído extracelular e reservas energéticas, enquanto o fluído intracelular reduziu apenas em tempo intermediário e não foi identificadas alterações no índice de massa corporal. Resposta semelhante foi observada no presente estudo, porém a ingesta da dieta MAL-ED reduziu rapidamente as reservas proteicas e somente em período crônico comprometeu as reservas de gordura. Em geral, sabe-se que o metabolismo de diversos órgãos na desnutrição é sustentado principalmente pela mobilização de gordura, sendo as reservas proteicas acionadas apenas quando o consumo de energia e proteínas é insuficiente para manter o metabolismo proteico (45). No entanto, um estudo ressaltou que condições patológicas como infecção e inflamação podem exigir aumento de demanda de aminoácidos, que por sua vez, aumentam o catabolismo proteico, reduzindo mais rapidamente as reservas proteicas (46). Desta forma, estes fatores podem ter aumentado primeiro o catabolismo das reservas proteicas dos animais desnutridos neste estudo, visto que, a desnutrição gera disbiose

(23) e aumento de inflamação sistêmica (32, 33, 47, 48). Além disto, a dieta MAL-ED possui uma composição nutricional inédita na experimentação *in vivo* e a patofisiologia associada a esta condição precisa ser melhor compreendida.

A desnutrição aguda indica recente e severa perda de peso e pode ser dividida em três tipos de manifestação clínica: marasmo, kwashiorkor e kwashiorkor marasmático. A mensuração de água corporal total e principalmente fluído extracelular estimam a formação de edema, principal característica de crianças com Kwashiorkor devido à alta deficiência de proteína na alimentação (49, 50). O marasmo, por outro lado, é condição geralmente derivada da restrição calórica, sendo diagnosticada pela perda de tecido adiposo e tecido muscular, sem presença de edema e com proteínas viscerais relativamente normais, incluindo albumina (51). O consumo crônico da dieta MAL-ED causou redução de peso, ganho de peso, tecido muscular, tecido adiposo, sem formação de edema, ausência de alterações nos níveis séricos de albumina e sem comprometer o crescimento dos animais. Desta forma, nossos resultados sugerem que a dieta MAL-ED é capaz de desenvolver nos animais um quadro de desnutrição aguda, mais especificamente um quadro clínico de marasmo.

A desnutrição infantil também tem sido associada com alterações na barreira morfofuncional intestinal, mais especificamente atrofia de vilos e ruptura da função da barreira intestinal (12, 52, 53). No entanto, observamos em modelos animais que essas alterações morfológicas são complexas, multifatoriais e dependem da dinâmica no tempo de avaliação. Brown et al. (23) relata ausência de alterações morfológicas e danos na barreira morfofuncional intestinal ao induzir desnutrição por dieta multideficiente em período crônico. Ueno et al. (13) ao induzir desnutrição materno-fetal por RBD identifica atrofia de altura de vilos, profundidade de cripta e razão vilos:cripta, bem como dano na barreira morfofuncional. Sampaio et al. (14), por sua vez, observa redução de profundidade de cripta em período agudo em modelo de desnutrição por RBD. A dieta MAL-ED, em contrapartida, desencadeou aumento da área de vilos e criptas no duodeno e íleo, mas redução de vilos no jejuno. Além disto, a ingesta da dieta MAL-ED também desencadeou aumento da permeabilidade paracelular com indicativo de dano na integridade da barreira epitelial intestinal em período agudo, mas ausência de dano na integridade da barreira intestinal, aumento da área absorptiva total e da permeabilidade paracelular em período crônico.

No presente estudo, identificamos um comprometimento maior de morfometria e função intestinal em período agudo que não persiste em período crônico. O aumento de área intestinal indicado pela análise morfométrica e pelo teste LM, ocorreram juntamente com ausência de alterações na razão L:M e o reestabelecimento do fluído intracelular nos animais desnutridos em período crônico. Essa associação é importante, uma vez que, o fluído intracelular é medido para estimar o consumo de oxigênio, requisitos calóricos, taxa metabólica basal e desempenho no trabalho (54). Ribeiro et al. (44), ao induzir desnutrição por RBD em camundongos recém desmamados, observou aumento da razão L:M e fluído intracelular em período intermediário, mas ausência de alterações na razão L:M e fluído intracelular em período mais crônico, indicando manutenção da função intestinal em período mais longos de consumo de dieta multideficiente. Logo, o aumento da área absorptiva e manutenção da integridade da barreira funcional gerada neste estudo pode ser decorrente de uma adaptação ao consumo crônico de uma dieta multideficiente, uma vez que, a conservação da função intestinal é de extrema importância para a adequada absorção de nutrientes.

As limitações deste estudo incluem a ausência do estudo de outros biomarcadores de desnutrição como IgA anti-LPS, zonulina, e proteína de ligação a ácidos graxos intestinais (I-FABP) que foi associado com desnutrição aguda infantil (11); análise de microbiota para verificar se o novo modelo gera disbiose, condição associada a desnutrição (23); investigar biomarcadores de inflamação sistêmica para melhor compreender a rápida depleção das reservas proteicas. Contudo, esse estudo inova com o desenvolvimento de um modelo murino de desnutrição que representa a clínica de crianças desnutridas de sete países de baixa renda socioeconômico, possibilitando uma melhor compreensão sobre a patobiologia gerada nos diversos sistemas do corpo.

Em conclusão, desenvolvemos uma dieta inovadora de desnutrição baseado na composição da dieta de crianças com desnutrição acompanhadas em estudo infantil de coorte, com moderada deficiência em energia, proteína, lipídeos e zinco e aumento moderado de carboidratos e fibras, capaz de gerar desnutrição em modelos animais. A nova dieta de desnutrição reduziu o peso e o ganho de peso de forma precoce, comprometeu a composição corporal principalmente em período crônico, desencadeou danos na barreira morfofuncional intestinal principalmente em período agudo, sem alterar a taxa de crescimento e níveis séricos de albumina em período crônico, consistindo, assim, no primeiro modelo murino de desnutrição com base na sólida evidencia dos dados de composição da dieta em crianças com desnutrição clínica em países com baixa renda socioeconômica em três continentes, América do Sul, África e Ásia.

