



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

ISABELLA PATRÍCIA LIMA SILVA

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES DIETAS PROTEICAS EM UM
MODELO EXPERIMENTAL COM INFECÇÃO CAUSADA POR
SALMONELLA TYPHIMURIUM**

Recife, 2016

ISABELLA PATRÍCIA LIMA SILVA

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES DIETAS PROTEICAS EM UM
MODELO EXPERIMENTAL COM INFECÇÃO CAUSADA POR
SALMONELLA TYPHIMURIUM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

ORIENTADOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

Patologia

LINHA DE PESQUISA

Viabilidade de processos biotecnológicos e/ou situações dietéticas no estudo de processos infecciosos e parasitários

Recife, 2016

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586i Silva, Isabella Patrícia Lima.
Influência de diferentes dietas proteicas em um modelo experimental
com infecção causada por *Salmonella* Typhimurium / Isabella Patrícia
Lima Silva. – 2016.
70 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Nicodemos Teles de Pontes Filho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Dietas. 2. Inflamação. 3. Camarão. 4. Porco. 5. Fígado gorduroso.
I. Pontes Filho, Nicodemos Teles de (Orientador). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-103)

**DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
PATOLOGIA**

AUTORA: ISABELLA PATRÍCIA LIMA SILVA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

**NOME DA DISSERTAÇÃO: “INFLUÊNCIA DE DIFERENTES DIETAS
PROTEICAS EM UM MODELO EXPERIMENTAL COM INFECÇÃO CAUSADA
POR *SALMONELLA* TYPHIMURIUM”.**

ORIENTADOR: PROF. DR. NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO

DATA DA DEFESA E APROVAÇÃO: 17 DE FEVEREIRO DE 2016.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Prof^a. Dr^a. Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes

Prof^a. Dr^a. Carina Scanoni Maia

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Profa. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof^a. Dra. Adriana Teles de Pontes Filho

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EMPATOLOGIA**

Profa. Dra. Manuela Figueroa Lyra de Freitas

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PATOLOGIA**

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão

ORIENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

RECIFE
2016

Aos meus Pais por serem
o meu Porto Seguro!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me iluminar e permitir a conclusão de mais esta etapa em minha vida;

À minha família base de tudo e meu porto seguro, meu pai Mario Patrício, minha mãe Inês Pereira e minha irmã Marília Patrícia, sem os quais não teria conseguido chegar até aqui;

A Universidade Federal de Pernambuco por fazer parte da minha vida e a todos os professores da graduação que incentivaram e me ajudaram no meu crescimento profissional.

Ao meu namorado em especial, Carlos Eduardo Gadelha, por todo seu amor, carinho, paciência e companheirismo e por ser o meu refúgio nos momentos difíceis.

A minha sogra Edna Maria e sogro Jayme Andrade, por todo amor e dedicação a mim concedidos;

Ao meu admirável orientador Prof. Dr. Nicodemos Teles Pontes Filho, por sua paciência, sua disponibilidade, dedicação, amizade e contribuição com seu exemplo docente, o qual me inspira a prosseguir no caminho da docência, Muito Obrigada!

A Profª Drª Débora Nepomuceno e Ana França, pela dedicação, amizade, paciência, pois sem elas não teria conseguido meus animais e nem produzido a ração para o meu experimento.

A Profª Carina Scanoni, que em muito me auxiliou com meus resultados e com isso permitiu que parte desse projeto se realizasse.

Ao Prof. Dr. José Vitor M. Lima Filho e a todas as meninas do laboratório (LAMIM/UFRPE), Jacqueline e Taciana, por terem cedido o laboratório e ter me ajudado na realização da infecção dos animais. Foi trabalhoso, mas conseguimos!

Aos coordenadores deste programa por seu incentivo, a Profª. Drª. Manuela Figueroa e Prof. Dr. Mario Ribeiro;

À secretária Margarete Valdivino por sua solicitude;

A todo o pessoal da secretaria da Pós Graduação e funcionários do departamento de Patologia por todo auxílio prestado;

A todos os professores do Programa pelos conhecimentos compartilhados;

A técnica Silvana, por toda atenção e pela grande ajuda na confecção do meu trabalho;

Aos pesquisadores do Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/ UFPE), em especial Drª. Maria Helena e o técnico Felipe que me ajudaram bastante com os cuidados com meus ratos.

A amiga, Libânia Ribeiro, que teve grande participação na realização desse trabalho. Agradeço a preocupação e incentivo, sem sua ajuda seria bem mais difícil.

Aos amigos da minha turma do mestrado: Tamires, Cleidiane, Libânia, Leonilda, Giwellignton, Dafne, Filipe que me ajudaram nesses dois anos e torceram pela conclusão desse projeto.

Aos amigos e familiares de perto e de longe que me incentivaram a não desistir e que contribuíram para conclusão deste trabalho.

Aos professores participantes da banca, por contribuírem para a melhoria desse trabalho.

A CAPES pelo suporte financeiro.

Muito Obrigada a Todos!

Isabella Patrícia

Sem sonhos, as pedras se
tornam insuportáveis,
as pedras do caminho se tornam montanhas,
o fracasso se transforma em golpes fatais.
Mas, se você tiver Grandes Sonhos...
Seus erros produzirão crescimento,
seus desafios produzirão oportunidades,
seus medos produzirão coragem.
Por isso,
“NUNCA DESISTA DE SEUS SONHOS.”

(Augusto Cury)

RESUMO

Várias culturas tratam alguns alimentos como remosos, pois em determinados estados fisiológicos ou patológicos do organismo, aparentemente eles são capazes de estimular uma maior proliferação de células de defesa, o que pode levar a uma exacerbação do processo inflamatório, e consequentemente danos teciduais, ou até mesmo interferindo diretamente na recuperação clínica no pós-operatório. Entre esses alimentos temos a carne suína e o camarão. Nesse contexto o presente trabalho visa avaliar dietas a base de camarão, carne suína e caseína sobre a histofisiologia do fígado a partir de um modelo de infecção experimental induzido pela *Salmonella entérica serovar Typhimurium*. Para tal foram utilizados 55 ratos machos Wistar, em dois grupos: grupo nutricional controle (dieta Presence, carne suína, camarão e caseína) e o grupo nutricional infectado por *Salmonella Typhimurium* que ficaram em observação durante 6 e 48 horas após a infecção. Cada animal recebeu diariamente sua dieta correspondente durante 30 dias. Após 30 dias de dietas, os animais foram eutanasiados e em seguida, foi retirado o fígado para realização do estudo histopatológico. Os resultados obtidos mostraram que o grupo nutricional tratado com a dieta de caseína, foi observada a presença de uma quantidade razoável de gordura, caracterizando esteatose moderada, sem presença de células inflamatórias, e os animais tratados com a dieta de camarão e a dieta suína, foi observado esteatose hepática dos tipos micro e macrovesicular sem presença de células inflamatórias. No grupo nutricional infectado foi observado a presença de infiltrado de células mononucleares, como macrófagos, linfócitos e de polimorfonucleares como os neutrófilos, nos grupo de 6h apresentaram pouco infiltrado de células mononucleares no espaço periportal e nos grupos com 48h, o infiltrado de células mononucleares, apresentou-se mais difuso e intenso. De acordo com a contagem de células mononucleares nas regiões periportais verificou-se que o grupo PRESi-6h/ PRESEi-48h apresentou média menor do que os demais grupos (média = 12,4 para 6 h e média = 35,4 para 48 h) e o grupo com maior média de células inflamatórias, às 6 e 48 horas após a infecção, foi o do grupo SUIi (média = 83,8 e média = 145,0 respectivamente). O trabalho mostrou que nos grupos tratados com diferentes dietas protéicas hipercalóricas foram capazes de causar danos ao tecido hepático (esteatose) favorecendo um processo inflamatório no local.

Palavras-chave: Dietas. Inflamação. Camarão. Porco. Fígado Gorduroso.

ABSTRACT

Various cultures treat some foods such as remosos because in certain physiological and pathological states of the organism, they apparently are capable of stimulating an increased greater proliferation of immune cells, which can lead to exacerbation of the inflammatory process, and thus tissue damage, or even directly interfering with clinical recovery in the postoperative period. Among these foods we have pork and shrimp. In this context, the present study aims to evaluate diets shrimp base, pork and casein on histophysiology liver from an experimental infection model induced by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. To this end they were used 55 male Wistar rats in two groups: control group nutritional (dietary Presence, pork, shrimp and casein) and nutritional infected with *Salmonella* Typhimurium group that remained under observation for 6 and 48 hours after infection. Each animal received daily its corresponding diet for 30 days. After 30 days of diet, the animals were euthanized and then the liver was removed for histopathology embodiment. The results showed that the nutritional group treated with the casein diet, the presence of a reasonable amount of fat was observed, characterizing mild steatosis without the presence of inflammatory cells, and animals treated with shrimp diet and swine diet hepatic steatosis was observed type of micro and macrovesicular no presence of inflammatory cells. In infected nutritional group was observed the presence of infiltrate of mononuclear cells, such as macrophages, lymphocytes and polymorphonuclear leukocytes such as neutrophils, 6h group showed little infiltration of mononuclear cells in the periportal area and in groups with 48h, the infiltration of mononuclear cells, presented is more diffuse and intense. According to the mononuclear cell count in the periportal regions it has been found that the group PRESI-6h / 48h-Presei had an average lower than the other groups (mean = 12.4 mean = 6 h 35.4 48 h) and the group with the highest average of inflammatory cells at 6 and 48 hours after infection, was the SUli group (mean = mean = 83.8 and 145.0 respectively). The study showed that in the groups treated with different Hypercaloric protein diets were able to cause damage to the liver tissue (steatosis) favoring an inflammatory process in place.

Keywords: Keywords: Diets. Inflammation. Shrimp. Pig. Fatty liver.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Arquitetura hepática: O lóbulo direito, lóbulo esquerdo, lóbulo quadrado e lóbulo caudado, veias porta (VP) e artérias hepáticas(AH).....	Pág.24
Figura 2- Fotomicrografia do fígado. Veia central (VC), presença de placas de hepatócitos limitando os espaços ocupados pelos capilares. Na foto da direita temos um espaço porta contendo ramo da artéria hepática, ramo da veia porta e ducto biliar.....	Pág.25
Figura 3 –Representação esquemática da histologia hepática gordura (regiões esbranquiçadas) empurrando o núcleo celular para periferia.....	Pág.25
Figura 4 - Representação esquemática da histologia hepática.....	Pág.26
Figura 5- Modelo de mecanismo da esteatose hepática.....	Pág.29
Figura 6 – Desenho esquemático das três vias de disseminação da Salmonella: via oral, intraperitoneal e venosa.....	Pág.32
Figura 7- Representação esquemática dos grupos experimentais de acordo com o esquema de dietas e infecção pela <i>Salmonella</i> Typhimurium após o período de desmame.....	Pág.39
Figura 8. Interface gráfica do software Mesurin ilustrando a fotomicrografia de células inflamatórias.....	Pág.41
 Artigo	
Figura 1 (A e B)- Fotomicrografia do fígado. Parênquima com hepatócitos de morfologia normal e espaço periportal sem alterações, representado por arteríola e dois ductos biliares.....	Pág. 61
Figura 2- Fotomicrografia do fígado. (A e B) Imagem do grupo Presence + infecção após 6 e 48 horas de infecção respectivamente. (A). Presença de um discreto infiltrado de células mononucleares no espaço periportal (B). Veia centrolobular com CMN.....	Pág.62
Figura 3- Fotomicrografia do fígado. (A e B) Imagem do tecido hepático do grupo Caseína, evidenciando a presença da uma quantidade moderada de gordura, sem presença de células inflamatórias.....	Pág.63
Figura 4- Fotomicrografia do fígado. (A). Imagem do grupo camarão e (B). Imagem	

do grupo Carne Suína, mostrando a presença caracterizando esteatose hepática do tipo microvesicular, sem presença de células inflamatórias.....Pág.63

Figura 5-Fotomicrografia do fígado. **(A e B).** Grupo caseína + infecção após 6 h de infecção. Observa-se presença de infiltrado mononuclear no espaço periportal **(C e D).** Grupo caseína + infecção após 48 h de infecção constata-se intenso infiltrado mononuclear no espaço periportal e esteatose dos tipos micro e macrovesicular.....Pág. 37

Figura 6-Fotomicrografia do fígado. **(A e B).** Grupo Camarão + infecção no tempo de 6 horas. Observa-se presença de infiltrado de CMN no espaço periportal e esteatose hepática dos tipos micro e macrovesicular. **(C e D).** Grupo Camarão + infecção no tempo de 48 horas. Observa-se presença de infiltrado de CMN mais difuso e intenso e esteatose hepática dos tipos micro e macrovesicular.....Pág.38

Figura 7- Fotomicrografia do fígado. **(A e B).** Grupo Carne Suína + infecção após 6h de infecção. Observa-se presença de infiltrado de CMN no espaço periportal e esteatose hepática dos tipos micro e macrovesicular **(C e D).** Grupo Carne Suína + infecção após 48h de infecção. Observa-se presença de infiltrado de CMN mais difuso e intenso e esteatose hepática dos tipos micro e macrovesicular.....Pág.39

LISTA DE TABELAS

Dissertação

Tabela 1- Composição centesimal das dietas usadas no experimento. Dieta carne suína, camarão e caseína(AIN-93).....Pág.20

Tabela 2- Composição de dietas semi-purificadas utilizados no experimento. Dieta controle caseína (CAS), dieta a base de camarão (CAM) e dieta a base De carne suína (SUI)..... Pág.20

Tabela 3-Composição dos nutrientes da dieta Presence® (Purina Brasil) utilizada na alimentação dos animais após o desmame.....Pág. 21

Artigo

Tabela 1. Composição centesimal das dietas usadas no experimento. Dieta carne suína, camarão e caseína (AIN-93).....Pág.31

Tabela 2. Composição de dietas semi-purificadas utilizados no experimento. Dieta padrão caseína (CAS), farinha base de camarão (CAM) e farinha a base de carne suína (SUI).....Pág.32

Tabela 3. Média e desvio padrão do número de células inflamatórias mononucleares (CNM)Pág.40

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

AG: Ácidos Graxos

APIA: Ausência de processo inflamatório agudo

BHI: Meio de cultura com infusão de coração-cérebro

CAS: Caseína

CAM: Camarão

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CMN: Células mononucleares

DHGNA: doença hepática gordurosa não alcoólica

EH: Esteatose Hepática

HE: Hematoxilina-Eosina

GALT: Tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal

IICP: Infiltrado Inflamatório crônico do parênquima

IL: Interleucina

LPPs: Lipoproteínas Plasmáticas

LABCEN: Laboratório Central

LEEAL: Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição

LPS: Resíduos de manose e ácidosteicoicos

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

PAMP: Padrões Moleculares Associados à Patógenos

PRES: Presence

RI: Resistência Insulínica

ROS: Oxigênio

SUI: Suína

NO: Óxido nítrico

TACO: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 ATUAÇÃO DE DIETAS PROTÉICAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	18
2.2 DIETAS GORDUROSAS NA INFLAMAÇÃO.....	19
2.3 MECANISMOS INFLAMATÓRIOS.....	20
2.3 HISTOFISIOLOGIA DO FÍGADO.....	21
3 JUSTIFICATIVA.....	33
4 OBJETIVOS.....	34
4.1 GERAL.....	34
4.2 ESPECÍFICOS.....	34
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
5.1 Tipo do estudo.....	35
5.2 Local do estudo.....	35
5.4 Preparo das Dietas.....	35
5.5.5 Método de coleta.....	40
5.7 Análises Estatísticas.....	42
5.8 Questões Éticas.....	42
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
APÊNDICE-ARTIG ORIGINAL.....	54
ANEXOS.....	72

1. INTRODUÇÃO

Segundo a cultura popular, alguns alimentos são denominados remosos, ou seja, impróprios para o consumo humano, em determinados estados fisiológicos (durante o período menstrual) ou patológicos do organismo (infecções, inflamações e ferimentos), por terem a capacidade de interferir nos processos de cicatrização, causar danos teciduais ou provocar exacerbação do processo inflamatório agudo (COSTA-NETO, 2000; CUNNINGHAM-RUNDLES; MCNEELEY; MOON, 2005; ALCOFORADO, 2012; BRITO-JUNIOR e ESTÁCIO, 2013).

Foi sugerido por Rock e colaboradores (2010), que após a digestão de alimentos ricos em proteínas, como o camarão e carne suína, podem ocorrer uma sobrecarga de proteínas e gorduras, que são capazes de ativar uma resposta inflamatória, caracterizada pela infiltração de células imunológicas, (macrófagos, neutrófilos) e produção de citocinas e quimiocinas. Porém, a interação do sistema imunológico com proteínas presentes nas dietas é bastante complexa e de difícil entendimento.

Existem algumas doenças de origem alimentar podendo ser de natureza infecciosa e tóxica, como infecções bacterianas, causadas pela *Salmonella* entéricas sendo as principais causadoras de gastroenterites e infecções sistêmicas, provenientes de alimentos contaminados, geralmente de origem animal, como carnes e ovos (BUGAREL et al., 2011).

A principal espécie de salmonela responsável por causar condições patológicas como a febre tifóide é chamada de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium, afetando mais de 20 milhões de pessoas em todo o mundo e leva a cerca de 200.000 mortes por ano (MASTROENI; MASKELL, 2006; CDC, 2005).

Essas espécies Gram-negativas possuem mecanismos que as permitem sobreviver dentro de macrófagos após a fagocitose, ativando seus mecanismos de virulência, e permitindo sua replicação no ambiente intracelular. Esses mecanismos facilita a sua disseminação para outros órgãos do sistema reticulo-endotelial (fígado, baço e medula óssea), causando uma resposta inflamatória, em todos os locais onde existe a sua proliferação (HENRY et al., 1998; ATHENS, 1998).

Existem ainda outros tipos de doenças que podem ter como causa alimentos gordurosos, como por exemplo, a esteatose hepática não alcoólica ou doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), que tem origem de dietas hipercalóricas ricas em gorduras saturadas que são desfavoráveis ao processo inflamatório, e se for usada de forma

crônica, podem alterar a histofisiologia do fígado, é nele que os nutrientes são absorvidos processados e armazenados.

Histologicamente, o fígado é formado por um conjunto de células agrupadas que são chamadas de hepatócito possuem diversas funções (endócrinas e exócrinas), detoxifica e transporta algumas substâncias, sintetiza proteínas próprias (albumina, protrombina, fibrinogênio, lipoproteínas) e também acumula substâncias como o glicogênio e até lipídeos dependendo do estado nutricional do indivíduo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; MOBLEY et al., 2014; MICHAEL et al., 2015).

Então a DHGNA é caracterizada pelo acúmulo de gordura que empurra o núcleo da célula para periferia, que pode levar a uma inflamação no tecido hepático, não estando relacionadas ao consumo de álcool e sim a um excesso de gordura provida da dieta (LUDWING et al., 1980; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Em virtude da escassez literária e comprovação dos efeitos de alimentos remosos no organismo debilitado, torna-se relevante uma avaliação dos efeitos histopatológicos no fígado, quando se adquirir um quadro infeccioso.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ATUAÇÃO DE DIETAS PROTÉICAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

As proteínas são componentes importantes da dieta e desempenham um papel essencial como elementos estruturais e funcionais dos sistemas vivos, sendo seu papel através da alimentação fornecer aminoácidos necessários para as atividades orgânicas (BORSOI, 2004; MILLWARD et al., 2008). Essas proteínas adquiridas na dieta, também são capazes de interagir com as células de defesa, modulando vários parâmetros da função imunológica (FIELD; JOHSON; SCHLEY, 2002), porém essa interação com sistema imune é bastante complexa e ainda de difícil entendimento. Alguns estudos sugerem que os macronutrientes provenientes da dieta, tais como as proteínas, podem ser responsáveis por um estresse oxidativo nas células, estimulando uma maior produção de substâncias pró-inflamatórias, modificando assim os níveis de marcadores inflamatórios (GERALDO, 2008).

Esses tabus alimentares estão relacionados aos alimentos “remosos”, que são capazes de agravar estados patológicos, prejudicando a recuperação clínica do paciente em função da presença de substâncias tóxicas nos alimentos ingeridos. Entre esses alimentos estão a carne de porco, caranguejo, camarão e outros (COSTA-NETO, 2000; BEGOSSI, 2004; SILVA, 2007).

Segundo a cultura popular esses alimentos podem interferir nos processos de cicatrização, causar danos teciduais ou provocar exacerbação do processo inflamatório agudo. Portanto a suspensão da ingestão dos mesmos pode ser adotada como medida para favorecer a recuperação durante após operatório. Desta forma, pode-se postular que a ação dos alimentos “remosos” sobre o organismo, na ativação de mecanismos, que levam ao dano tecidual, pela estimulação de células inflamatórias, que estariam diretamente associadas à ativação da imunidade inata, que é desencadeada por meio dos Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs), como resíduos de manose e ácidosteicoicos (LPS), presentes na superfície de micro-organismos, que não foram destruídos após o cozimento dos alimentos (RAEBURN et al., 2002; CRUVINEL et al., 2010; BRITO-JUNIOR e ESTACIO, 2013).

2.2 DIETAS GORDUROSAS NA INFLAMAÇÃO

Dietas com alto teor de gordura saturada, carboidratos estão associadas ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas como diabetes, doenças cardio vasculares,

sendo capazes de estimular resposta inflamatória (HEIDEMANN et al., 2008; NETTLETON et al., 2008).

De acordo com estudos já foi comprovado que um padrão alimentar rico em carnes vermelhas e processadas, doces, batata frita e outras ricas em gorduras aumentam o risco de desenvolvimentos de síndromes metabólicas (diabetes, doença hepática gordurosa não alcoólica-DHGA), onde apresentam um perfil inflamatório, pois o excesso de alimentos gordurosos é capaz de causar um estresse oxidativo das células estimulando mediadores inflamatórios (FUNG et al., 2004; FONTANA et al., 2004).

Uma carga alimentar contendo mais de 75g de glicose e lipídeos, segundo o estudo realizado por Ceriello e colaboradores, (2004) demonstrou que esses tipos de alimentos aumentam os níveis plasmáticos de nitrotirosina (marcador de estresse oxidativo).

Esse processo inflamatório pode ser induzido por esse estresse celular que ocorre função do excesso de calorias presentes nos alimentos gordurosos, em pessoas obesas, o estresse celular principalmente no retículo endoplasmático que é uma organela que tem papel na síntese de proteínas, lipídeos e esteróides, gerando uma resposta inflamatória por diversos mecanismos que ativam a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias e transcrição de fatores que induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (LAI et al., 2008; BODEN, 2009).

O fígado é um dos órgãos diretamente afetado por esse estresse oxidativo do retículo endoplasmático, onde a ingestão crônica de gorduras causa um aumento da oferta de ácidos graxos no tecido adiposo, aumento da síntese de novo aminoácido, aumento da gordura da dieta, diminuição da β -oxidação mitocondrial, diminuição da exportação de partículas de triglicerídeo, causando um acúmulo de lipídeo anormal no tecido hepático podendo induzir quadros inflamatórios no local (MUSO et al., 2003; ADAMS et al., 2010). Esta resposta inflamatória ocorre principalmente através da ação de macrófagos que liberam citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6) e podem levar a cronificação desse estado (SCHENK, 2008).

2.3 MECANISMOS INFLAMATÓRIOS

A inflamação é a resposta dos tecidos a uma agressão provocada por agentes patogênicos, produtos químicos ou ferimento, que envolve uma rede complexa de reações com a finalidade de remover o estímulo lesivo e iniciando a recuperação tecidual local. Durante a inflamação ocorrem a ativação e migração de células como leucócitos para o local

da lesão e a liberação de várias substâncias solúveis como fatores de crescimento, citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), onde exercem sua ação e são degradadas no sítio inflamatório (PÉREZ-CANO et al., 2010).

Na inflamação aguda, as principais células envolvidas são os neutrófilos e os macrófagos, porém, uma vez cessado o estímulo lesivo, inicia-se o processo de reparo tecidual completo, caracterizando o término da resposta aguda. Caso ocorra a permanência do agente lesivo, ocorre a cronificação do processo inflamatório, sendo observada concomitância de destruição e reparo tecidual. Na inflamação crônica o tecido apresenta caracteristicamente um infiltrado constituído por células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), sinais de angiogênese e fibrose (ABBAS; LICHIMAN, 2005; CRUVINEL et al., 2010). Nesses processos, ocorre a produção de mediadores inflamatórios, que são responsáveis pela atração de células inflamatórias e também pela liberação de citocinas e recrutamento de leucócitos para o local da injúria (ALLER et al., 2006).

Citocinas ou mediadores inflamatórios podem ser ativados através do próprio contato com os patógenos, por substâncias tóxicas ou por células danificadas (em caso de traumas e esforço físico exagerado). Eles são variados, e derivam tanto de componentes plasmáticos, quanto de células, incluindo produtos de clivagem de precursores, produtos de cascatas de ativação, como substâncias pré-formadas, espécies reativas de oxigênio (radicais livres), óxido nítricos e derivados do ácido araquidônico. Células como linfócitos, macrófagos ativados, o endotélio, epitélio e tecido conjuntivo, também produzem polipeptídeos ou glicoproteínas que modulam a função de outros tipos celulares, conhecidas como citocinas (KUMAR et al., 2005; ALWANI et al., 2006).

As citocinas são mediadores necessários para produzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, sendo responsáveis pela movimentação dos leucócitos, incluindo sua migração para locais de inflamação tecidual a partir do sangue. Elas são substâncias protéicas produzidas por linfócitos que atuam nas fases efetoras tanto na resposta inata quanto na resposta adaptativa que podem induzir resposta pro - inflamatória como anti-inflamatória em um determinado tecido isso dependendo do tipo de estimulação causada pelos diferentes tipos de microorganismos (ABBAS; LICHIMAN, 2005; LIN; CALVANO; LOWRY, 2000; TRCEY; LOWRY, 1990).

Os receptores de citocinas são expressos em leucócitos, células dendríticas e células de Langerhans, na qual a maior variedade desses receptores é observada em linfócitos T e sua expressão pode definir seus subtipos de linfócitos T. A ligação entre citocinas e receptores

inicia uma complexa cascata de sinalização que gera respostas quimiotáticas, liberação de espécies reativas e alteração na afinidade das integrinas presentes na superfície celular.

As citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência de células imunológicas, regulando também a produção e a atividade de outras citocinas, que favorecer a resposta inflamatória.

Algumas citocinas podem ter ações pro-inflamatórias (Th1), como as interleucinas, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 e FNT (fator de necrose tumoral) e outras anti-inflamatórias como as IL-4, IL-10, IL-13 e FGF β (fator transformador de crescimento β) (CURFS; MEIS; HOOBKAMP-KORSTANJE, 1997; RAEBURN et al., 2002; SOMMER et al., 2010).

O fígado por ser um órgão muito vascularizado é altamente povoado por diversas células do sistema imune durante processos infecciosos e inflamatórios. Tais células podem lesar o órgão no contexto da resposta imune, mesmo não sendo ele o alvo da agressão inicial. Dessa forma o fígado constitui um importante sítio de regulação do sistema imune o que, de certa forma o torna mais susceptível e vulnerável à resposta imune, como em processos sépticos (SHINONI, 2006).

2.4 HISTOFISIOLOGIA DO FÍGADO

O fígado é a maior víscera do corpo humano, desempenhando grande número de funções vitais à saúde do organismo, estar envolvido diretamente no metabolismo de substância sendo considerado o centro de desintoxicação. Sua principal função inclui o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, formação da bile e ativação de vitaminas e minerais, conversão de amônia em ureia. Uma disfunção pode levar a quadros irreversíveis no tecido (JAMES, 2000; WINITA; FREDERICK, 2003; MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2010; GUYTON; HALL, 2011).

O órgão referido representa 2,5 a 4,5% da massa corporal humana com um peso médio de 1,5kg. Está estrategicamente situado no sistema circulatório recebendo um suprimento sanguíneo duplo: cerca de 20% do seu fluxo é rico em oxigênio e provém da artéria hepática, enquanto o restante 80% é rico em nutrientes e provém da veia porta, permitindo ao fígado controlar as substâncias que são absorvidas em todo o intestino e determinar quais delas vão entrar, na circulação sistêmica (MAZZA; PERREIRA; WAITZBERG, 2005).

O fígado também é o órgão mais importante para a gliconeogênese, ou seja, produção de glicose pela conversão de aminoácidos, lipídios ou carboidratos regulados por hormônios. Os hepatócitos também sintetizam e secretam lipoproteínas de densidade muito baixa que são

convertidas em outras lipoproteínas séricas, elas são a principal fonte de colesterol e carboidratos para diversos tecidos do corpo, além disso, eles também possuem a função digestiva, secretam a bile, regulam o metabolismo lipídico e protéico, armazenam substâncias e atuam na excreção de hormônios através de receptores para glucagon, fatores de crescimento e metabolização de esteróides (SHINONI, 2006).

No metabolismo lipídico os ácidos graxos providos da dieta são convertidos em acetil-coenzima (Acetil-CoA), que são importantes para produzir ATP (energia), nos hepatócitos também ocorre à síntese de proteínas como a albumina, protrombina, fibrinogênio, transferrina, ceruloplasmina ou que participa da hidrólise de triglicerídeos, fosfolipídios, colesterol, lipoproteínas plasmáticas (LPPs) (LIBER, 2003; BASSO, 2007). Uma função importante dos hepatócitos é a conversão de aminoácidos em glicose através da gliconeogênese desta maneira ele contribui para manter a glicemia estável (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO 2013).

Os hepatócitos também sintetizam componentes do complemento e proteínas reagentes de fase aguda, além das funções de síntese, o fígado também tem uma grande população de células residentes com importantes funções imunológicas, como as células de Kupffer e macrófagos que representam 80-90% do total de células do sistema nuclear fagocítico.

A principal função das células de Kupffer é remover, por fagocitose, corpos estranhos, materiais particulados, como também a captação e a detoxicação de endotoxina. O fígado, por ser um órgão altamente vascularizado, é povoado por diversas células imunes durante processos infecciosos e inflamatórios sistêmicos. Tais células podem lesar o órgão no contexto da resposta imune, mesmo não sendo ele o alvo da agressão inicial. Dessa forma, o fígado constitui um importante sítio de regulação do sistema imune o que, tornando mais susceptível e vulnerável à resposta imune, como em processos sépticos (SHINONI, 2006).

Histologicamente esse órgão é subdividido em quatro lóbulos (Figura 1), com as áreas portais na periferia e as veias centrais no centro de cada lóbulo. Em animais (porco, ratos) é separado por fibras reticulares, que em humanos não é visível devido à escassez de tecido conjuntivo e da disposição muito próxima dos lóbulos sendo, portanto difícil estabelecer um limite entre cada lóbulo. Nas regiões periféricas encontram-se os ductos biliares, vasos linfáticos, nervos e vasos sanguíneos com os espaços porta, no homem possuem aproximadamente de três a seis espaços porta por lóbulo (Figura 2) (JUNQUEIRA; CARNEIRO 2013).

Externamente o fígado é revestido por cápsula de tecido conjuntivo que fica mais espessa no hilo, local onde a veia porta e a artéria hepática penetram, e também os três lóbulos entrem em contato uns com os outros com as áreas portais na periferia e as veias no centro de cada lóbulo. Seu parênquima é majoritariamente constituído por cordões de hepatócitos e células de Kupffer (macrófagos) (JUNQUEIRA; CARNEIRO 2013).

O parênquima hepático possui dois tipos de células, a células de Kupffer (macrófagos) e os hepatócitos, entre os cordões de hepatócitos estão os sinusóides vasculares revestidos por células endoteliais fenestradas e descontínuas que demarcam o espaço de Disse que contem microvilos que fica em contato direto com o sangue arterial e venoso portal permitindo uma troca de moléculas entre o lúmen sinusoidal e os hepatócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO 2013).

O sinusóide é circundado e sustentado por uma bainha de fibras reticulares e neles são encontradas as células de Kupffer (abrange 15% do tecido hepático), que são células endoteliais que possuem macrófagos em sua superfície com função de digerir hemácias velhas e secretar proteínas imunológicas para destruir bactérias que entrem pela circulação sanguínea. Cada hepatócitos está em contato com a parede do capilar sinusóide através do espaço Disse os hepatócitos também delimitam um espaço tubular com cerca de 1 a 2 micrômetro e diâmetro chamados de canalículo biliar eles formam uma rede complexa ao longo da placa dos lóbulos terminando no espaço porta onde a bile entra nos tubos biliares ou canais de Hering que são formados por células cubóide ou colunar e uma bainha de tecido conjuntivo que se fundem formando o ducto hepático que permitem a excreção de bile. Existem ainda nesse tecido outros tipos de células como as células de Ito ou estreladas, armazenam substâncias lipídicas que servem como estruturas de suporte (DINIZ, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO 2013) (Figura 3).