Acknowledgments

Agradecemos a todos os pesquisadores envolvidos no desenvolvimento, agências de apoio financeiro. As responsabilidades dos autores foram as seguintes: SAR, BLLM e AAML: desenharam a pesquisa; SAR, XMQCF, LMVCM, AFSMM, JKS, CCA, ABH: conduziram o estudo; AAS, MOB: forneceram e conduziram a bioimpedância elétrica. SAR e BLLM: análise e interpretação de dados; SAR, BLLM e AAML: redigiram o artigo e tem a responsabilidade final pelo conteúdo; todos os autores: leram e aprovaram o manuscrito.

Financial support

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; nº 426032/2018-7). O CNPq não participou da concepção, análise ou redação deste artigo.

The Etiology, Risk Factors and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Child Health and Development Project (MAL-ED) was a collaborative project supported by the Bill & Melinda Gates Foundation, the Foundation for the National Institutes of Health, and the National Institutes of Health/Fogarty International Center (grant number OPP47075).

References

1. Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, de Onis M, Ezzati M, Mathers C, Rivera J. Maternal and Child Undernutrition Study Group. Maternal and child

- undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet*, 2008; 371(9608):243-60.
2. Schorling JB, Mcauliffe JF, De Souza MA, Guerrant RL. Malnutrition is associated with increased diarrhoea incidence and duration among children in an urban Brazilian slum. *Int J Epidemiol*, 1990; 19(3): 728–735.
 3. Galler JR, Bryce CP, Zichlin ML, Fitzmaurice G, Eaglesfield GD, Waber DP. Infant Malnutrition Is Associated with Persisting Attention Deficits in Middle Adulthood. *J Nutr*, 2012; 142(4): 788–794.
 4. Guerrant RL, DeBoer MD, Moore SR, Scharf RJ, Lima AAM. The impoverished gut—a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. *Gastroenterol Hepatol*, 2012; 10(4): 220–229.
 5. Deboer MD, Lima AAM, Oría RB, Scharf RJ, Moore SR, Luna MA, Guerrant RL. Early childhood growth failure and the developmental origins of adult disease: Do enteric infections and malnutrition increase risk for the metabolic syndrome? *Nutr Rev*, 2013; 70(11): 642–653.
 6. UNICEF, WHO, World Bank Group. Levels and trends in child malnutrition. Joint Child Malnutrition Estimates, edition 2021.
 7. Headey D, Heidkamp R, Osendarp S, Ruel M, Scott N, Black R, Shekar M, Bouis H, Flory A, Haddad L *et al.* Impacts of COVID-19 on childhood malnutrition and nutrition-related mortality. *Lancet*, 2020; 396(10250): 519–521.
 8. Barreto GSC, Vanderlei FM, Vanderlei LCM, Leite, AJM. Impact of malnutrition on cardiac autonomic modulation in children. *J Pediatr (Rio J)*, 2016; 92(6): 638–644.
 9. de Belchior ACS, Angeli JK, Faria T, Siman FDM, Silveira EA, Meira EF, da Costa CP, Vassallo DV, Padilha AS. Post-weaning protein malnutrition increases blood pressure and induces endothelial dysfunctions in rats. *PLoS One*, 2012; 7(4): 1–9.
 10. Alves AP, Dâmaso AR, Pai VD. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. *J Pediatr (Rio J)*, 2008; 84(3): 264–271.
 11. Guerrant RL, Leite AM, Pinkerton R, Medeiros PHQS, Cavalcante PA, DeBoer M, Kosek M, Duggan C, Gewirtz A, Kagan JC *et al.* Biomarkers of environmental enteropathy, inflammation, stunting, and impaired growth in children in northeast Brazil. *PLoS ONE*, 2016; 11(9), 1–20.
 12. Lima NL, Soares AM, Mota RMS, Monteiro HSA, Guerrant RL, Lima AAM. Wasting and intestinal barrier function in children taking alanyl-glutamine-supplemented enteral formula. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 44(3): 365–374.
 13. Ueno PM, Oria RB, Maier EA., Guedes M, de Azevedo OG, Wu D, Willson T, Hogan SP, Lima AAM, Guerrant RL *et al.* Alanyl-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis in vitro and in a murine model of weanling undernutrition. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2001; 301(4): G612–22.
 14. Sampaio IC, Medeiros PHQS, Rodrigues FAP, Cavalcante PA, Ribeiro SA, Oliveira JS, Prata MMG, Costa DVS, Fonseca SGC, Guedes MM *et al.* Impact of acute undernutrition on growth, ileal morphology and nutrient transport in a murine model. *Braz J Med Biol Res*, 2016; 49(10): 1–10.
 15. Park C, Park S, Soo M, Kim H, Nim S. Effects of mild calorie restriction on lipid metabolism and inflammation in liver and adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017; 490(3):636-42.