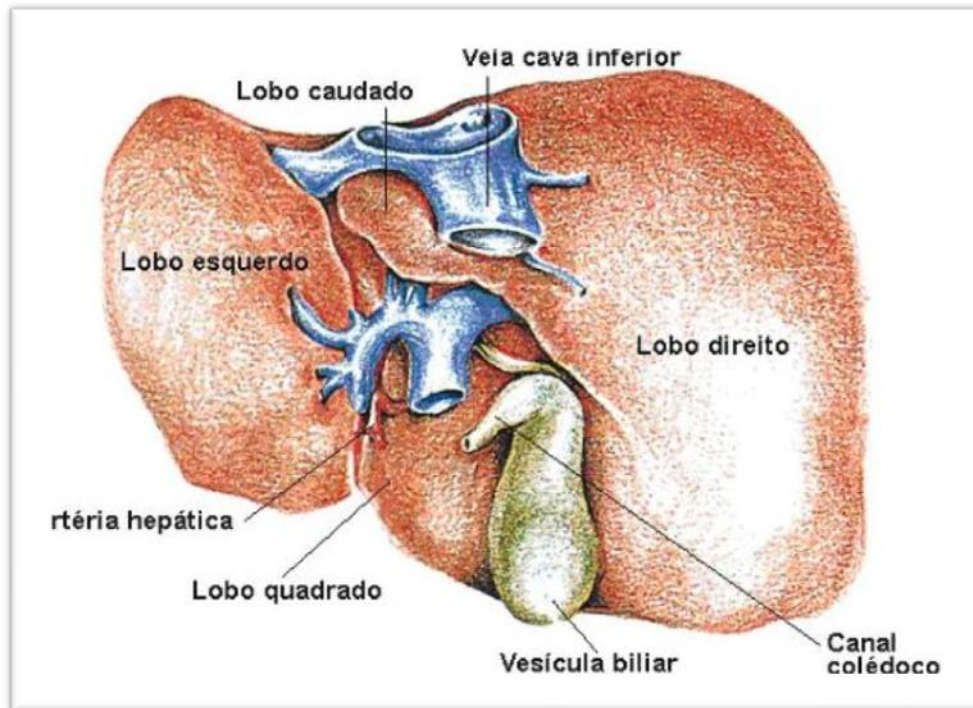


Figura 1 – Arquitetura hepática: O lóbulo direito, lóbulo esquerdo, lóbulo quadrado e lóbulo caudado, veias porta (VP) e artérias hepáticas (AH).
Fonte: <http://www.wikiwand.com/pt/F%C3%ADgado>

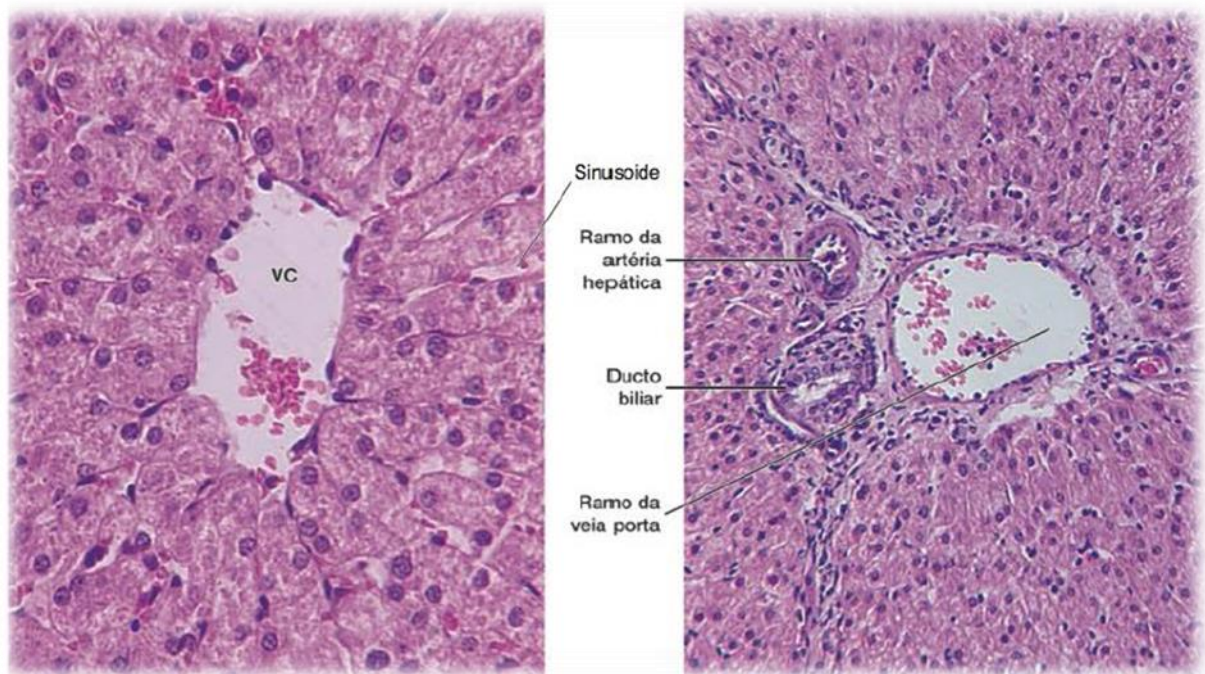


Figura 2- Fotomicrografia do fígado. Veia central (vc), presença de placas de hepatócitos limitando os espaços ocupados pelos capilares. Na foto da direita temos um espaço porta contendo ramo da artéria hepática, ramo da veia porta e ducto biliar. (Coloração HE). **Fonte:** (JUNQUEIRA; CARNEIRO 2013).

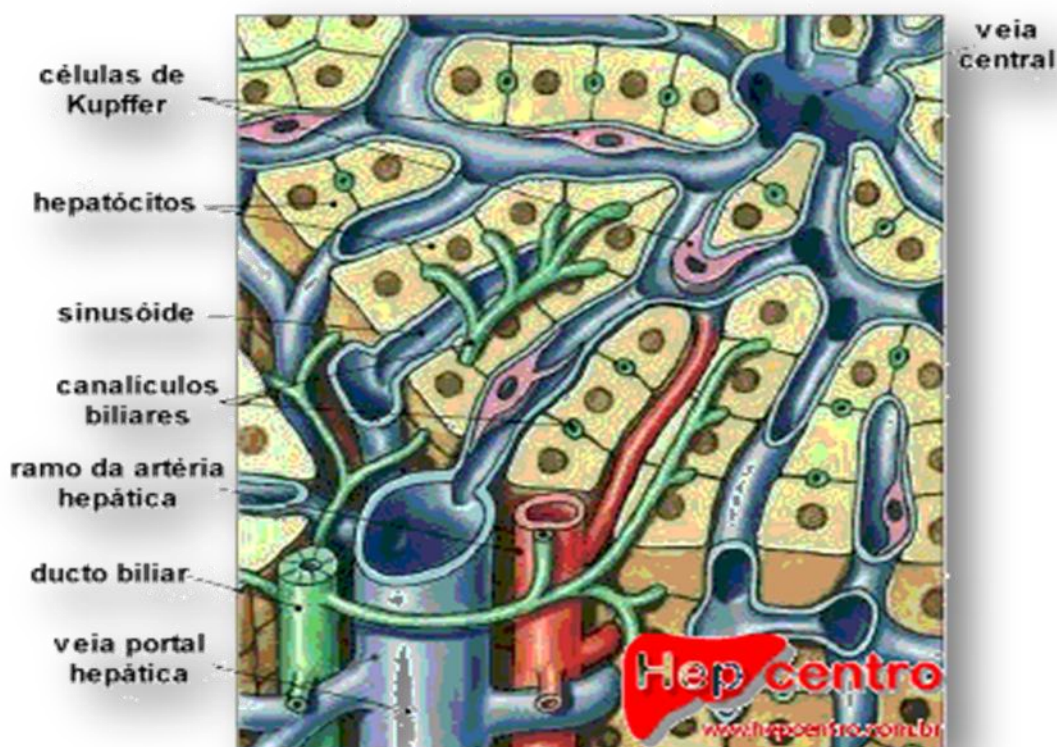


Figura 3 - Representação esquemática da histologia hepática.

Fonte: Hepatocentro- <http://www.hepcentro.com.br/histologia.htm>

2.4 ESTEATOSE HEPÁTICA CAUSADA POR DIETAS CALÓRICAS

A esteatose hepática é causada pelo acúmulo de lipídeo nas células parenquimatosas, como o triglicerídeo no citoplasma dos hepatócitos, excedendo 5% do peso do fígado, também é conhecido como lipidose hepática ou fígado gordo e ocorre quando a velocidade de acumulação de triglicerídeos dentro dos hepatócitos excede a velocidade de degradação metabólica dos triglicerídeos ou de sua liberação como lipoproteínas. Com a progressiva acumulação de lipídios, o fígado aumenta de tamanho e adquire uma coloração amarelada onde nos casos extremos, todo o fígado é afetado, e o órgão fica com uma textura extremamente gordurosa, levando a inflamação (GUYTON; HALL, 2011).

Microscopicamente, a esteatose hepática é caracterizada pela presença de grandes vacúolos/vesículas preenchidas por gordura empurrando o núcleo para periferia, chamada de esteatose macrovesicular. Há também esteatose microvesicular, formado por numerosos e pequenos vacúolos/vesículas citoplasmáticas onde o núcleo fica centralmente localizado (Figura 4) (TUÑÓN et al., 2011; ROSS; PAWLINA, 2012).

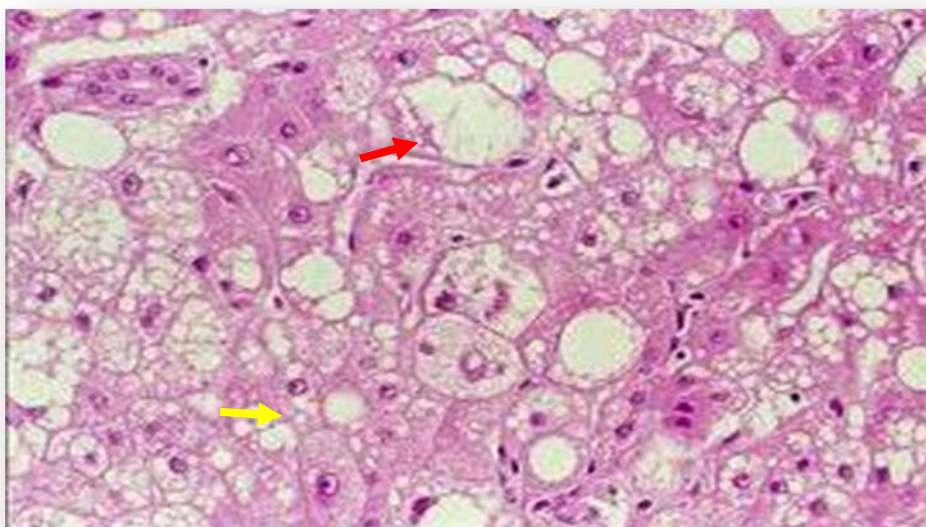


Figura 4- Esteatose macrovesicular (seta vermelha) e microvesicular (seta amarela). Presença de vacúolos com gordura (regiões esbranquiçadas), empurrando o núcleo celular para a periferia.

Fonte: www.hepatopernambuco.com.br

O acúmulo de lipídeos nos hepatócitos segundo alguns estudos está ligado diretamente a ingestão do álcool e também tem sido descrita como sendo uma alteração comum aos portadores da hepatite C crônica. Porém, o acúmulo de gordura pode ser causado também pela ingestão de alimentos hipercalóricos ricos em gordura saturada, levando a uma inflamação no fígado não relacionada ao álcool, sendo, portanto, chamada de esteatose hepática não alcoólica ou doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).

Esta última surge da disponibilidade e mobilização de ácidos graxos livres, da síntese hepática aumentada de ácidos graxos (AGL), da esterificação de AGL em triglicerídeos para fora do fígado, ocorrendo um desvio dos mecanismos de lipólise em favor a lipogênese (LUDWING et al., 1980).

Em diversas pesquisas foram encontradas alterações no tecido hepático são muito semelhantes às doenças hepáticas causadas pelo consumo etílico, porém na DHGNA foi detectado que a obesidade pode ocasionar danos ao fígado e que podem desencadear um processo inflamatório com possível evolução para fibrose (SCHAFFER; ADLER, 1979).

Atualmente a DHGN possui uma alta prevalência a nível mundial, as estimativas apontam que cerca de 20% aumentando para 75 a 92% (WILLIAMS et al., 2011). De acordos com estudos o estilo de vida já é considerado um fator significativo no desenvolvimento de esteatose, a inatividade física e hábitos alimentares pouco saudáveis, são fatores que estão

diretamente associados ao desenvolvimento da síndrome metabólica, favorecendo o aumento de peso.

Uma das consequências da obesidade é estimular quadros de inflamação na gordura visceral, aumentando assim o acúmulo de gordura no fígado, gerando um aumento expressivo de citocinas inflamatórias para o local da inflamação. (TARGHER et al., 2010).

Alguns dados demonstram que a prevalência de alterações hepáticas chegou a 90% dos casos em pacientes com obesidade mórbida, sendo que a prevalência não associada ao consumo de álcool (DHGN) aumentou de 16,4% em indivíduos eutróficos para 75,8% em pacientes obesos (PADOIN et al., 2008).

A DHGNA é considerada uma doença poligênica e multifatorial, na qual a associação de genes relacionados é exuberante e a participação do ambiente, relacionando a dieta gordurosa e ao sedentarismo, sua fisiopatogênese é bastante complexa e envolve múltiplos fatores, tendo a resistência insulínica, com condição inicial para o acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos.

O favorecimento a lipogênese e inibe a lipólise, até mesmo no fígado, aumentando excessivamente o aporte de ácidos graxos a esse órgão, seguida de uma sequência de eventos como o aumento do estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático, disfunção mitocondrial (MUSSO et al., 2003; YUNIANINGTIAS et al., 2006), portanto esse fígado esteatótico se tornaria vulnerável, levando à lesão hepatocelular, inflamação e fibrose.

A deposição excessiva de gordura no fígado pode decorrer do aumento da oferta de ácidos graxos do tecido adiposo, aumento da síntese de novo amino ácido, aumento da gordura da dieta, diminuição da β -oxidação mitocondrial, diminuição da exportação de partículas de triglicerídeo ou destes fatores em combinação (Figura 4).

Vários estudos sugerem que na DHGNA a função mitocondrial está diminuída, devido a alterações ultra-estruturares, que resultam em uma oxidação-fosforilação defeituosa e uma disfunção na cadeia respiratória gerando um aumento de espécies reativas de oxigênio, aumentando o estresse oxidativo hepático. Esse aumento pode causar peroxidação lipídica, cujos produtos intermediários são importantes agentes pró-inflamatórios e parecem ativar fibroblastos, favorecendo a fibrogênese levar ao processo de fibrose (KRAUCZYK; MAHAN; ADAMS et al., 2010).

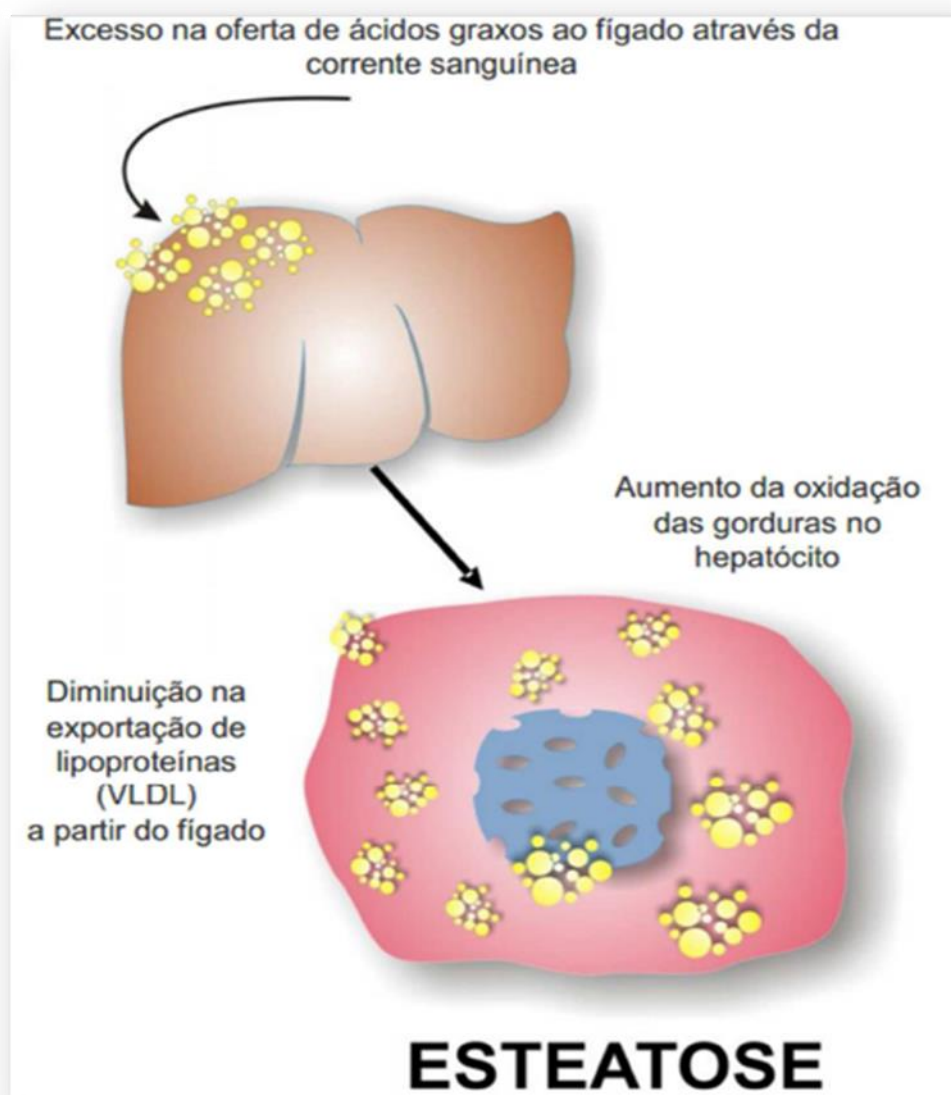


Figura 5- Modelo de mecanismo da esteatose hepática.
Fonte: (MELO, 2011).

2.5 MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL UTILIZANDO A *SALMONELLA* ENTÉRICA SOR. THYPHIMURIUM

A *Salmonella entérica* é uma espécie bacteriana flagelada, Gram-negativa, anaeróbia facultativa, e intracelular facultativa, não formadora de esporos, não são capazes de produzir exotoxinas (TORTORA et al., 2012). Pertencentes à família das Enterobacteriaceae, a *Salmonella entérica* serovar Typhimurium é uma das principais causadoras de doenças entéricas em humanos e animais onde seus isolados, também são responsáveis por causar condições patológicas como a febre tifóide, que afeta mais de 20 milhões de pessoas em todo

o mundo e leva a cerca de 200 milóbitos por ano (MASTROENI; MASKELL, 2006; CDC 2005; RICHTER; HOESEL; WARD, 2007).

Essa bactéria tem como porta de entrada para o corpo através do trato digestório, usualmente ela infecta o hospedeiro por via oral através da água e alimento de origem animais contaminados (aves, carne bovina, carne suína, ovos, frutos do mar) e se deposita no intestino onde invade os enterócitos (WRAY; SOJKA, 1997; MOURÃO et al., 2011). Em indivíduos saudáveis o número de bactéria pode ser reduzido no estomago por conta do suco gástrico, pois ele é letal, as que conseguirem chegar ao intestino possuem mecanismos de proteção contra as células de defesa local conseguindo se reproduzir e migrar para corrente sanguínea (LAHIRI et al., 2010).

Uma das síndromes causada por esses microrganismos são as gastroenterites através da intoxicação alimentar por uma grande ingestão de número de bactéria, que liberam uma quantidade de toxina capaz de provocar uma irritação local violenta das mucosas. Os sintomas (febre, dor abdominal, náuseas, vômitos, diarreia e anorexia) aparecem somente após o período de incubação da salmonela variando de 6 a 48 horas (OHL; MILLER, 2001; SAKUGAWA; SHINOHARA, et al., 2008; BUGAREL et al., 2011) determinando uma inflamação intestinal aguda em hospedeiros humanos e animais, pode persistir de 12 a 72 horas após a infecção. A dose infectante é de 10^5 a 10^8 microrganismos, variando de acordo com a virulência do sorotipo e a sensibilidade do indivíduo (CAFFER e TERRAGNO, 2001; HIDEUKI et al., 2002; DDTHA/CVE, 2005).