16. Mayneris-perxachs J, Bolick DT, Leng J, Medlock GL, Kolling GL, Papin JA, Swann JR, Guerrant RL. Protein- and zinc-deficient diets modulate the murine microbiome and. *Am J Clin Nutr* 2016; 104:1253–62.
17. Blanton LV, Charbonneau MR, Salih T, Barratt MJ, Venkatesh S, Ilkaveya O, Subramanian S, Manary MJ, Trehan I, Jorgensen JM *et al.* Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children. *Science*, 2016; 351(6275): aad3311-7.
18. Wada M, Tamura A, Takahashi N, Tsukita S. Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na⁺ flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition. *Gastroenterology*, 2013; 144(2), 369–80.
19. Chalvon-demersay T, Even PC, Chaumontet C, Piedcoq J, Viollet B, Gaudichon C, Tom D, Foretz M, Azzout-marniche D. Modifying the Dietary Carbohydrate-to-Protein Ratio Alters the Postprandial Macronutrient Oxidation Pattern in Liver of AMPK-Deficient Mice Modifying the Dietary Carbohydrate-to-Protein Ratio Alters the Postprandial Macronutrient Oxidation Pattern in Liver of AMPK-Deficient Mice. *J Nutr*, 2019; 147(9):1669-76.
20. Teodósio NR, Lago ES, Romani SA, Guedes RC. A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam Nutr* 1990; 40(4), 533–547.
21. May, T., Klatt, K. C., Smith, J., Castro, E., Manary, M., Caudill, M. A., Jahoor, F., & Id, M. L. F. (2018). Choline Supplementation Prevents a Hallmark Disturbance of Kwashiorkor in Weanling Mice Fed a Maize Vegetable Diet: Hepatic Steatosis of Undernutrition. *Nutrients*, 2018; 10(653):1-15.
22. Maciel BLL, Costa PN, Filho JQ, Ribeiro SA, Rodrigues FAP, Soares AM, Júnior FS, Ambikapathi R, McQuade ETR, Kosek M *et al.* Higher Energy and Zinc Intakes from Complementary Feeding Are Associated with Decreased Risk of Undernutrition in Children from South America, Africa, and Asia. *J Nutr*, 2021; 151(1), 170–178.
23. Brown EM, Wlodarska M, Willing BP, Vonaesch P, Han J, Reynolds LA, Arrieta MC, Uhrig M, Scholz R, Partida O, Borchers CH, Sansonetti PJ, Finlay BB. Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model. *Nat Commun*, 2015; 6:7806.
24. Schwarzer M, Makki K, Storelli G, Machuca-gayet I, Hudcovic T, Heddi A, Rieusset J, Kozakova H. *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. *Science*, 2012; 351(6275):854-7.
25. Carle, M.S. Validation of bioimpedance spectroscopy by assessing. PhD Thesis, University of Alabama, 2010.
26. Barboza MS, Silva TMJ, Guerrant RL, Lima AAM. Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. *Braz J Med Biol Res*, 1999; 32(12), 1499–1504.
27. Wong DV, Lima-Júnior RC, Carvalho CB, Borges VF, Wanderley CW, Bem AX, Leite CA, Teixeira MA, Batista GL, Silva RL, Cunha TM, Brito GA, Almeida PR, Cunha FQ, Ribeiro RA. The Adaptor Protein Myd88 Is a Key Signaling Molecule in the Pathogenesis of Irinotecan-Induced Intestinal Mucositis. *PLoS One*, 2015; 10(10):e0139985.
28. Erben U, Loddenkemper C, Doerfel K, Spieckermann S, Haller D, Heimesaat MM, Zeitz M, Siegmund B, Kühl AA. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014;7(8):4557-76.

29. WHO. Children: improving survival and well-being. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/children-reducing-mortality>
30. DeBoer MD, Lima AAM, Oriá RB, Scharf RJ, Moore SR, Luna MA, Richard L. Early childhood growth failure and the developmental origins of adult disease: Do enteric infections and malnutrition increase risk for the metabolic syndrome? *Nutr Rev*, 2013; 70(11), 642–653.
31. Galler JR, Bryce CP, Zichlin ML, Fitzmaurice G, Eaglesfield GD, Waber DP. Infant Malnutrition Is Associated with Persisting Attention Deficits in Middle Adulthood. *J Nutr*, 2012; 142(4), 788–794.
32. DeBoer MD, Scharf RJ, Leite AM, Ferrer A, Havt A, Pinkerton R, Lima AAM, Guerrant RL. Systemic inflammation, growth factors, and linear growth in the setting of infection and malnutrition. *Nutrition*, 2017; 33, 248–53.
33. Guerrant RL, Leite AM, Pinkerton R, Medeiros PHQS, Cavalcante PA, DeBoer M, Kosek M, Duggan C, Gewirtz A, Kagan JC *et al.* Biomarkers of environmental enteropathy, inflammation, stunting, and impaired growth in children in northeast Brazil. *PLoS One*, 2016; 11(9), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158772>
34. Lima AAM, Oriá RB, Soares AM, Filho JQ, De Sousa F, Abreu CB, Bindá A, Lima I, Quetz J, Moraes M *et al.* Geography, population, demography, socioeconomic, anthropometry, and environmental status in the MAL-ED cohort and case-control study sites in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Clin Infect Dis*, 2014; 59(Suppl 4), S287–94.
35. Lee GO, McCormick BJJ, Seidman JC, Kosek MN, Haque R, Olortegui MP, Lima AAM, Bhutta A, Kang G, Samie A *et al.* Infant Nutritional Status, Feeding Practices, Enteropathogen Exposure, Socioeconomic Status, and Illness Are Associated with Gut Barrier Function as Assessed by the Lactulose Mannitol Test in the MAL-ED Birth Cohort. *Am J Trop Med Hyg*, 2017; 97(1):281–90.
36. Kosek M, Guerrant RL, Kang G, Bhutta Z, Yori PP, Gratz J, Gottlieb M, Lang D, Lee G, Haque R *et al.* Assessment of environmental enteropathy in the MAL-ED cohort study: Theoretical and analytic framework. *Clin Infect Dis*, 2014; 59(Suppl 4):S239–47.
37. Belmonte L, Coëffier M, Pessot FLE, Miralles-barrachina O, Hiron M, Leplingard A, Lemeland J, Hecketsweiler B, Daveau M, Ducrotté P *et al.* Effects of glutamine supplementation on gut barrier, glutathione content and acute phase response in malnourished rats during inflammatory shock. *World J Gastroenterol*, 2007; 13(20):2833–40.
38. Corware K, Yardley V, Mack C, Schuster S, Al-hassi H, Herath S, Bergin P, Modolell M, Munder M, Müller I, Kropf P. Protein energy malnutrition increases arginase activity in monocytes and macrophages. *Nutr Metab*, 2014; 11(51):1–10.
39. Eyzaguirre-Velásquez J, Olavarría-Ramírez L, González-Arancibia C, Díaz-Merino C, Ariz R, López S, Quiroz W, Beltrán CJ, Bravo JA, Julio-Pieper M. Protein Malnutrition During Juvenile Age Increases Ileal and Colonic Permeability in Rats. *JPGN*, 2017; 64(5), 707–12.
40. Bolick DT, Chen T, Alves LAO, Tong Y, Wu D, Joyner LT, Oriá RB, Guerrant RL, Fu Z. Intestinal cell kinase is a novel participant in intestinal cell signaling responses to protein malnutrition. *PLoS One*, 2014; 9(9), 1–8.
41. Bolick DT, Kolling GL, Moore JH, de Oliveira LA, Tung K, Philipson C, Viladomiu M, Hontecillas R, Bassaganya-Riera J, Guerrant RL. Zinc deficiency alters host