A *S. Typhimurium* é bastante utilizada como modelo experimental de infecções sistêmicas (RICHTER; HOESEL; WARD, 1997; PORTILLO, 2001), na qual induz uma síndrome semelhante à febre tifóide e, portanto, tornou-se uma ferramenta bastante importante no estudo da sepse, das doenças inflamatórias e para desenvolvimento de medicamentos e tratamentos experimentais dessas patologias (LIMA-FILHO; SPANHOL; OLIVEIRA, 2007).

Algumas espécies de *Salmonella* são classificadas como patógenos intracelulares facultativos, ou seja, são capazes de sobreviver dentro de leucócitos e macrófagos após a fagocitose, ativando seus mecanismos de virulência e permitindo sua replicação no ambiente intracelular, facilitando a sua disseminação para outros órgãos do sistema reticulo-endotelial (fígado, baço e medula óssea), através dos fagócitos infectados, levando à reação inflamatória em todos os locais onde existe a proliferação da bactéria (LIMA-FILHO et al., 2010).

Os sintomas sistêmicos acompanhados por uma resposta inflamatória sistêmica surgem por conta da liberação de pirógenos endógenos (interleucina 1) devido ao estímulo do

lipopolissacarídeo (LPS) presentes na parede bacteriana (WIEST e RATH, 2003; LIMA-FILHO et al., 2010). Quando o agente etiológico ingressa na corrente sanguínea determina uma infecção sistêmica. Em modelos animais de infecção via intraperitoneal, as bactérias são drenadas para os linfonodos mediastinais ocorrendo a disseminação via ducto torácico até grandes vasos como a veia cava e a veia porta chegando ao fígado, baço e outros órgãos, onde são capazes de se multiplicarem em macrófagos (BAUMLER; HARGIS; TSOLIS, 2000; ALENCAR et al., 2004; LIMA-FILHO et al., 2010).

No fígado determina lesões nos hepatócitos com aumento de volume do órgão e formação dos nódulos paratíficos (SATO et. al., 1997). A figura 6 mostra um esquema com três formas diferentes de infecção por *Salmonella*, infecção por via oral, intravenosa e intraperitoneal. Após a infecção, ela consegue se disseminar pelo corpo a partir do tecido linfóide associado ao intestino via ductos linfáticos eferentes e torácicos até alcançar a veia cava migrando para o fígado e no baço onde conseguem sobreviver e se proliferar (BAUMLER; HARGIS; TSOLIS, 2000).

Essas infecções sépticas causadas por bactérias Gram-negativas são geralmente acompanhadas por uma resposta inflamatória sistêmica, caracterizada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias devido ao estímulo do Lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede bacteriana (CAVAILLON et al., 2003).

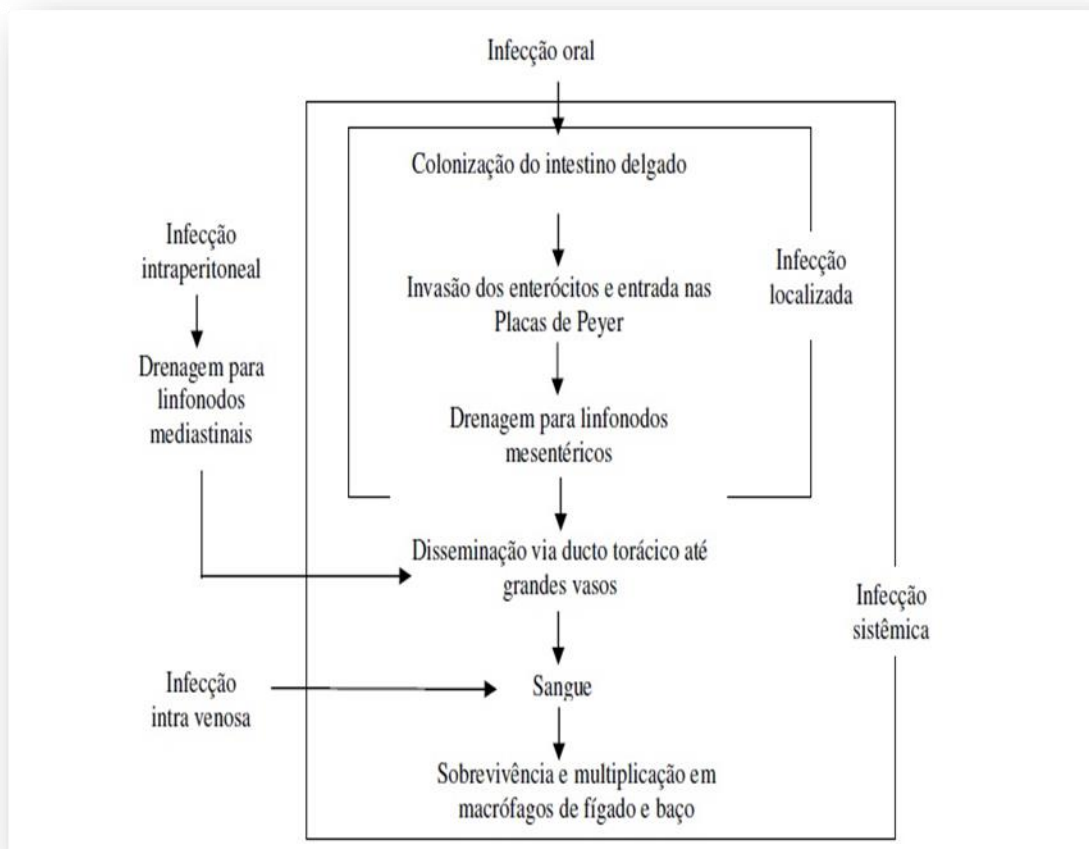


Figura 6 – Desenho esquemático das três vias de disseminação da *Salmonella*: via oral, intraperitoneal e venosa. **Fonte:** (BAUMLER; HARGIS; TSOLIS, 2000).

3 JUSTIFICATIVA

Em decorrência do tipo de proteína animal (carne suína e frutos do mar), alguns alimentos podem interferir no processo inflamatório quando há lesões no fígado, como por exemplo, esteatose hepática ou infecções bacterianas, porém, a literatura é bastante escassa quanto à relação entre a influência dos alimentos considerados remosos no processo saúde-doença. Diante de vários estudos que avaliaram atuação de dietas hipercalóricas, comprovaram que dietas ocidentais ricas em gordura saturada, na qual têm sido implicados no desenvolvimento de esteatose hepática onde essa lesão ao tecido hepático e levar a quadros de inflamação.

Desta forma, esse trabalho visa avaliar os efeitos histopatológicos no fígado causados pela atuação das dietas a base de carne suína, camarão e caseína em um modelo experimental de infecção induzido pela *Salmonella* Typhimurim.

4 OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a influência de diferentes dietas protéicas sobre a histomorfologia do fígado em ratos Wistar submetidos a um modelo de infecção experimental causado pela *Salmonella* Typhimurim.

ESPECÍFICOS

Analisar alterações histológicas do fígado;

Quantificar células inflamatórias mononucleares (CMN) no fígado;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Tipo do estudo

Trata-se de um estudo do tipo experimental, longitudinal e comparativo.

5.2 Local do estudo

Este estudo foi realizado no Departamento de Nutrição no Laboratório de Experimentação, no Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE) e nos Laboratório de Experimentação Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição (LEEAL/UFPE) e nos Laboratórios de Histotecnologia e Microscopia do Programa de Pós-graduação em Patologia da UFPE.

5.3. Período de referência

A parte prática experimental do estudo foi realizada no período de abril de 2014 a janeiro de 2015. Durante esse período foi realizado o preparo das dietas, avaliação dos ratos, preparação histologia dos tecidos, a análises teciduais, análises estatísticas dos dados, interpretação dos resultados e redação dos manuscritos.

5.4 Preparo das Dietas

As dietas foram produzidas no LEAAL/UFPE, sendo baseada de acordo com as análises da composição centesimal de cada ingrediente (Tabela 1 e 2), usando uma concentração protéica de 12% para cada dieta (REEVE; NIELSEN; FAHEY, 1993). A dieta padrão tendo caseína (CAS) à única fonte protéica que foi preparada de acordo com as recomendações da AIN-93M, (DUFY et al.,2002).

No preparo da farinha para dieta à base de camarão (CAM), foi utilizado o camarão descascado e sem cabeça (Netuno[®]) da espécie marinha LITOPENAEUS VANNAMEI, depois de cozinhado em água fervente, ele foi ressecado a uma temperatura de 60°C em estufa e triturado em processador até formar uma farinha fina. Para a dieta suína (SUI) usamos o lombo suíno (FRIMESA[®]), por ser a região que possui maior teor protéico de acordo com Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), após cozinhar o lombo do porco, foi ressecado a uma temperatura de 60 °C em estufa e triturado em um processador até formar uma farinha para produção da ração.

As rações foram produzidas com a farinha acrescidas de outros ingredientes necessários para o animal observados na Tabela 2, na forma de pellets e armazenadas na geladeira a 4 a 7°C com validade de 30 dias após a data de fabricação.

Foi utilizada também a dieta Presence®, possui em média 23g% de proteína, 49g% de carboidrato e 4,0g% de lipídios, com fornecimento calórico de 4,07kcal/g (Tabela 3), dieta comercial da empresa purina®, para o grupo controle até os animais atingirem a idade (150 dias) e o peso ideal (390g).

Tabela 1- Composição centesimal das dietas usadas no experimento. Dieta carne suína, camarão e caseína (AIN-93).

Composição centesimal (g%)						
Dietas	Proteína	Carboidrato	Lipídeos	Cinza	Fibra	Kcal (%)
Carne Suína	13,13	77,0	9,85	3,0	5,0	365,36Cal/100g
Camarão	12,97	77,22	9,80	1,82	5,0	370,07Cal/100g
Caseína	13,29	76,72	9,97	3,5	5,0	361,06Cal/100g

Fonte: Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos, DN/UFPE;

Tabela 2- Composição de dietas semi-purificadas utilizados no experimento. Dieta padrão caseína (CAS), farinha base de camarão (CAM) e farinha a base de carne suína (SUI).

Ingredientes (g/100g dieta) *	CAS	CAM	SUI
Caseína (> 85% proteína)	14,11 [#]	-	-
Camarão**	-	17,2 [#]	-
Porco**	-	-	15,13 [#]
Amido de milho	46,56	45,63	47,71
Amido dextrinizado	15,5	15,5	15,5
Sacarose	10,0	10,0	10,0
Óleo de soja (ml)	4,0	3,6	2,41
Mix Mineral (AIN-93M)	3,5	1,8	23,0
Mix Vitaminas (AIN-93M)	1,0	1,0	1,0
DL-metionina	0,18	-	-
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25

Fonte: Dados da pesquisa. *Quantidade/g de cada componente;

**Farinha (g%);[#]Concentração de proteínas de 12%;

Tabela 3- Composição dos nutrientes da dieta Presence® (Purina Brasil) utilizada na alimentação dos animais após o desmame.

Ingredientes*	Quantidade (g%)	Calorias (Kcal)
Proteína	23	92
Carboidrato	49	288
Lipídeos	4,0	22,5

*Composição básica: milho, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de carne, farelo de arroz cru, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, sal, pré-mix. **Fonte:** PURINA BRASIL.

5.5 ANIMAIS E INFECÇÃO

5.5.1 Animais de estudo e delineamento experimental

Foram utilizados 55 ratos machos, da linhagem Wistar, procedentes do Biotério do Departamento de Nutrição (UFPE), com idades de 150 dias e peso corporal de aproximadamente 390g. A escolha de ratos do sexo masculino na composição dos grupos se deveu as variações hormonais que costumam ocorrer no sexo feminino podendo levar a

alterações de comportamento e hábito alimentar nas diversas fases do seu desenvolvimento. O número da amostra trabalhada baseou-se no planejamento estatístico que foi concebido com base em estudos anteriores, números de ocorrências observadas e pelo desenho metodológico.

Durante todo o estudo os animais foram mantidos em condições padrão de biotério (temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, sob ciclo claro/escuro invertido de 12 horas, luz acesa às 18 horas) e recebendo água *ad libitum*, segundo recomendação ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Após o desmame da prole (21º de vida), receberam a dieta comercial Presence® até completarem 150 dias de vida, foram pesados e divididos aleatoriamente em dois grupos, de acordo com as dietas experimentais: Grupo Nutricional (dieta Presence® (PRES); dieta caseína (CAS); dieta Camarão (CAM); dieta Carne Suína (SUI)); Grupo Nutricional infectado (além de receber a dieta no 31º dia foram infectados pela Salmonella- Presence + infecção (PRESi); Caseína + infecção (CAS i); Camarão + infecção (CAMi); Carne Suína + infecção (SUIi)).

Durante os experimentos foi ofertada a cada animal de cada grupo aproximadamente 25 a 30g diariamente sua respectiva dieta durante o período de um mês (30 dias).

5.5.2 Obtenção dos Grupos Experimentais

Inicialmente, os grupos experimentais foram obtidos aleatoriamente de acordo com a dieta experimental (Figura 7):

A) Grupo Nutricional Controle:

Grupo Presence (PRES): recebeu ração comercial Presence®.

Grupo caseína (CAS): recebeu a dieta AIN-93 a base de caseína.

Grupo camarão (CAM): recebeu a dieta a base de farinha de camarão.

Grupo carne suína (SUI): recebeu a dieta a base de farinha de carne de porco.

B) Grupo Nutricional Infectado:

Grupo Presence + infecção (PRESi-6h/ PRESi-48h) recebeu ração comercial Presence® e subdivididos pelo tempo de infecção pela bactéria (6 e 48h).

Grupo dieta de caseína + infecção (CASi-6h/ CASi-48h) recebeu a dieta AIN-93 e subdivididos pelo tempo de infecção pela bactéria (6 e 48h).

Grupo dieta camarão + infecção (CAMi-6h/ CAMi-48h) recebeu a dieta a base de farinha de camarão subdivididos pelo tempo de infecção pela bactéria (6 e 48h).

Grupo dieta suína + infecção (SUIi- 6h/ SUIi-48h) recebeu a dieta a base de farinha de carne de porco e subdivididos pelo tempo de infecção pela bactéria (6 e 48h).



Figura 7- Representação esquemática dos grupos experimentais de acordo com o esquema de dietas e infecção pela *Salmonella* Typhimurium após o período de desmame. **Fonte:** Dados da pesquisa.

5.5.3 Micro-organismo

A *Salmonella* entérica serovar Typhimurium foi fornecida pelo Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho responsável pelo laboratório de Microbiologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LAMIN/UFRPE), utilizamos a cepa selvagem C5 WT trazida da Inglaterra. As bactérias foram mantidas a uma temperatura de 18°C em meios de cultura (em tubos) com infusão de coração-cérebro (BHI), contendo 50% de glicerol. Durante os experimentos, as células bacterianas foram ativadas após crescimento em caldo de BHI durante 24 horas a 37 °C.

5.5.4 Desenho Experimental

No 31º dia após o início da administração da dieta, os animais do grupo nutricional infectado (PRESi-6h/ PRESi-48h; CASi-6h/ CASi-48h; CAMi-6h/ CAMi-48h; SUIi- 6h/

SUI-48h) foram inoculados por via intraperitoneal de acordo com o protocolo proposto por Lima-Filho e colaboradores, (2010) uma solução 0,2 mL de PBS (pH 7,3) contendo aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colônias (CFU) por mL de *Salmonella* Typhimurium (infecção sub-letal) e ficaram em observação durante 6 horas e 48 horas. O número de células viáveis *Salmonella* por mL de inoculo sendo determinada através do plaqueamento de diluições de 10 vezes em BHI (KONEMAN; ALLEN; JANDA, 2001).

Após a realização da infecção os animais foram eutanasiados com a associação de anestésico cloridrato Ketamina 10% (45mg/kg) e 2% de cloridrato de Xilazina (7mg/kg), via intramuscular, após constatação de arreflexia profunda, os animais foram submetidos à laparotomia mediana para retirada de órgãos.

5.5.5 Método de coleta

5.5.5.1 Processamento histológico das amostras do fígado

Para avaliação e caracterização histopatológica os fragmentos dos lóbulos hepáticos, foram fixados em formol tamponado (10%) por um período de 24 horas, sendo então desidratados em banhos sucessivos de etanol à 70%, 80%, 90% e 100% (60 min cada), diafanizados em três banhos com o xilol (60 min cada) e incluídos em parafina para confecção dos blocos. Posteriormente, foram obtidos cortes histológicos (4 μ m) através de micrômetro (LEICA SM 2000R). Os cortes foram distendidos em banho-maria a 40°C, colhidos em lâminas histológicas montadas com albumina de Meyer e colocados em estufa a 37°C por 24 horas, para secagem e melhor adesão das lâminas, os quais foram posteriormente submetidos à coloração de Hematoxilina-Eosina e montados com Entellan. O estudo da microscopia óptica incluiu a verificação dos parâmetros histológicos de normalidade (preservação arquitetural, ausência de estruturas, células estranhas, alteradas em número, forma, tamanho ou aspecto citológico) e das alterações hepáticas (presença ou não de vacúolos de gordura, infiltrados inflamatório agudo ou crônico).

5.6 Análises morfométricas

As análises morfométricas foram realizadas no Laboratório de Morfometria, do Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE).

Foram selecionadas em microscópio óptico Opton® imagens dos cortes longitudinais dos lóbulos hepáticos (magnificação, 40x e 400x), sendo capturadas e digitalizadas através de uma câmera digital (Moticam 1000®) acoplada a um computador e armazenada no software analisador de imagens-MoticImages Plus®. Foi então realizada a contagem do número células inflamatória.