- response and pathogen virulence in a mouse model of enteroaggregative *escherichia coli* -induced diarrhea. Gut Microbes, 2015; 5(5), 618–27.
42. Núñez IN, Galdeano CM, Carmuega E, Weill R, Leblanc AM, Perdigón G. Effect of a probiotic fermented milk on the thymus in Balb/c mice under non-severe protein-energy malnutrition. Br J Nutr, 2013; 110(3), 500–8.
43. Pan F, Zhang L, Li M, Hu Y, Zeng B, Yuan H, Zhao L. Predominant gut *Lactobacillus murinus* strain mediates anti-inflammaging effects in calorie-restricted mice. Microbiome, 2018; 6(54):1–17.
44. Ribeiro, S. A. IMPACTO TEMPORAL DESENCADEADO PELA DIETA BÁSICA REGIONAL SOBRE A BARREIRA EPI TELIAL INTESTINAL EM MODELO in vivo. (Dissertação) Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, 2017.
45. Cahill, G. F. Fuel Metabolism in Starvation. Annu Rev Nutr, 2006; 26(1), 1–22.
46. Briend A, Khara T, Dolan C. Wasting and stunting — similarities and differences: Policy and programmatic implications. Food Nutr Bull, 2015; 36(1):15–23.
47. Attia S, Versloot CJ, Voskuil W, Vliet SJV, Giovanni V, Zhang L, Richardson S, Netea MG, Berkley JA, Rheenen PF et al. Mortality in children with complicated severe acute malnutrition is related to intestinal and systemic inflammation: an observational. Am J Clin Nutr 2016; 104:1441–9.
48. de Queiroz CA, Fonseca SGC, Frota PB, Figueiredo IL, Aragão KS, Magalhães CEC, de Carvalho CB, Lima, AAM, Ribeiro, RA, Guerrant, RL et al. Zinc treatment ameliorates diarrhea and intestinal inflammation in undernourished rats. BMC Gastroenterology, 2014; 14(136): 1-14.
49. Coulthard, M. Oedema in kwashiorkor is caused by hypoalbuminaemia. Paediatrics and International Child Health, 2015; 35(2):83–89.
50. ACF International. Taking Action Nutrition for Survival, Growth & Development, 2010; 1–52.
51. Soeters P, Bozzetti F, Cynober L, Forbes A, Shenkin A, Sobotka L. Defining malnutrition: A plea to rethink. Clin Nutr, 2017; 36, 896–901.
52. Lima AAM, Brito LFB, Ribeiro HB, Martins MCV, Lustosa AP, Rocha EM, Lima NL, Monte CMG, Guerrant RL. Intestinal barrier function and weight gain in malnourished children taking glutamine supplemented enteral formula. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005; 40(1):28–35.
53. Sullivan PB, Lunn PG, Northrop-Clewes C, Crowe PT, Marsh MN, Neale G. Chronic diarrhea and malnutrition: histology of the small intestinal lesion. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1991; 14(2):208-15.
54. Earthman CP, Matthie JR, Reid PM, Harper IT, Ravussin E, Howell WH. A comparison of bioimpedance methods for detection of body cell mass change in HIV infection. J Appl Physiol Journal, 2010; 88:944–56.

Tabela 1- Composição nutricional da dieta MAL-ED e controle.

	Dieta Controle	Dieta MAL-ED*	Diferença (%)
Energia (Kcal)	391.69	360.22	-8.03

Macronutrientes

Carboidrato (g)	61.89	65.66	5.93
Proteína (g)	21.25	13.29	-37.46
Lípido (g)	6.57	4.98	-24.20
Fibras	2.9	4.21	45.17
<i>Micronutrientes</i>			
Zinco (mg)	35.0	31.21	-10.83
<i>Ingredientes</i>			
Semola grits (g)	-	54.90	
Caseína (81% proteína) / 14% (g)	16.40	9.60	
Amido dextrinizado (g)	15.50	0.00	
Sacarose (g)	10.00	0.00	
Óleo de soja (g)	4.00	5.10	
Celulose MC-101 (g)	5.00	26.00	
Mix mineral (g)	3.50	3.50	
Mix vitamínico (g)	1.00	1.00	
L-cisteína (g)	0.18	0.30	
Bitartarato de colina (g)	0.25	0.25	
Tert-butilhidroquinona (g)	0.0008	0.0014	

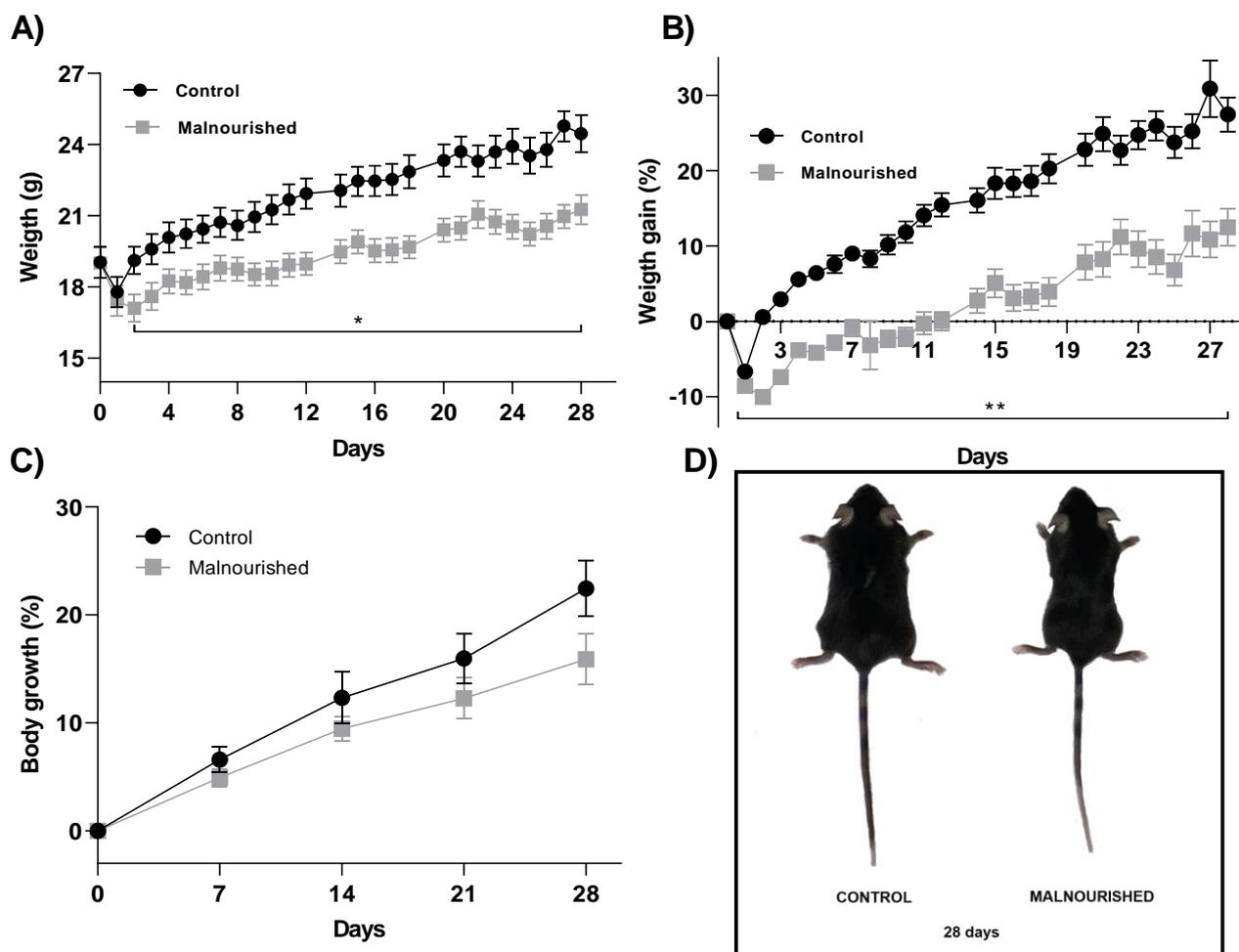


Figure 1- Comparison of physical development in mice fed malnutrition MAL-ED or control diet. (A) Weight (g) and (B) Weight gain (%) of the control and malnourished animals for a total period of 28 days ($n = 10-11$). Data are presented as mean \pm standard error of mean (SEM) (* Malnourished vs. control, $p < 0.05$, Student's t test; # $p < 0.05$, one way ANOVA followed by the Bonferroni post-test in the malnourished group comparing day 1 with the other times). (C) Variation in tail length on days 7, 14, 21 and 28 ($n = 10-11$). Data are presented as mean \pm SEM (# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ one way ANOVA followed by the Bonferroni post-test in the malnourished group comparing day 1 with the other times). (D) Illustrative image of the control and malnourished animal on the 28th day.