5.6.1 Contagem de células inflamatórias

A contagem de células mononucleares (CMN) foi realizada nos espaços periportais do fígado, por meio do aplicativo Mesurin_Pro®, para cada lâmina analisada, foram estudados cinco campos aleatórios, com aumento de 400x, no total de 20 campos por animal de cada grupo avaliado (Figura7).

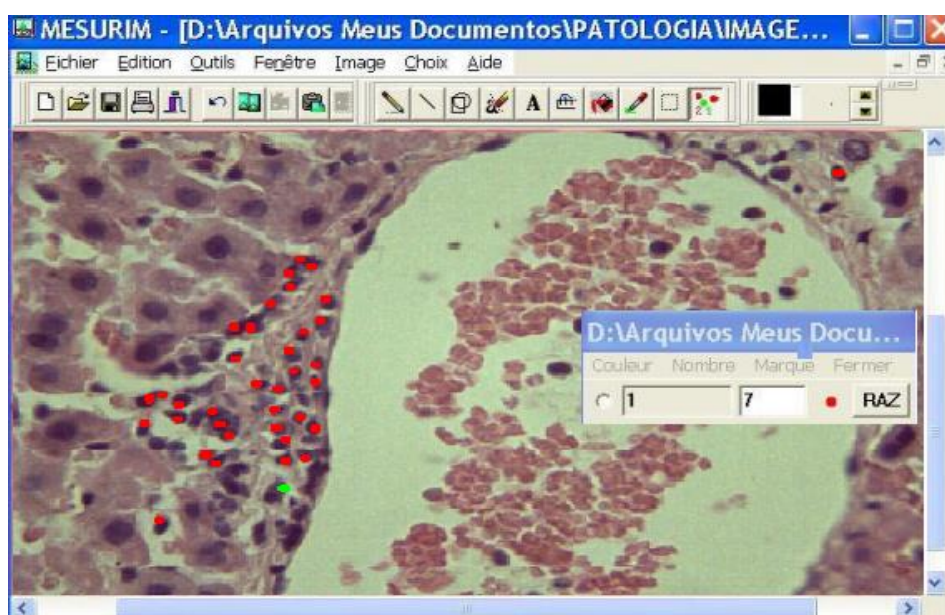


Figura 8. Interface gráfica do software Mesurin ilustrando a fotomicrografia de células inflamatórias (vermelho).

5.7 Análises Estatísticas

Foi construído um banco de dados em planilhas eletrônicas Microsoft Excel as quais foram exportadas para o software SPSS for Windows versão 13.0. Para avaliar o número de células mononucleadas (CMN) em cada dieta utilizada, portanto foram calculadas a média e o desvio padrão. A normalidade do número de CMN foi observada através do teste Kolmogorov-smirnov. Para comparação das médias entre os tipos de dietas foi aplicado o teste da ANOVA e, nos casos de indicação de diferença significava, aplicou-se o teste de

Tukey na comparação dois a dois. Na comparação da média do número de CMN às 6 horas e às 48 horas de avaliação, em cada dieta do estudo, foi aplicado o teste t de Student para amostras pareadas. Todas as conclusões foram tiradas considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para todos os casos.

5.8 Questões Éticas

O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Ofício de nº 77/14 do processo de nº 23076.015913/2012-94, sendo aprovado por estar de acordo com as normas vigentes no Brasil pela Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos (ANEXO A).

6 RESULTADO

Estão presentes sob forma de artigo original (Apêndice), submetido ao periódico Histology and Histopathology (Qualis B1-Medicina II).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desse modo, nos próximos estudos aumentaremos o tempo de administração das dietas ricas em gorduras, como foi demonstrado em alguns estudos que quanto mais prolongado atuação desses tipos de dietas melhor terá um resultado na cronificação das lesões (esteatose, fibrose) no tecido hepático. Além disso, também aumentaremos a dose a da bactéria, pois a dose utilizada em nosso estudo foi relativamente pequena para o porte do animal.

E para que possamos entender melhor a resposta inflamatória observada no tecido, avaliaremos a ativação de fatores pró e anti-inflamatórios usando testes moleculares como a imuno-histoquímica, PCR e outros.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K., LICHIMAN, A. H. Cellular and Molecular Immunology. **5th London**. p. 562, 2005.
- ADAMS et al. Nonalcoholic fatty liver disease increases risk of death among patients with diabetes: a community-based cohort study. **Am J Gastroenterol**. n. 105, p. 1567-73, 2010.
- ALENCAR, N. M. N., FIGUEIREDO, I. S. T., VALE, M. R. et al. "Antiinflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in three different experimental models: Peritonitis, paw edema and hemorrhagic cystitis," **Planta Medica**, v. 70, n. 12, p. 1144–1149, 2004.
- ALLER, M.A., ARIAS, J.L., ARIAS, J.I., SÁNCHEZ-PATÁN, F., ARIAS, J. The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, n. 12, v. 10, p. 225 – 234, 2006.
- ALWANI, M. E., WU, B. X., OBEID, L. M., HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacology&Therapeutics**, v. 112, p. 171–183, 2006.
- ATHENS, J.W. O sistema reticuloendotelial e o baço. In: Lee GR; Bithele TC; Forester J; Athens JW; Lukens JN. **Wintrobe Hematologia Clinica**. 1a ed. São Paulo: Manole, p.336-48, 1998.
- BASSO, R. Bioquímica e Metabolismo dos lipídeos. In: SLVA SMC; MURA JDP. **Tratado de Alimentação, Nutrição e Dioterapia**. São Paulo: Roca, 2007.
- BAÜMLER, A. J., HARGIS, B. M., TSOLIS, R. M. Trancing the origins of Salmonella outbreaks. *Science*, 287, 50-52, 2000.
- BEGOSSI, A., HANAZAKI, N. & RAMOS, R.M. Food chain and the reasons for fish food taboos among Amazonian and Atlantic forest fishers (Brazil). **Ecol. Appl**. n. 14, v. 5, p. 1334-1343, 2004.
- BODEN, G. Endoplasmic reticulum stress: another link between obesity and insulin resistance/inflammation? **Diabetes**. v.58, n. 3, p. 518-550. 2008.
- BORGES, V.C.; LIMA, A.O.; D'ALBUQUERQUE, L.C.; WAITZBERG, D.L. Insuficiência Hepática Aguda e Crônica. In: WAITZBERG, D.L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3 ed. v.II. São Paulo: Atheneu, 2002.

BRITO JÚNIOR, L.C., ESTACIO, A.G. Tabus alimentares em medicina: uma hipótese para fisiopatologia referente aos alimentos remosos. **Rev. Assoc. Med. Bras.** [online]. v. 59. n. 3, p. 213-216, 2013.

BUAGAREL, M., et al. Amultilex real-time PCR assay targeting virulence and resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **BMC Microbiology.** v 11,n. 151, p. 1-11. 2011.

CAVAILLON, J. M. et al. Cytokine cascade in sepsis. **Scand. J. Infect. Dis.** v.35, p.535–544, 2003.

CERILLO, A., QUAGLIARO, L., PICONI, L., ASSALONI, R. DA ROS, R. MAIER, A., ESPOSITO, K., GIUGLIANO, D. Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastatin treatment. **Diabetes.** v. 53, n. 3, p. 701-710. 2004.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **Salmonella Surveillance:** Anual Summary 2004. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human services, CDC, 2005.

COSTA-NETO, E.M. Restrições e preferências alimentares em comunidades de pescadores do Município de Conde, Estado da Bahia, Brasil. **Rev Nutr.** v. 13, p. 117–265, 2000.

CRUVINEL, W.M., MESQUITA JÚNIOR, D., ARAÚJO, J.A.P., CATELAN, T.T.T., SOUZA, A.W.S., SILVA, N.P., et al. Sistema imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Ver Bras Reumatol.** v.50, p.434–61, 2010.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S., MCNEELEY, D.F., MOON, A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. **J. Allergy Clin Immunol.** n.115, p.1119-28, 2005.

CURFS, J.H., MEIS, J.F., HOOBKAMP-KORSTANJE, J.A. – A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clin Microbiol Rev.** v.10 p.742-780. 1997.

DDTHA/CVE (Divisão De Doenças De Transmissão Hídrica E Alimentos/ Centro De Vigilância Epidemiológica). **Rev. Saúde Pública.** v. 39, n.3, p. 515-518. 2005.

DINIZ D. F. Fígado e Vias Biliares. In: Diniz de Freitas, editor. *Gastroenterologia-Semiologia Clínica e Laboratorial.* cap.XXXVI, p. 537-566.2005.

DUFFY, P.H., et al. Effect of the AIN-93M Purified Diet and Dietary Restriction on Survival in Sprague-Dawley Rats: Implications for Chronic Studies. **J.Nutr.** v. 132, p.101-107, 2002.

FIELD, C.J., JOHNSON, I.R., SCHLEY, P.D. Nutrients and their role in host resistance to infection. **Journal of Leukocyte Biology.** v. 71, p. 16-32, 2002.

FONTANA, L., MEYER, T.E., KLEIN S., HOLLOSZY, J.O. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. **PNAS**. v. 101, n.17, p. 6659-6663. 2004.

FUNG, T.T., SCHULZE, M., MANSON, J.E., WILLET, W.C, HU, F.B. Dietary patterns, meat intake, and the risk of type 2 diabetes in women. **Arch Intern Med**. V. 164, n. 20, p. 2235-2240. 2004.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de fisiologia medica. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 972. 2011.

GERALDO, JÚNIA M. AND ALFENAS, RITA DE C. G. Papel da dieta na prevenção e no controle da inflamação crônica: evidências atuais. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** n. 52, v. 6, p. 951-967, 2008.

HEDEMAN, C., SCHULZE, M.B., FRANCO, O.H. VAM DAM, R.M., MAMTZOROS, C.S. HU, F.B. Dietary patterns na risk of mortality from cardiovascular disease, cancer, and all cause in a prospective cohort of women. **Circulation**. v.118, n. 3, p. 230-237. 2008.

HENRY, P.H., Longo, D.L. Linfadenopatia e esplenomegalia. IN Fauci AS et al. **Harrison medicina interna** ; 14a edição Rio de Janeiro; Macgrawhill, p. 367-73, 1998.

HEPCENTRO (Hepatologia Médica)- <http://www.hepcentro.com.br>

HIDEUUKI, S., TETSUYA, M., YOSHIHIDE, F., ISAO,N., et.al. Toll-Like receptor 2 contributes to liver by *Salmonella* infection though fasligand expression on NTK cells in mice. **Gastroenterology**. n. 123, p. 1265-1277. 2002.

HUBY, R.D.J., DEARMAN, R.J., KIMBER, I. Why are some proteins allergens? **ToxicolScienc**. v. 55, p. 235-246, 2000.

JAMES, M. C. **O Fígado e o Trato Biliar**. In: Cotran RS, Kumar, Collins, editors. Robbins Patologia Estrutural e Funcional, ed 6, tradução Guanabara Koogan. cap.18, p. 759-808, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 258, 267-268, 2013.

KRAUCZYK M, BOMFRATE L, PORTINCASA P. No alcoholic fatty liver disease. Best Practice. **Research Clinical Gastroenterol**. v. 24, p. 695-708. 2010.

LAHIRI, A., IYER, N., DAS, P., CHAKRAVORTTY, D. Visiting the cell biology of *Salmonella* infection. **Micro. Resand. Infection**. v. 12, p. 809-818, 2010.

LIBER, C.S. Nutrição nos Distúrbios Hepáticos. In: SHILLS,, M.E. et al. **Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. 9 ed. v.II. São Paulo: Manole, 2003.

LIMA-FILHO J.V.M., VIEIRA, L.Q., ARANTES, R.M.E., NICOLI, J.R. Effect of the *Escherichia coli* EMO on experimental infection by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium in gnotobiotic mice. **Braz J Med Biol Res.** n. 37, p. 1005–1013, 2004.

LIMA-FILHO, D.O., SPANHOL, C.P., OLIVEIRA, F.D. Marketing e Ciências Sociais: um estudo sobre a influência da cultura na alimentação. In: **Congresso Virtual Brasileiro de Administração-Convibra**, Brasil. 2007.

LIMA-FILHO, J.V.M., PATRIOTA, J.M., SILVA, A.F. et al. Proteins from latex of *Calotropisprocera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Jouurnal of Ethnopharmacolgy.** v. 129, p.327–334, 2010.

LIN, E., CALVANO, S.E., LOWRY, S.F. – Inflammatory cytokines and cell response n surgery. **Surgery.** v.127, p.117-126, 2000.

LUDWIG, J.; VIGGIANO, T.R.; MCGILL, D.B.; OH, B.J. Nonalcoholic Steatohepatitis: Mayo Clinic Expeiences With a Hitherto Unnamed Disease. **MayoClin Proc.** v. 55, p. 434-8. 1980.

MAHAN, L.K., ECOTT-STUMP, S. Alimentos, Nutrição e Dietoterapia, 11^a ed. Elsevier, 2010.

MATTEONI, C.A., YOUNOSSI, Z.M., GRAMLICH, T., BOPARI, N., LIU, Y.C. MCCULLOUGH, A.J. Nonaalcoholic fatty liver disease: spectrum of clinical and pathological severity. **Gastreterology.** v. 116, p. 1413-9, 1999.

MASTROENI, P., MASKELL, D. *Salmonella* infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects. Advances in Molecular and Cellular Microbiology 9. Cambridge: **Cambridge University Press**, 2006.

MAZZA, R.P.J.; PEREIRA, C.C.A. WAITZBERG, D.L. Doenças Hepáticas In: CUPPARI, L. **Guia de nutrição clínica no adulto**. 2 ed. SÃO PAULO: Manole, 2005.

MELO, I.S.V. Perfil em ácido graxos do tecido hepatico de ratos submetidos à dieta cetogenica rica em trienatina.[dissertação de mestraado].Alagoas: Universidade Federal de Alagoa, 2011.

MILLWAR, D.J., LAYMAN, D.K., TOMÉ, D., et al. A avaliação da qualidade proteica: Impacto de ampliar a compreensão de proteínas e aminoácidos precisa para uma boa saúde. **Am J Clin. Nutr.** v.87, p. 157-158. 2008.

MICHAEL, D.R.C., BROOKS, M.R.G. et al. Esteatose Hepática Ocidental Induzida Por Dieta E Alterações No Transcriptoma De Fígado Em Adultos Ratos Brown-Norway. **BMC Gastroenterol.** n.15, p. 151, 2015.

MOBLEY, C.B., TOEDEBUSCH, R.G., LOCKWOOD, C.M., HEESE, A.J., ZHU, C., KRIEGER, A.E., et al. Adaptogens ervas combinada com frações protéicas de colostro bovino e galinha gema de ovo reduzir fígado expressão de TNF-alfa e carbonilação de proteínas na dieta alimentar ocidental em ratos. **Nutr. Metab.** n.11, p. 19, 2014.

MOURÃO, J., FERREIRA, L., et al. *Salmonella* entérica serotipo 4,[5], 12. Um perigo emergente de segurança alimentar. **P3- 4ª Região AnualPortFIR**, 2011.

MUSSO G, GAMBINO R, DE MICHIELI F, CASSADER M, RIZZETTO M, DURAZZO M, et al. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology.** 37:909-16, 2003.

NETTLTON, J.A., SCHULZE, M.B., JIANG, R. JENNY, N.S. BURK, G.L. JOCOBS, D.R., JR. A prioridefined dietary patterns and markers of cardiovascular disease risk in the Multi-Ehnic Study of Atherosclerosis (MESA). **AM J Clinical Nutrition.** v. 88, n. 1, p. 185-194. 2008.

OHL, M.E., MILLER, S.I. Salmonella: A model for bacterial pathogenesis. **Annual Review of Medicine.** v.52, p.259-74, 2001.

PADOIN, A.V., STAUB, H.L., CHATKIN, J.M., MORETTO, M., MAGGIONI, L., RIZZOLLI, J., MOTTIN, C.C. Doença hepática não alcoólica gordurosa e risco de cirrose. **Scient Med.** v. 8, n. 4, p. 172-176. 2008.

PÉREZ-CANO, F.J., MASSOT-CLADERA, M., FRANCH, A., CASTELLOTE, C., CASTELL, M. **The effects of cocoa on the immune system.** v.4, p. 71, 2013.

RAEBURN, C.D., SHEPPARD, F., BARSNESS, K.A. et al. – Cytokines for surgeons. **Am J Surg.** v.183, p. 268-273. 2002.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93: Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **Journal of Nutrition,** v. 123, n. 11, p. 1939-51, 1993.

RICTTIRSCH, D., HOESEL, M.L., WARD, P.A. The disconnect between animal models of sepsis and human. **J. Leukoc. Biology.,** v.81, p. 321-42, 2007.

ROCK, K.L., LATZ, E., ONTIVEROS, F., KONO H. The Sterile Inflammatory Response. *Annu. Rev. Immunol.* v. 28, p. 321-42, 2010.

ROSS, M. H., PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas, em correlação com Biologia celular e molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 450-451, 468-471, 2012.

SAKUGAWA SHINOHARA, N. K., BEZERRA, B.V., CASTRO, J.S. M., CASTRO, L.M.E., FIREMAN, D.R.A., LIMA, J. L. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1669-1674, 2008.

SCHAFFER, F.; ADELER, M. Fatty Liver Hepatitis and Cirrhosis in Obese Patients. **Am J Med**, v.67, p. 811-6, 1979.

SCHENK, S., SABERI, M., OLEFSKY J.M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **J Clin Invest.** v. 118, n. 9, p. 2992-3002. 2008.

SILVA, A.L. Comida de gente: preferências e tabus alimentares entre os ribeirinhos do médio Rio Negro (Amazonas, Brasil). **Rev Antropol.** São Paulo, USP. v.50. p. 125–793, 2007.

SHINONI, M.I. Fisiologia Hepatica. Gaaz. **Med Bahia**, v.76, n. 1, p. 5-9. 2006.