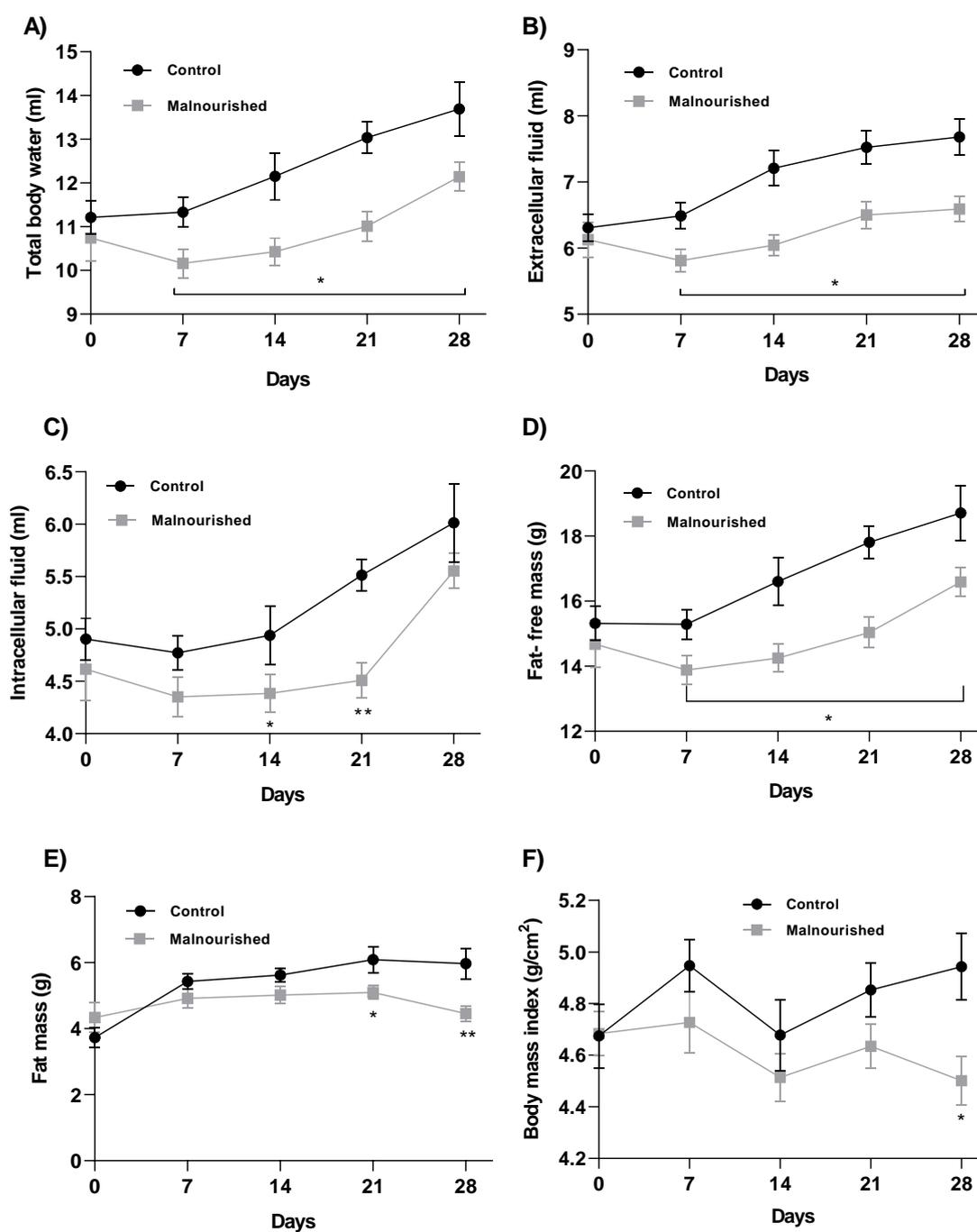


Figure 2 - Body composition in animals fed a malnourished MAL-ED or control diet. (A) Total body water (ml), (B) Extracellular fluid (ml), (C) Intracellular fluid (ml), (D) Fat-free mass (g), (E) Fat mass (g) and (F) Body mass index of control and malnourished animals at times (days) 0, 7, 14, 21, 28 ($n = 10-11$). Values are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) of the control (black line) and malnourished (red line) groups (* $P < 0.05$, Student t test, Control vs. Malnourished on each day).

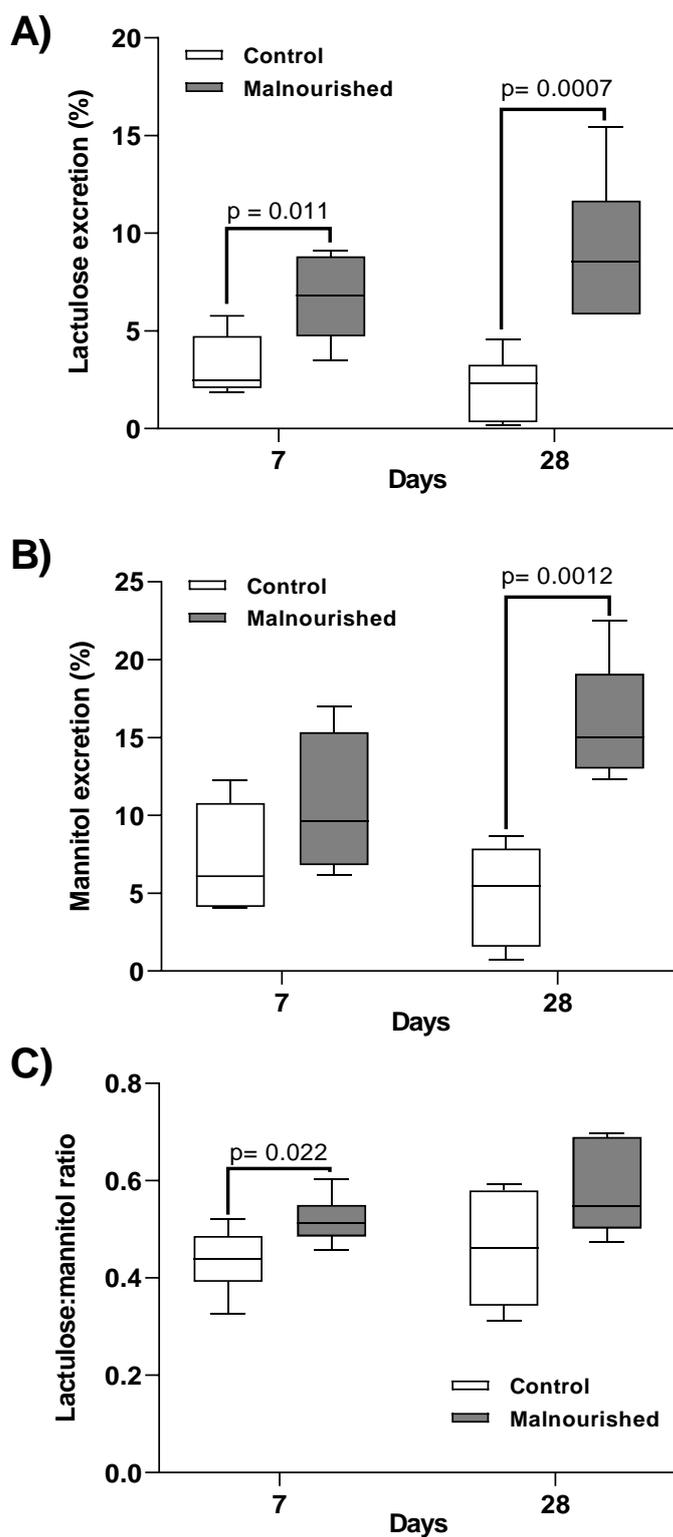


Figure 3 – Permeabilidade intestinal nos animais que consumiram dieta controle e dieta MAL-ED. A) Excreção de lactulose (%), B) excreção de manitol (%) e C) razão lactulose/manitol em animais controles (barra branca) e desnutridos (barra cinza) no dia 7 e 28. Os dados são correspondentes a um experimento ($n=7-8$) e os valores estão representados em mediana, máximo e mínimo (teste *Man Whitney*, valor de p especificado nos dados singficativos).