SOMMER, C., WHITE, F. - Cytokines, Chemokines, and Pain, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F et al. – **Pharmacology of Pain**. 1st Ed, Seattle IASP Press. v.279, p.302, 2010.

TARGHER, G., DAY, C.P., BONORA, E. Risk Cardiovascular Disease in Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease. **N Engl J Med.** n. 363, v. 14, p.1341- 1350, 2010.

TRACEY, K.J., LOWRY, S.F. The role of cytokine mediators in septic shock. **AdvSurg.** p. 23-21-56, 1990.

TUÑÓN, M.J., SAN-MIGUEL, B., CRESPO, I. et al. Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin, **Journal of pineal research.** v. 55, n.3, p. 221-228, 2011.

TORTORA, G.J. et al. **Microbiologia**, 10ªEd. Porto Alegre. Artmed. 934. P, 2012.

WILLIAMS CD, STENGER J, ASIKE MI, TORRES DM, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology.* n. 140, p. 124–131, 2011.

YUNIANINGTIAS D., VOLKER D. Nutritional aspects of non-alcoholic steatohepatitis treatment. **Nutr Diet.** n.63, p. 79-90, 2006.

APÊNDICE-ARTIGO

TITULO:

INJURIES TISSUE LIVER INDUCED PROTEIN DIET A MEAT OF SWINE AND SHRIMP IN EXPERIMENTAL MODEL

Isabella Patrícia Lima Silva¹, Carina Scanoni Maia², Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa³, José Vitor Moreira Lima Filho⁴, Roberta Ferreira Ventura⁵, Silvania Tavares Paz⁶, Nicodemos Teles de Pontes Filho⁷

1. Degree in Biomedicine. Postgraduate Program in Pathology, CCS-UFPE.
2. PhD in Animal Bioscience. Department of Histology, CCS-UFPE.
3. PhD in Nutrition. Department of Nutrition, CCS-UFPE.
4. PhD in Biological Sciences. microbiology laboratory, LAMIN-UFRPE.
5. Master of Pathology. Graduate Program in Applied Biology in Health, LIKA-UFPE.
6. Technical Histology. Histology Laboratory of the Graduate CCS-UFPE Pathology.
7. PhD in Nutrition. Postgraduate Program in Pathology, CCS-UFPE.

Av. Prof. Moraes Rego, 1235- Universitária- City Zip Code: 50670-901- Graduate Diploma in Pathology, Recife, Pernambuco, Brazil.
E-mail: isabella-patricia1@hotmail.com

ABSTRACT

Introduction: Various cultures treating certain foods such as remosos, among which are the pig and shrimp, and in certain physiological or pathological conditions of the organism, being capable of stimulating the proliferation of immune cells, leading to exacerbation of inflammation, tissue damage, or directly interfering with clinical recovery postoperative

Objective: This study evaluated based diets shrimp, pork and casein histophysiology a liver infection model induced by Salmonella Typhimurium. **Methods:** 55 rats Wistar rats were divided into two groups: nutritional control group (dietary presence, pork, shrimp and casein) and nutritional group infected with Salmonella Typhimurium that dug under observation for 6 to 48 hours after infection. The animals receiving diet for 30 days and then the animals were sacrificed and the liver removed to perform histopathology. **Results:** According to the group treated with histopathologic nutritional casein diet, there was a slight steatosis, since animals treated with shrimp diet pigs and characterized steatosis is more intense. In infected nutritional group showed an infiltrate of inflammatory cells (macrophages, lymphocytes and neutrophils) in 6h group showed little infiltration of inflammatory cells in the periportal area, compared with the groups 48 h, the infiltrated found to be more severe and widespread. According to the mononuclear cell count in the regions peri portals found that the Presi-6h group / Presei-48h showed a lower average than the other groups (mean = 12.4 for 6 h and mean = 35.4 to 48 h) and the group with the highest average of inflammatory cells at 6 and 48 hours after infection, was the SUli group (mean = mean = 83.8 and 145.0 respectively).

Conclusion: The study showed that in the groups treated with different high-calorie protein diets were able to cause damage to the tissue of the liver (steatosis) favoring an inflammatory process in place.

Keywords: Keywords: Diets. Inflammation. Shrimp. Pig. Fatty liver.

INTRODUCTION

According to popular culture, some foods when consumed in certain pathological conditions (infection, inflammation, injury) and physiological (menstrual and other period), being considered unfit for consumption because they have the ability to stimulate an allergic and inflammatory responses, increase damage tissue (Alcoforado, 2012; BRITO-JUNIOR; ESTÁCIO, 2013).

These food taboos are related to food "remosos" which are capable of serious medical conditions, affecting the patient's clinical recovery due to the presence of toxic substances in food eaten. Among these foods are the pork, crab, shrimp and other (COSTA NETO, 2000; BEGOSSI, 2004; SILVA, 2007).

There is no consensus about which foods are considered remosos, however, the literature reports a possible correlation of which are of animal origin, particularly carnivores, to accumulate a lot of bacteria and toxins, in which these microorganisms and cellular components are resistant to cooking and consequently can provoked stimulating cells of the humoral immune system and / or cellular (COSTA NETO, 2000; CUNNINGHAM-rundles; McNeeley; Moon, 2005; SILVA, 2007; Rai et al, 2012;. BRITO-JUNIOR and ESTÁCIO , 2013).

In a study by Huby et al (2000), it was found that some proteins can be more allergenic than others, leading to production of pro-inflammatory substances that trigger pathophysiological mechanism such as type I hypersensitivity reactions (immediate) type or II (cytotoxic) two different mediated immune responses (SEIBLD, 2005). Rock et al. (2010) reported that after digestion of foods rich in protein and fat such as shrimp and pork, an increase of immunogenicity activating an inflammatory response, especially in the liver, to be responsible for metabolizing proteins and lipids and be susceptible to toxins.

Some diseases may be caused by the presence of different substances in foods such as rich hypercaloric diet high in saturated fats that are capable of altering histophysiology liver causing nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) (Adams; ANGLE, 2005), characterized by the abnormal accumulation of triglycerides in hepatocytes (steatosis) (Marquez, et al, 2008;.

BRUNA et al, 2013.). NAFLD has different stages ranging from fatty liver to an advanced stage with the presence of inflammation and subsequent fibrosis (cirrhosis) and may progress to cancer (hepatocellular carcinoma) (LAM; Younossi, 2010; BRUNA, LUCIANO; MÁRCIA, 2013).

The lifestyle, ie, physical inactivity and unhealthy eating habits are factors that favor the accumulation of fat in the liver that the chronic course determines an inflammatory process by stimulating the production of cytokines that activate immune cells (TARGHER; DAY; BONORA, 2010).

However, the pathogenesis of DHGN is poorly defined and believed to be associated with metabolic disorders, including central obesity, imbalance in the metabolism of insulin, dyslipidemia, hypertension, hyperglycemia, with resulting from a defect in lipid metabolism, promoting lipogenesis (Zafrani, 2002; Méndez-Sánchez et al, 2007)..

The bacterial species, *Salmonella typhimurium* induces a similar syndrome in animals for human typhoid fever (Portillo 2001; Zhang et al., 2003). In murine studies this species has been used in experimental models of systemic infections becoming a great tool for the study of sepsis and inflammatory diseases (OHL; Miller, 2001; PORTILLO, 2001; Lima-Filho et al., 2004).

Given the complexity of the different diets adopted by individuals or populations of different cultures seems appropriate further study between food components and their interactions with the immune system in certain physiological or pathological conditions (KRAUSE; Mahan; Escott-STUMP, 2002). This study aimed to evaluate the possible influence of different protein diets of animal origin such as shrimp and pork on liver histomorphology when acquiring an infection.

METHODS

Animals

For research were used 55 animals Wistar, *Rattus norvegicus* albinos, males, with 150 days of age and body weight of approximately 390g coming from the Vivarium of the Department of Nutrition / CCS / UFPE. Placed in individual plastic cages vented animals were exposed to 12 light-dark cycle: 12 hours, at a temperature of $22 \pm 2^{\circ} \text{C}$ with free access to water. After weaning (days 21 °), all animals were fed a standard vivarium ration (Presence®) until completing 150 days were weighed and randomly divided into two groups, according to the experimental diets:

A) Nutrition Group control:

1. Presence Group (PRES) received commercial feed Presence®;
2. Group Casein (CAS) received AIN-93 diet based on casein;
3. Group Shrimp (CAM) received the diet of shrimp flour base;
4. Group Pork (SUI) who received diet pork flour base;

B) Nutritional infected group: was subdivided according to the time of infection by the bacterium (6 and 48h);

1. Presence + Group infection (Presi-6h / Presi-48h) who received commercial feed Presence®;
2. Casein Group + casein infection (CASI-6h / CASI-48h) which received the AIN-93 diet group;
3. Group Shrimp (CAMI-6h / CAMI-48h) that received the diet of shrimp flour base;
4. Group Pork (SUI am-6pm / CAM-48h) that received the diet pork flour base;

During the experiments was supplied daily to each experimental group 25g their respective diet for 30 days.

This study was proved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Pernambuco (Official Letter No. 77/14 of the process No. 23076.015913 / 2012-94) and in accordance with the guidelines provided by this institution.

Experimental diets

Diets were based according to the analysis of chemical composition of each ingredient (Table 1 and 2) using a protein concentration of 12% for each diet according to Reeves et al, 1993. The standard diet with casein (CAS) to only protein source that has been prepared in accordance with the recommendations of the AIN-93M (DUFY et al., 2002).

To prepare the shrimp based diet (CAM) using the headless shelled shrimp and (NETUNO®) of marine species *Litopenaeus vannamei*, that after boiled in boiling water, it was dried in an oven at a temperature of 60 ° C and triturated in processor until a fine flour and were stored in a refrigerator at 4-7 ° C with validity of 30 days after the date of manufacture.

For swine diet (SUI) the pork loin (FRIMESA®) was used because it is the region that has a higher protein content in accordance with Brazilian Table of Food Composition (TACO). After cooked pork loin was dried at a temperature of 60 ° C and milled to form a flour.

The diets were produced with flour plus other ingredients required for the animal seen in Table 2, in the form of pellets and stored in a refrigerator at 4 to 7 ° C with a validity of 30 days after the date of manufacture.

It was also used to Presence® diet, commercial diet Purina® company, for the control group until the animals reach the age and ideal weight.

Table 1. Proximate analysis of diets used in the experiment. Diet pork, shrimp and casein (AIN-93).

Centesimal composition (g%)						
Diets	Protein	Carbohydrate	Lipids	Grey	Fiber	Kcal (%)
Meat swine	13,13	77,0	9,85	3,0	5,0	365,36Cal
Shrimp	12,97	77,22	9,80	1,82	5,0	370,07Cal
Casein	13,29	76,72	9,97	3,5	5,0	361,06Cal

Fonte: Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos, localizado na UFPE;

Table 2. Composition of semi-purified diets used in the experiment. standard diet casein (CAS), shrimp-based meal (CAM) and flour the pork meat (SUI).

Ingredients (g/100g diet) *	CAS	CAM	SUI
Casein (> 85% proteína)	14,11 [#]	-	-
Shrimp **	-	17,2 [#]	-
Swine **	-	-	15,13 [#]
Corn starch	46,56	45,63	47,71
Dextrinized starch	15,5	15,5	15,5
Sucrose	10,0	10,0	10,0
Soya oil (ml)	4,0	3,6	2,41
Mineral Mix (AIN-93M)	3,5	1,8	23,0
Mix Vitamins (AIN-93M)	1,0	1,0	1,0
DL-methionine	0,18	-	-
Choline bitartrate	0,25	0,25	0,25

Fonte: Dados da pesquisa. *Quantidade/g de cada componente;

**Farinha (g%)[#]; Concentração de proteínas a 12% para todas as dietas;

Infection of animals

For infection of the animals, the wild type strain C5 WT bacterial species *Salmonella enterica* serovar typhimurium, from the Microbiology Laboratory of the Federal Rural University of Pernambuco was used. Bacteria were maintained at a temperature of 18 ° C in culture medium brain-heart infusion (BHI) broth in tubes containing 50% glycerol. During the experiments, bacterial cells were activated after growth in BHI broth for 24 hours at 37 ° C. With 31 days of treatment with the diets, the animals infected nutrition group (Presi-6h / Presi-48h; CASI-6h / CASI-48h; cami-6h / CAMI-48h; SUIi- 6h / SUIi-48h) for each animal of the group, they were inoculated intraperitoneally, according to the protocol proposed by Lima-Filho et al, (2010) a solution of 0.2 ml PBS containing approximately 10⁶ CFU / ml of *Salmonella typhimurium*. They were euthanized after 6 and 48 hours of observation of the combination of anesthetic ketamine hydrochloride 10% (45mg / kg) and 2% xylazine hydrochloride (7mg / kg) intramuscularly.

Parameters assessed

Study histológico- the end of treatment with diet and after 12 hours of fasting, animals were anesthetized with ketamine intramuscularly in the hind limb (45mg / kg), associated with xylazine (7 mg / kg). They were taken to laparotomy which were taken from animal liver and then examined macroscopically and separated for histological examination. For histopathological evaluation and characterization of the fragments livers were fixed in 10% formalin buffered with PBS for 24 hours at room temperature. Subsequently underwent routine histological (fixation, dehydration and diafanization), and stained with hematoxylin-eosin and photographed under microscope Olympus BX-50.

Study morfométrico- Images of longitudinal sections of the liver lobes were obtained through a camera Moticam 1000® coupled to an optical microscope Opton® and stored in the analyzer software images-MoticImages Plus®.

Inflamatórias cell count- Was performed using Mesurin_Pro® application in periportal areas of the liver analyzed for each blade, were studied five random fields at a magnification of 400x, the total of 20 fields of each group.

Analysis Method Statistics

For data analysis, it built a database in Microsoft Excel spreadsheet which has been exported to the SPSS software (StatisticalPackage for Social Sciences) version 13.0.

To evaluate the CMN number on each diet used statistics were calculated: mean and standard deviation. Normality CMN number was observed through the Kolmogorov-Smirnov test. To compare the means between the types of diets ANOVA test was applied and, in case of difference of statement meant, it applied the Tukey test comparing two by two. For comparison the average CMN number to 6 hours and 48 hours of evaluation in each diet study, Student's t test was used for paired samples. All conclusions were drawn considering the significance level of 5% ($p < 0.05$) for all cases.

RESULTS

Histological specimens

In the liver of animals belonging to the group Presence (PRES) macroscopically apparent ordinary mind. Under the microscope it was observed that the periportal parenchyma and spaces were normal (Figure 1). + Presence already infected group (PRESI-6h / PRESI-48h) was observed infiltration by mononuclear cells in the periportal spaces on both infection times.

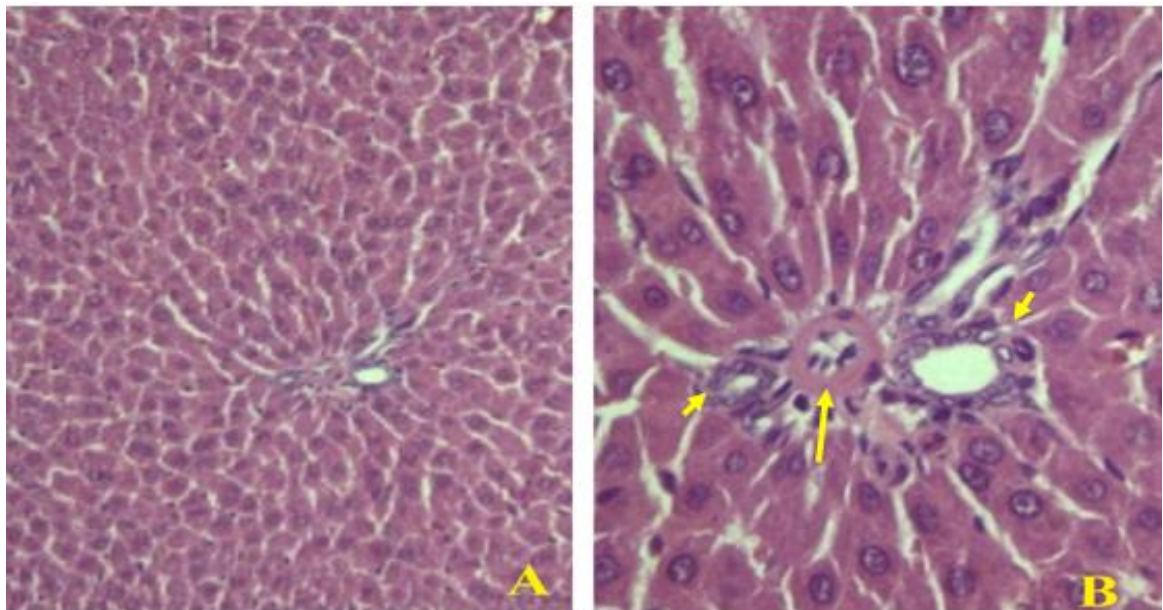


Figure 1 (A and B) - photomicrograph of a liver. Parenchyma with normal morphology and periportal hepatocytes space unchanged, represented by arterioles (elongated arrow) and two bile ducts (short arrow). **(A)** AU 40X **(B)** AU 400X. (HE staining).

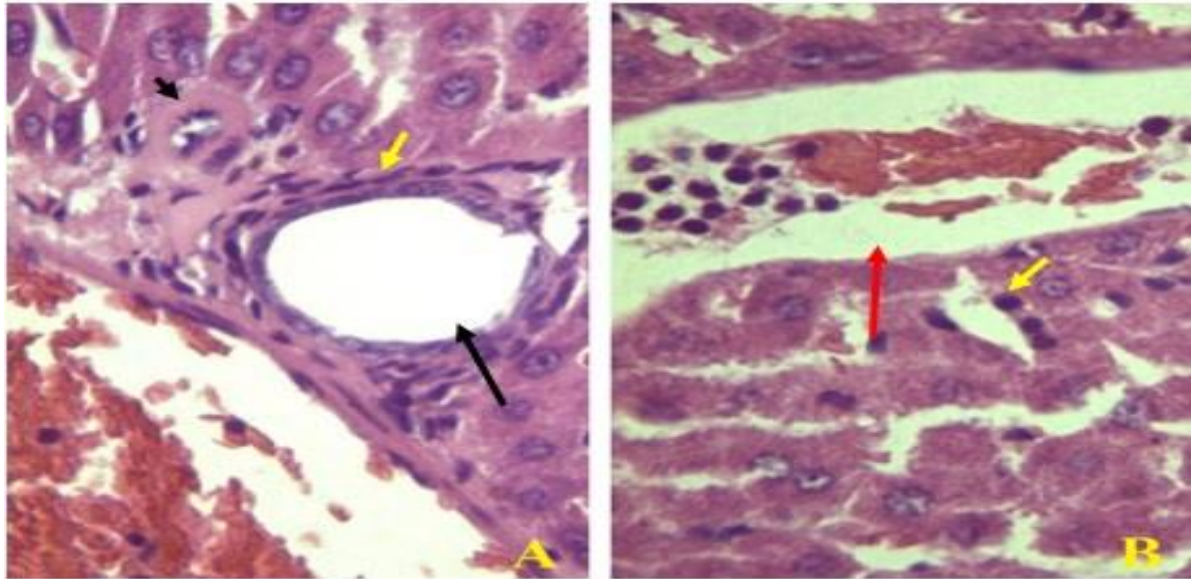


Figure 2- Photomicrograph of the liver. (A) Presence Group Picture + infection after 6 am infection. Presence of a discrete infiltration of mononuclear cells in the periportal space (Yellow arrow), elongated black arrow representing bile duct and short black arrow. (400X AU) (B). Presence Group Picture + infection after 48 hours of infection. Presence of a discrete infiltration of mononuclear cells in the periportal space (yellow arrow), elongated red arrow represents the vein lobular center. (AU 400X). HE staining.

In the casein group (CAS) macroscopically liver with normal color and slightly increased in size. In microscopic analysis it was observed the presence of a moderate amount of fat in hepatocytes, without the presence of inflammatory cells (Figure 3), the groups shrimp (CAM) and Pork group (SUI) observed the presence of hepatic steatosis in the type microvesicular without the presence of inflammatory cells (Figure 4).

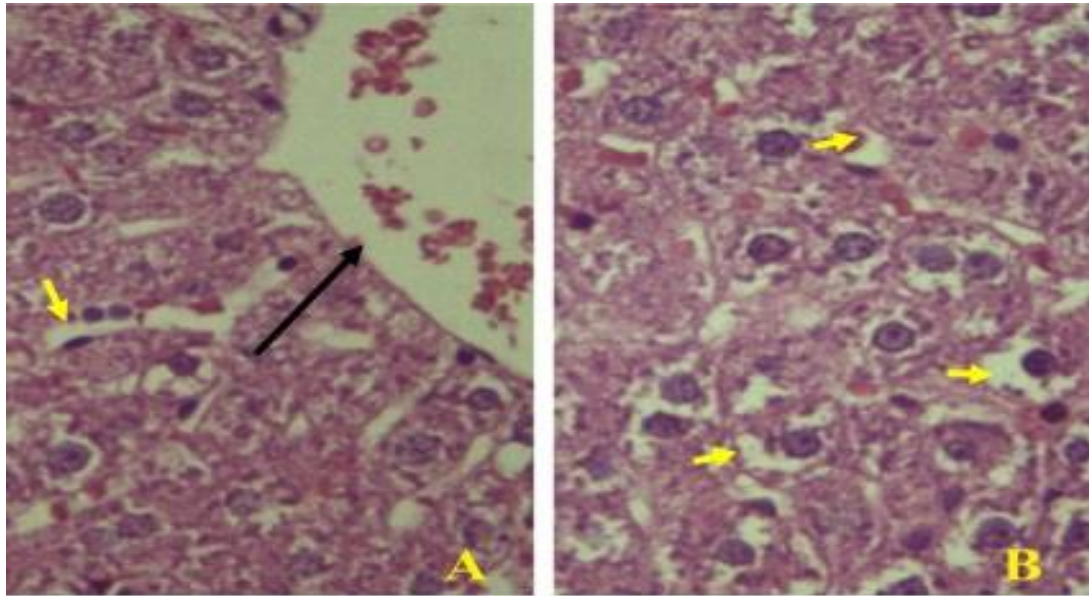


Figure 3- Photomicrograph of the liver. **(A and B)** Image of the liver tissue from the group Casein (AU 400X). **(A)** Showing the presence of a moderate amount of fat (whitish yellow regions and the short arrows), without the presence of inflammatory cells, elongated black arrow representing lobular central vein. **(B)** The presence of a moderate amount of fat (whitish yellow arrows in short regions), without the presence of inflammatory cells. HE staining.

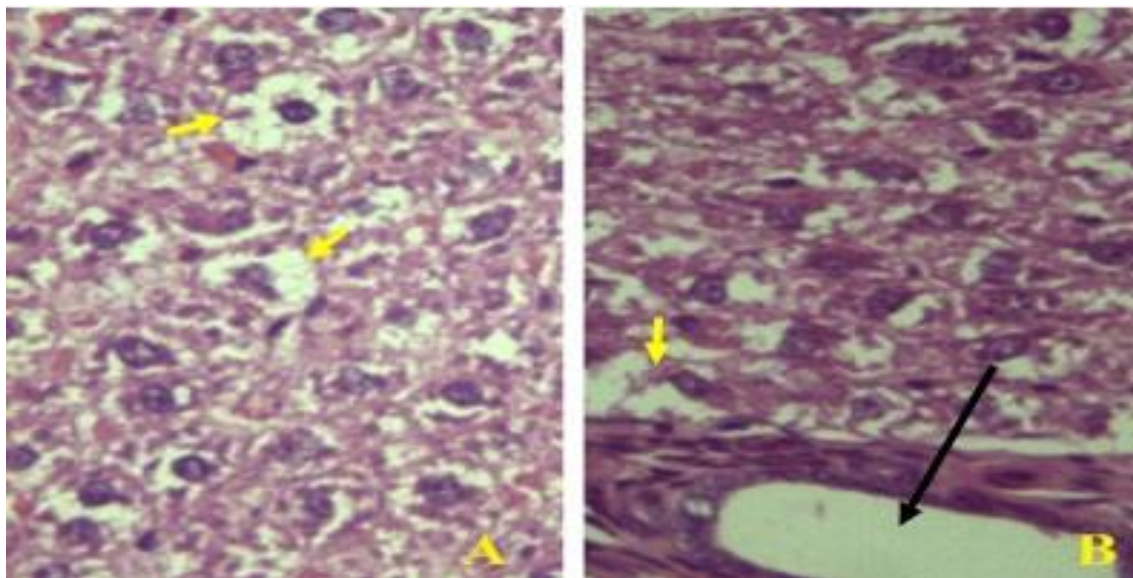


Figure 4- Photomicrograph of the liver. **(A).** Image of Shrimp group. Presence of hepatic steatosis Microvesicular type (whitish regions and short yellow arrows), without the presence of inflammatory cells (AU 400x). **(B).** Group Picture Pork, showing the presence of hepatic steatosis of Microvesicular type (whitish regions and short yellow arrows), without the presence of inflammatory cells and lobular vein center represented by the elongated black arrow (AU 400x). HE staining.

Already Casein + infection groups (CASI-6h / CASI-48h), shrimp + infection (CAMI-6h / CAMI-48h) and Pork + infection (SUIi am-6pm / SUIi-48h), it was observed the presence of infiltration mononuclear cells (CMN), such as macrophages and lymphocytes, with predominant lymphocytes and also found neutrophils (polymorphonuclear) directly proportional to the time of infection, i.e. after 6 hours of infection, it was found little CMN infiltrate the periportal area and hepatic steatosis of microvesicular and macrovesicular types. And in the groups with 48 hours of infection, with such diet above, the CMN presented more diffuse, intense, with presence also of micro and macrovesicular steatosis. As observed only in SUIi group, some areas of necrosis (Figures 5,6 and 7).

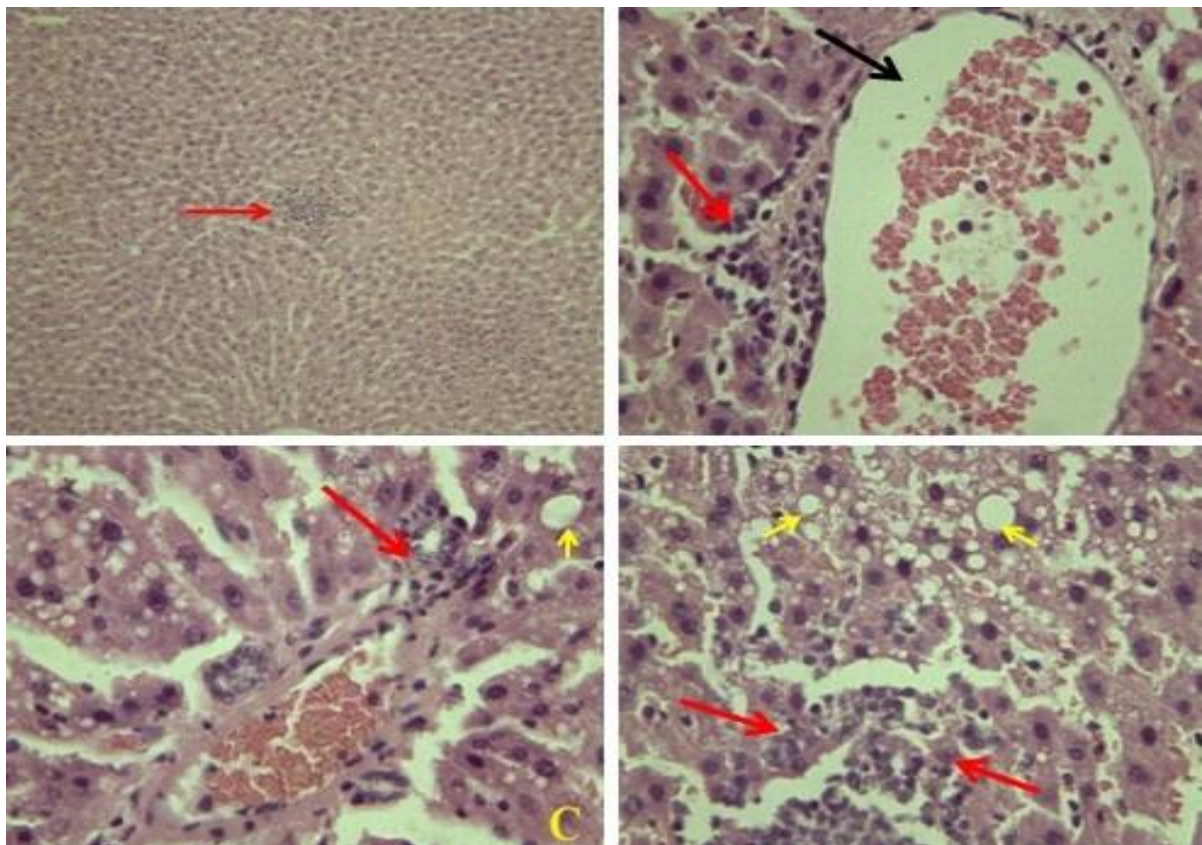


Figure 5- Photomicrograph-liver. **(A)** Group Casein + infection after 6 h of infection. It is observed in the liver parenchyma the presence of mononuclear cell infiltrates (red elongated arrow) (AU 40X). **(B)**. Group Casein + infection after 6 h of infection. It is observed in the periportal space the presence of mononuclear cell infiltrates (elongated red arrow) and the elongated black arrow lobular vein center (AU 400X). **(C)** Group Casein + infection after 48 h of infection notes the presence of diffuse infiltrate of mononuclear cells into the parenchyma (elongated red arrow) and the microvesicular steatosis types (short arrow yellow) (AU 400X). **(D)**. Group casein + 48h of infection after infection notes the presence of diffuse

infiltrate of mononuclear cells into the parenchyma (arrows elongated red) and steatosis micro and macrovesicular types (yellow short arrows) (AU 400x). HE staining.

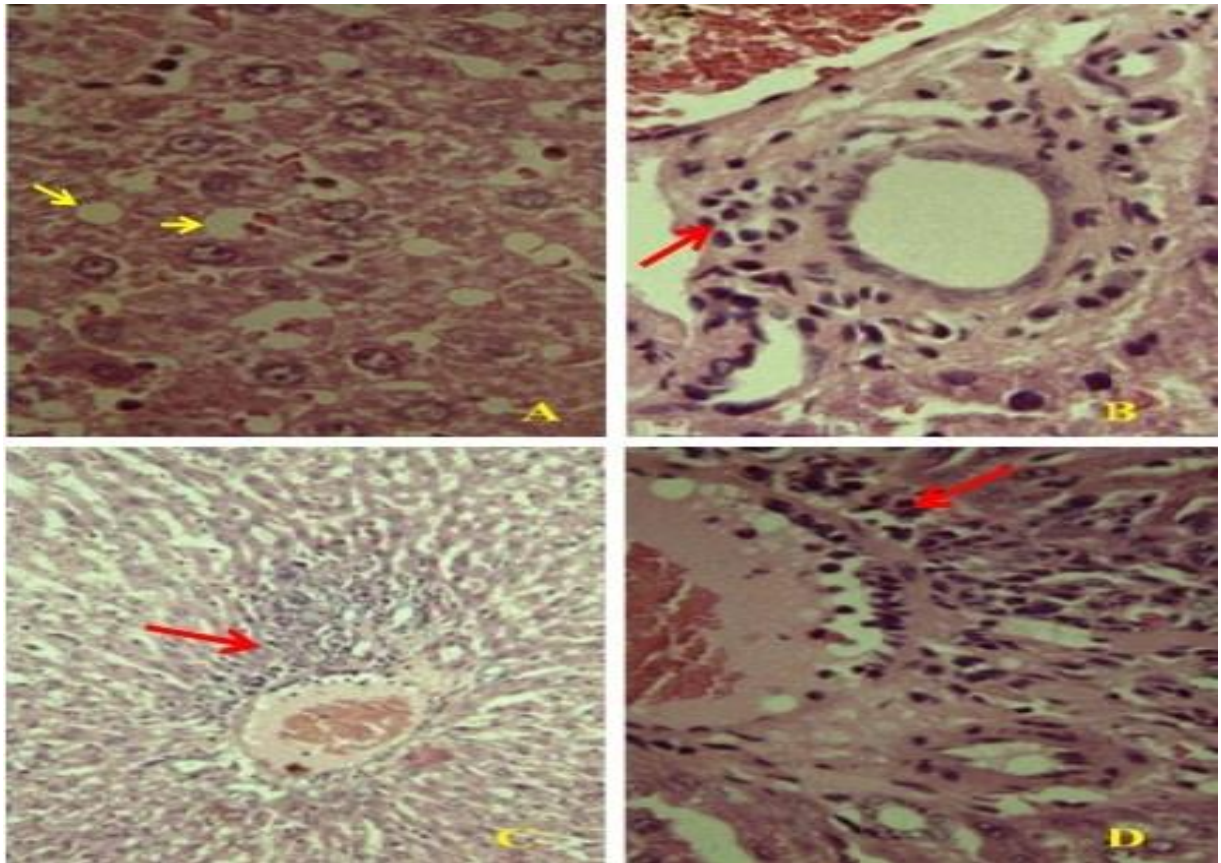


Figure 6-photomicrograph of the liver. **(A)** + Group Shrimp infection in time of 6 hours. It is observed steatosis macrovesicular (yellow short arrows) and periportal space the presence of CMN infiltrate (red elongated arrow) (AU 400X). **(B)** Group + shrimp infection in time of 6 hours. It is observed in the periportal space the presence of CMN infiltrate (red elongated arrow) (AU 400X). **(C)** Group infection in shrimp + de48 hours time. It is observed in the periportal space the presence of CMN more severe and diffuse infiltration (red elongated arrow) (AU 40X). **(D)** Group + shrimp infection in time de48 hours. It is observed in the periportal area, the presence of infiltrate and diffuse more CMN (red elongate arrow) (AU 400X). HE staining.