Figure 4- Effects of consumption of the MAL-ED malnutrition diet on the villi and crypts of the duodenum, jejunum and ileum on days 7 and 28 of consumption. A) villi area (μm^2) and B) encryption area (μm^2) of duodenum, jejunum and ileum of control (CTRL) and malnourished (MAL) groups at days 7 and 28. Values are presented as mean \pm SEM (test *Man Whitney*, MAL vs. CTRL for each bowel segment at 7 and 28 days, α : $p < 0.0001$, duodenum on day 7; β : $p < 0.0001$, jejunum on day 7; δ : $p < 0.0001$, ileum on day 7; α : $p < 0.0001$, duodenum on day 28; β : $p < 0.0001$, jejunum on day 28; γ : $p < 0.0001$, ileum on day 28). C) Representative images at day 7 and D) Representative images at day 28 of the duodenum, jejunum and ileum of the CTRL and MAL groups.

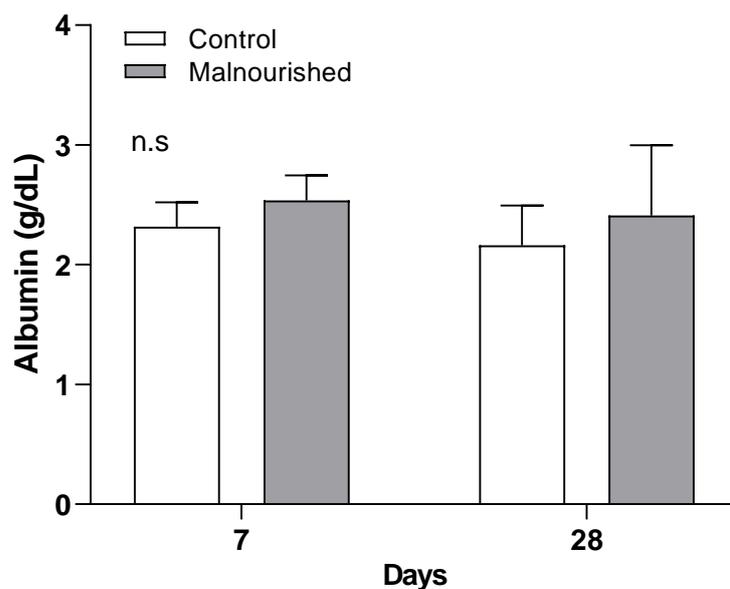


Figure 5 – Efeito do consumo da dieta MAL-ED nos níveis séricos de albumina em período agudo e crônico. Os dados são correspondentes a duas linhas experimentais: 7 e 28 dias de consumo da dieta controle (barra branca) e dieta MAL-ED (barra cinza) ($n=4-7$). Os valores estão representados em média \pm erro padrão média (teste *t*, *n.s.* corresponde a sem significância, teste).

ANEXO E – TRAJETÓRIA ACADÊMICA



British Journal of Nutrition

Article contents

Abstract

Accepted manuscript

Consumption of a multi-deficient diet causes dynamic changes in the intestinal morphofunctional barrier, body composition and impaired physical development in post-weaning mice

Published online by Cambridge University Press: 29 April 2022

S. A. Ribeiro , F. A. P. Rodrigues, M. A. Clementino, H. N. Veras, R.C.L. Siqueira, P. H. Q. de Medeiros, J. M. Pereira, [M.F.A. Guanabara Júnior](#), J. K. de Sousa, A.K.S. dos Santos, A.A. dos Santos, B.L.L. Maciel, A. Havt and A. A. M. Lima Show author details ▾

Article

Metrics

 Save PDF

 Share

 Cite

 Rights & Permissions

Abstract



The Journal of Nutrition
Community and International Nutrition

See corresponding commentary on page 5.

Higher Energy and Zinc Intakes from Complementary Feeding Are Associated with Decreased Risk of Undernutrition in Children from South America, Africa, and Asia

Bruna LL Maciel,¹ Priscila N Costa,¹ José Q Filho,² Samilly A Ribeiro,² Francisco AP Rodrigues,² Alberto M Soares,² Francisco S Júnior,² Ramya Ambikapathi,³ Elizabeth TR McQuade,⁴ Margaret Kosek,⁵ Tahmeed Ahmed,⁶ Pascal Bessong,⁷ Gangadeep Kang,⁸ Sanjaya Shrestha,⁹ Estomih Mduma,¹⁰ Eliwaza Bayo,¹⁰ Richard L Guerrant,¹¹ Laura E Caulfield,¹² and Aldo AM Lima² for the MAL-ED Network Investigators

¹Nutrition Postgraduation Program, Department of Nutrition, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil; ²INCT—*Instituto de Biomedicina do Semiárido Brasileiro (IBISAB)*, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil; ³Department of Public Health, Purdue University, West Lafayette, IN, USA; ⁴Department of Public Health Sciences, University of Virginia, Charlottesville, VA, USA; ⁵Department of International Health, The Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, MD, USA; ⁶Division of Nutrition and Clinical Services, icddr, Dhaka, Bangladesh; ⁷University of Venda, Thohoyandou, South Africa; ⁸Division of Gastrointestinal Sciences, Christian Medical College, Vellore, India; ⁹Walter Reed/Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS) Research Unit, Nepal (WARUN), Kathmandu, Nepal; ¹⁰Haydom Global Health Research Centre, Haydom Lutheran Hospital, Haydom, Tanzania; ¹¹Center for Global Health, Division of Infectious Diseases and International Health, University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, VA, USA; and ¹²Center for Human Nutrition, Department of International Health, The Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, MD, USA