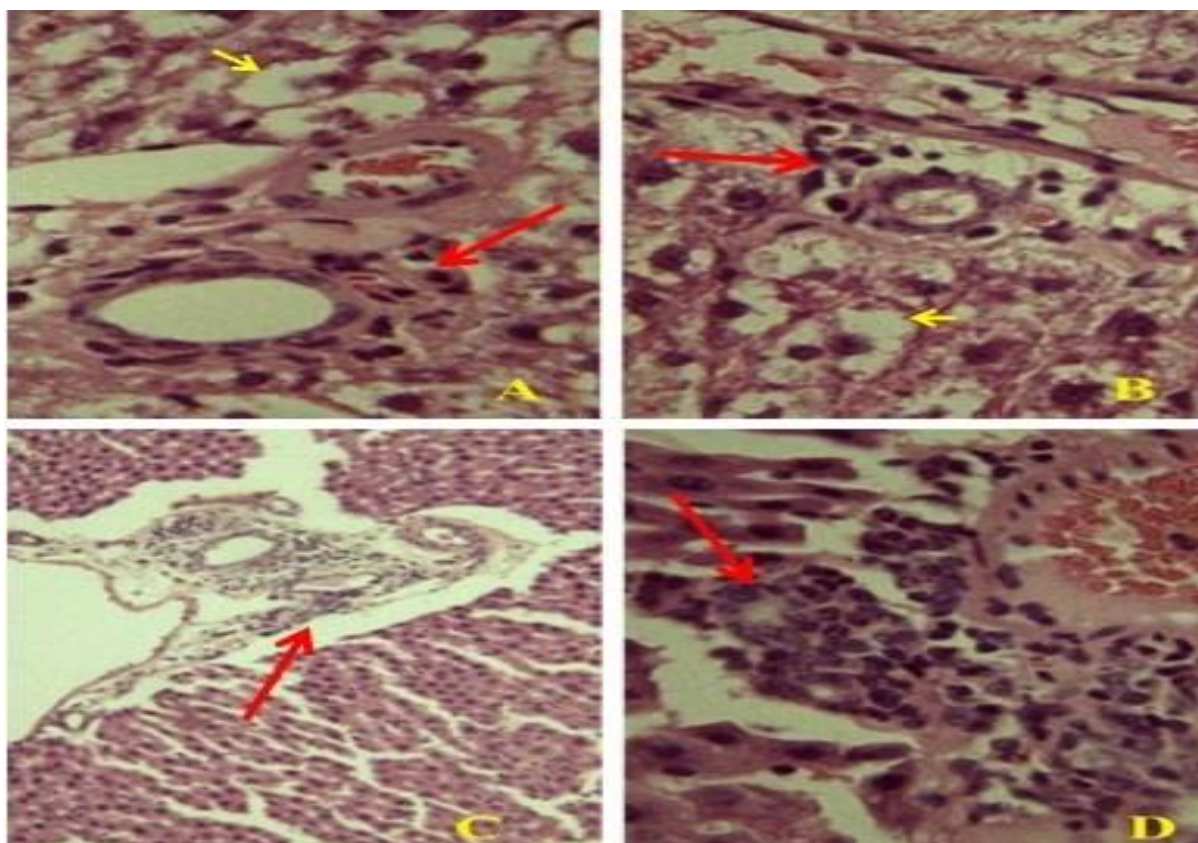


Figure 7 - photomicrograph of the liver. **(A)** Group Pork + infection after 6 hours of infection. It is observed in the periportal space the presence of CMN infiltrate (red elongated arrow) and steatosis of macrovesicular type (short arrow Yellow) (AU 400X). **(B)** Group Pork + infection after 6 hours of infection. It is observed in the periportal space the presence of infiltrate and diffuse CM (red elongated arrow) (AU 40X). **(C)** Group Pork + infection after 48 hours of infection. It is observed in the periportal space the presence of severe and diffuse infiltrate CMN (red elongated arrow) (AU 400X). HE staining.

Counting inflammatory cells

Macrophages were observed, lymphocytes, neutrophils, and plasma cells in the periportal spaces of all groups. However, there was a predominance of infiltration of mononuclear cells (CMN), mainly lymphocytes. The groups that received calorie diet showed higher CMN infiltrate.

Table 3 shows the average and standard deviation of the number of CMN according to the type of diet used. Through it there is the Presi-6h group / Presei-48h showed a lower average than the other in both times of assessed analysis (mean = 12.4 for 6 h and mean = 35.4 to 48 h). Still, it is observed that the group with the highest average of inflammatory cells at 6 h and 48 h after infection, was the SUli group (mean = mean = 83.8 and 145.0

respectively). In comparison means between the different diets after 6 h, it was found that the test was significant ($p < 0.001$), indicating that the number of inflammatory cells differs among the evaluated diets.

By comparing the diets, two by two, it was observed that the PRESI group was one having a mean inflammatory cells beneath the other being a bit and mixed caloric diet, or is rich in animal protein and vegetable protein. When comparing the means of the different diets after 48 h, it was found that the test was significant ($p < 0.001$), indicating that the CMN number between diets evaluated.

Tabela 3. Média e desvio padrão do número de células inflamatórias mononucleares (CMN).

Diets	Time		<i>p</i> -valor ²
	6 hours	48 hours	
Presence	12,4 ^a ±2,3	35,4 ^c ±5,2	<0,001
Casein	80,4 ^b ±25,2	125,8 ^d ±13,9	0,033
Shrimp	65,8 ^b ±7,2	111,4 ^d ±11,6	0,004
	83,8 ^b ±6,1	145,0 ^e ±28,5	0,007
<i>p</i> -valor ¹	<0,001	<0,001	-

¹p-valor do teste da ANOVA para comparação de média. ²p-valor do teste t de Student para amostras pareadas.^{a,b,c,d,e} Igualdade de média.

DISCUSSION

Several animal models have shown that prohibited substances from food, such as, for example, diets high in saturated fat may cause damage to liver tissue due to the increase in free fatty acids and their metabolites which are hepatotoxic leading to steatosis frames that are capable of inducing an acute inflammatory response that recruit immune cells (neutrophils, macrofacs, lymphocytes) that have the ability to cause irreversible damage this tissue as fibrosis caused in response to inflammation altering both its histology as normal operation (BRITO-JUNIOR; ESTACIO, 2013; MOBLEY et al, 2014;. Michael et al, 2015).

The abnormal accumulation of lipids in the liver is histologically visible in the cytoplasm of hepatocytes, which affects 5% to 40% of the body weight, is considered the most common liver metabolic disorder, resulting in imbalance between the synthesis of

triglycerides by an accumulation of acids fatty acids, and their low discharge in the form of lipoproteins (Angle, 2002).

Observed after 30 days of high calorie diet based on animal protein such as pork, shrimp and casein that the liver tissue of animals fed these diets agreements with the findings in histopathology, tissue was some changes in their morphology such as steatosis varying according to the different diets. The animals treated with diets swine meat (SUI), shrimp (CAM) or casein (CAS), being diets rich in lipids (9.85g%, 9.80g%, 9.97% respectively), presented steatosis ranging from moderate to severe, to compare with the nutritional group control group only fed the Presence feed (PRES), which had completely preserved liver tissue, to be a little calorie and mixed diet, ie no representative fat content (4.0 g%), used only for maintenance of rodents.

These findings suggest that these remosas diets because they are high in fat increase the accumulation of fatty acids in the liver, causing fatty liver damaging the tissue, some studies evaluating low acting diets, medium and high calories, also contact steatosis in the liver of rats Wistar males were fed such diet for more than four weeks, in which this abnormal fat accumulation was directly proportional to the amount of saturated fats and the longer the treatment time with a diet rich in saturated fat can lead to fibrosis frames in tissue (TOSHIMISU et al., 2007, ISHIMOTO et al, 2013.). In some animal models evaluating the performance of the diet casein-based (AIN-93) in the induction of frames of hepatic steatosis observed in the casein diet group (CAS) that showed a moderate level of fat in the liver, corroborating studies by Silva et al., (2008) and Bueno et al., (2010) who observed that liver of animals fed with AIN-93 also showed different degrees of macrovesicular steatosis. This steatosis frame induced by such a diet is probably directly related to their composition, to be quite rich in macronutrients, particularly carbohydrates and proteins, sulfur amino acids or lipotróficos agents. It seems to induce changes related to body weight gain and liver lipid deposition.

Some microorganisms and cellular components are resistant to cooking and consequently can provoked stimulating cells of the immune system humoral and / or cellular (SILVA, 2007; Rai et al, 2012;. BRITO-JUNIOR and ESTÁCIO, 2013). To evaluate the relationship between diet and inflammatory process used an experimental model of infection by Salmonella Typhimurium (LIMA-Filho et al., 2010). These bacteria have the ability to cause damage to the liver tissue as it is this body that they are kidnapped and survive within not activated macrophages (PORTILLO, 2001; GASEM et al. 2003;. LIMA-Filho et al, 2010)

Was observed in infected nutrition group (Presi-6h / Presi-48h; CASI-6h / CASI-48h; cami-6h / CAMI-48h, SUli am-6pm / SUli-48h) in two stages of infection beyond steatosis, the presence a mononuclear cell infiltrate (CMN), such as macrophages and lymphocytes, featuring an acute inflammatory process, being more intense after 48h of infection when compared with the group of 6H, probably due to greater exposure by the bacteria in the animal's body.

Worley et al, (2006).; Tam et al, (2008).; Wu et al (2012) reported that *Salmonella Typhimurium* have a high capacity to replicate and survive in hepatocytes inducing an inflammatory response characterized by the release of pro-inflammatory cytokines, due to the stimulation of lipopolysaccharide (LPS) present in the bacterial cell wall, which activate macrophages and T lymphocyte stimulating the recruitment of leukocytes to the site of infection.

Because of this bacterial species has a preference for hepatic tissue and have survival mechanisms inducing recruitment of inflammatory cells to the infection site to destroy the pathogen, suggest that the presence of these cells in the liver of animal PRESI-6h / PRESI groups -48h; CASI am-6pm / CASI-48h; CAMI-6h / CAMI-48h, SUli am-6pm / SUli-48h is directly related to this microorganism. Furthermore, according to the analysis, the statistical SUli-6h group / SUli-48h within two days of infection by *Salmonella typhimurium* greater CMN number when compared with the other groups and according to histopathological analysis observed the presence of some areas necrotic liver tissue only this group, in being compatible with the study Ralph et al (2014), evaluated the inflammatory response induced by *Salmonella Typhimurium*, in which the group treated with this bacterial species had a large number of lymphocytes, the presence of vacuolation of hepatocytes and light necrosis signs confirming the role of this bacterium in the liver, suggesting that this bacterium has the ability to induced a worsening of steatosis frame due to production of toxins, thus increasing more defense cells recruitment.

CONCLUSION

From the results obtained, we conclude that:

- Hypercaloric diets or remosas as shrimp, pork and casein for being high in fat are capable of causing damage to liver tissue leading to conditions of steatosis;

- Infection by the bacterium *Salmonella typhimurium* was able to induce recruitment of inflammatory cells into the liver tissue characterizing an acute inflammation;
- Infection by the bacterium *Salmonella typhimurium* is involved in the recruitment of immune cells to the site of infection due to production of toxins by increasing the number of inflammatory cells particularly after 48 hours of infection;
- *Salmonella Typhimurium* induced hepatic necrosis and increased presence of inflammatory cells in the treated group based diet is pork because this diet is quite greasy damaging the fabric by having mechanisms favoring recruitment of these cells to the site and producing substances capable of damage the tissue.

REFERENCE

- ANGLE P. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* N. 346, v. 16, p. 1221-31.
- Adams et al. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease Increases risk of death Among Patients with diabetes: a community-based cohort study. *Am J Gastroenterol.* n. 105, p. 1567-73.
- Alcoforado, C.L.G.C. (2010). Between scientific and popular: knowledge and practices of nursing staff and clients with wounds. Master [Master].
- BEGOSSI, A., Hanazaki, N. & RAMOS, R.M. (2004). Food chain and the Reasons for fish food taboos Among Amazonian and Atlantic Forest fishers (Brazil). *Ecol. Appl.* n. 14, v. 5, p. 1334-1343.
- BUENO, N.B. et al. (2010). Fatty acid profile in liver of rats with induced steatosis AIN-93 diet attenuated by partial substitution of soybean oil for diheptanoin and triheptanoin. *Arq Bras Endocrinol Metab.* v. 54, n.6, p. 584-587, 2010.
- BRITO JR, L. C., ESTACIO, A.G. (2013). food taboos in medicine: a hypothesis for the pathophysiology related to remosos food. *Rev. Assoc. Med. Bras.* [Online]. v. 59. n. 3, p. 213-216.

BRUNA, S.Z., LUCIANO, N. S., MARCIA K. A. (2013). Liver Disease Greasy alcoholic And Its Relationship With Metabolic Syndrome In Preoperative In Patients Undergoing Bariatric Surgery. *Rev. Assc. Med. Bras.* n.59, v.2, p.155-160.

COSTA NETO, E. M. (2000). Restrictions and food preferences for Conde Municipality of fishing communities, State of Bahia, Brasil. *Rev Nutr.* v. 13, p. 117-265.

CUNNINGHAM-rundles, S., McNeeley, DF, MOON, A. (2005). Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J. Allergy ClinImmunol.* n.115, p.1119-28.

DUFFY, P.H., et al. (2002). Effect of the AIN-93M Purified Diet and Dietary Restriction on Survival in Sprague-Dawley Rats: Implications for Chronic Studies. *J.Nutr.* v. 132, p.101-107.

GASEM, MH, Keuter, M., DOLMANS, W.M.V., VAN DER, V.E.N.-JONGEKRIJG, J., DJOKOMOELJANTO, R., et al. (2003). The persistence of Salmonella in the blood and bone marrow: a randomized clinical trial comparing ciprofloxacin treatments and chloramphenicol against controlled enteric fever. *Antimicrob Agents Chemother.* V.47, p. 1727-1731.

HUBY, R.D.J., Dearman, R.J., KIMBER, I. (2000) Why are some proteins allergens? *ToxicolScienc.* v. 55, p. 235-246.

ISHIMOTO, T., Lanaspa, M.A. Rivard, C. J., et al. (2013). High-fat and high-sucrose (western) diet induces steatohepatitis que is dependent on fructokinase. *Hepatology.* n.58, v.5, p. 1632-1643.

KRAUSE, M. Mahan, L. K., Escott-STUMP, S. (2002). *Food, Nutrition and Diet Therapy.* 10th ed, Brazil: Editora LTDA Roca.

LAM, B., Younossi, Z.M. (2010). Treatment options for nonalcoholic fatty liver disease. *Adv Ther Gastroenterol.* v.3, p. 121-37.

LIMA-SON J.V.M., VIEIRA, L.Q., ARANTES, R.M.E., NICOLI, J.R. (2004). Effect of the *Escherichia coli* EMO on experimental infection by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium in gnotobiotic mice. *Braz J Med Biol Res.* N. 37, p. 1005-1013.

LIMA-SON, J.V.M., PATRIOT, J.M., SILVA, A. F. et al. (2010). Proteins from latex of *Calotropis procera* Prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Ethnopharmacology.* v. 129, p.327-334.

MARQUEZ, M. F., MORALES, M.M.R., POUSAILLE, C.C., MIRAS, A.G., MARTIN M. C., J. V. Albendea et al. (2008). Prevalence and associated factors to non-alcoholic steatohepatitis in obese Patients Subjected to bariatric surgery. *Cir Esp.* V.84, p. 313-7.

Mende-SÁNCHEZ, N., Arrese, M., ZAMORA-VALDES, D., URIBE, M. (2007). Current Concepts in the Pathogenesis of Nonalcoholic Liver Disease Fatt. *Live Int,* v. 27, p. 423-33.

MICHAEL, D.R.C., BROOKS, M.R.G. et al. (2015). Western steatosis Liver Induced by Diet And Changes In Transcriptome Liver In Adult Mice Brown-Norway. *BMC Gastroenterol.* n.15, p. 151.

MOBLEY, C. B., TOEDEBUSCH, RG, LOCKWOOD, C. M., Heese, A.J., ZHU, C., KRIEGER, A. E., et al. (2014). Adaptogens herbs combined with protein fractions of bovine colostrum and chicken egg yolk reduce liver TNF-alpha expression and protein carbonylation in the western diet in rats. *Nutr. Metab.* n.11, p. 19.

OHL, M.E., Miller, S.I. (2001). *Salmonella*: A model for bacterial pathogenesis. *Annual Review of Medicine.* V.52, p.259-74.

RAI, M. K., CORDELL, G. A., MARTINEZ, JL, Marinoff M, Rastrelli, L. (2012). *Medicinal plants: biodiversity and drugs.* CRC Press.

SILVA, A. L. Food of people: food preferences and taboos among bordering the Middle Rio Negro (Amazonas, Brazil). *Rev Antropol.* V.50. P. 125-793, 2007.

REEVES, P. G. ; NIELSEN, F. H. ; Fahey, GC (1993). AIN-93: Purified Diets for Laboratory Rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee Writing on

the reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *Journal of Nutrition*, Vol. 123, no. 11, p. 1939-51.

ROCK, K. L., Latz, E., ONTIVEROS, F., KONO H. (2010). The Sterile Inflammatory Response. *Annu. Rev. Immunol.* v. 28, p. 321-42.

SEIBLD, F. (2005). Food-induced immune responses of the origin bowel disease? *Digestion*. V.71, n.4, p.251-60.

SILVA, A. L. (2007). Food of people: food preferences and taboos among bordering the Middle Rio Negro (Amazonas, Brazil). *Rev Antropol. São Paulo, USP.* V.50. P. 125-793.

SILVA, M.A.F., ATAIDE, T. R., OLIVEIRA SL, SANT'ANA, A.E.G., CABRAL, J.R.C.R, BALWANI, M.C., et al. (2008). hepatoprotective effect of dedieptanoína chronic consumption and triheptanoin against steatosis in rats. *Arq Bras Endocrinol Metab.* v. 52, p.1145-55.

SHINONI, M. I. (2006). Hepatica physiology. *Gaaz. Med Bahia*, V.76, n. 1, p. 5-9.

TARGHER, G., DAY, C.P., BONORA, E. (2010). Risk Cardiovascular Disease in Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *N Engl J Med.* N. 363, v. 14, p.1341- 1350.

Zafrani, E. S. (2002). Non-Alcholic Fatty Liver Diseas: In Emerging Pathological Spectrum. *Virchows Arch.* v.444, n.2, p. 3-12

ZHANG, S. P., KINGSLEY, R. A., SANTOS, R. L. ANDREWS-Polymenis, H., RAFFATELLU, M., Figueiredo, J., NUNES, J., Tsolis, R. M., Adams, L. G., AND Bäumler, A. J. (2003). Molecular pathogenesis of Salmonella enterica serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infect. Immun.* V.71, p.1-12.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética no uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da UFPE (CEUA-UFPE).



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Ofício nº 77/14

Recife, 01 de dezembro de 2014.

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho**
Departamento de patologia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº:23076.015913/2012-94

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Influência de proteínas de diferentes origens animais sobre o controle da infecção causada por *Salmonella typhimurium* em ratos Wistar.**"

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de nutrição UFPE; Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Idade: 30 a 40 dias; Peso: 250g; Sexo: machos; Nº total de animais: 25; O processo encontra-se aprovado, mas houve solicitação de mais animais para continuidade do projeto.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584