ABSTRACT

Background: Few studies have focused on quantitatively analyzing nutrients from infant diets, compromising

American Society for Microbiology
Journal of Clinical Microbiology
Volume 57, Issue 4, April 2019
<https://doi.org/10.1128/JCM.01777-18>

Bacteriology

Virulence-Related Genes and Coenteropathogens Associated with Clinical Outcomes of Enteropathogenic *Escherichia coli* Infections in Children from the Brazilian Semiarid Region: a Case-Control Study of Diarrhea

Ana Karolina S. Santos, Pedro Henrique Q. S. de Medeiros, Mariana D. Bona, Mara M. G. Prata, Marília S. M. G. Amaral, Herlice N. Veras, Rafaela C. Pankov, Samilly A. Ribeiro, Paloma A. Cavalcante, Thiago M. Freitas, Rafaella D. G. Gondim, Daniel M. N. de Oliveira, Natália K. F. M. Melo, Alexandre Havt, and Aldo A. M. Lima

Institute of Biomedicine for Brazilian Semiarid, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

 Springer Link

Original Article | [Published: 26 July 2018](#)

Campylobacter jejuni virulence genes and immune-inflammatory biomarkers association with growth impairment in children from Northeastern Brazil

[Herlice do Nascimento Veras](#) , [Pedro H. Q. S. Medeiros](#), [Samilly A. Ribeiro](#), [Thiago M. Freitas](#), [Ana K. S. Santos](#), [Marília S. M. G. Amaral](#), [Mariana D. Bona](#), [Alexandre Havt](#), [Ila F. N. Lima](#), [Noélia L. Lima](#), [Alessandra Di Moura](#), [Álvaro M. Leite](#), [Alberto M. Soares](#), [José Q. Filho](#), [Richard L. Guerrant](#) & [Aldo A. M. Lima](#)

[European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases](#) **37**, 2011–2020 (2018) | [Cite this article](#)

533 Accesses | **7** Citations | **1** Altmetric | [Metrics](#)

Abstract

Campylobacter spp. have been associated with anthropometric Z-score decrements, but the role of specific virulence genes associated with these outcomes has not been explored. This study aimed to investigate whether specific *Campylobacter jejuni* virulence-related gene and immune-inflammatory biomarkers are associated with malnutrition in children from



Intestinal cell migration damage induced by enteropathogenic *Escherichia coli* strains

P.A. Cavalcante, M.M.G. Prata, P.H.Q.S. Medeiros, A.V. Alves da Silva, J.S. Quetz, M.A.V. Reyes, T.S. Rodrigues, A.K.S. Santos, S.A. Ribeiro, H.N. Veras, M.D. Bona, M.S.M.G. Amaral, F.A.P. Rodrigues, I.F.N. Lima, A. Havt and A.A.M. Lima

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Instituto de Biomedicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

Abstract

Epithelial cell migration is an essential response to enteric pathogens such as enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). This study aimed to investigate the effects of EPEC infection on intestinal epithelial cell migration *in vitro*, as well as the involvement of type III secretion system (T3SS) and Rho GTPases. Crypt intestinal epithelial cells (IEC-6) were infected with EPEC strains (E2348/69, Δ escF, and the LDI001 strain isolated from a malnourished Brazilian child) and commensal *E. coli* HS. Wound migration and cell death assays were performed at different time-points. Transcription and expression of Rho GTPases were evaluated using real-time PCR and western blotting. Overall, EPEC E2348/69 reduced migration and increased apoptosis and necrosis levels compared to EPEC LDI001 and *E. coli* HS strains. Moreover, EPEC LDI001 impaired cell migration at a higher

Impact of acute undernutrition on growth, ileal morphology and nutrient transport in a murine model

I.C. Sampaio¹, P.H.Q.S. Medeiros¹, F.A.P. Rodrigues¹, P.A. Cavalcante¹, S.A. Ribeiro¹, J.S. Oliveira¹, M.M.G. Prata¹, D.V.S. Costa¹, S.G.C. Fonseca², M.M. Guedes¹, A.M. Soares¹, G.A.C. Brito¹, A. Havt¹, S.R. Moore^{3*} and A.A.M. Lima¹

¹Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Instituto de Biomedicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

²Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

³Division of Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA

Abstract

Undernutrition represents a major public health challenge for middle- and low-income countries. This study aimed to evaluate whether a multid deficient Northeast Brazil regional basic diet (RBD) induces acute morphological and functional changes in the ileum of mice. Swiss mice (~25 g) were allocated into two groups: i) control mice were fed a standard diet and ii) undernourished mice were fed the RBD. After 7 days, mice were killed and the ileum collected for evaluation of electrophysiological parameters (Ussing chambers), transcription (RT-qPCR) and protein expression (western blotting) of intestinal transporters and tight junctions. Body weight gain was significantly decreased in the undernourished group, which also showed decreased crypt depth but no alterations in villus height. Electrophysiology measurements showed a reduced basal short circuit current (I_{sc}) in the undernourished group, with no differences in transepithelial resistance. Specific substrate-evoked I_{sc} related to affinity and efficacy (glutamine and alanyl-glutamine) were not different between groups, except for the maximum I_{sc} (efficacy) induced by glucose. Transcription of *Sgt1* and *Pept1* was significantly higher in the undernourished group, while *SN-2* transcription was decreased. No changes were found in transcription of CAT-1 and CFTR, while claudin-2 and occludin transcriptions were significantly increased in the undernourished group. Despite mRNA changes, SGLT-1, PEPT-1, claudin-2 and occludin protein expression showed no difference between groups. These results demonstrate early effects of the RBD on mice, which include reduced body weight and crypt depth in the absence of significant alterations to villus morphology, intestinal transporters and tight junction expression.

Key words: Undernutrition; Ion transport; Intestinal absorption

Introduction