



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação Em Patologia
Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE



Efeito em Longo Prazo da Desnutrição Protéica Pós-Natal Imediata Sobre a Função de Macrófagos em Ratos

QUELIANE GOMES DA SILVA CARVALHO

**RECIFE
2012**

QUELIANE GOMES DA SILVA CARVALHO

**Efeito em Longo Prazo da Desnutrição Protéica Pós-Natal
Imediata Sobre a Função de Macrófagos em Ratos**

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.

Linha de Pesquisa: Patologia da nutrição e seus distúrbios.

Projeto de Pesquisa: Desnutrição perinatal e seu desfecho sobre a imunidade de ratos ao longo da vida: um estudo da programação da relação macrófago-serotonina

Orientadora: Dr^a. Wylla Tatiana Ferreira e Silva.

Co-Orientador: José Cândido de Souza Ferraz Junior.

**RECIFE
2012**

Catálogo na fonte
Bibliotecária Andréa Marinho, CRB4-1467

C331e Carvalho, Quelianne Gomes da Silva.
 Efeito em longo prazo da desnutrição protéica pós-natal imediata sobre a função de macrófagos em ratos / Quelianne Gomes da Silva Carvalho. – Recife: O autor, 2012.
 85 folhas : il. ; 30 cm.

 Orientador: Wylla Tatiana Ferreira e Silva.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2012.
 Inclui bibliografia e anexos.

 1. Desnutrição. 2. Macrófago alveolar. 3. Óxido nítrico. 4. Viabilidade. 5. Ratos. I. Silva, Wylla Tatiana Ferreira e (Orientador). II. Título.

616.39 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-078)



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
Centro de Ciências da Saúde - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE
Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo
Fone/Fax: (81) 2126.8529
<http://www.pospat.ufpe.br>

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

AUTORA: QUELIANE GOMES DA SILVA CARVALHO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

**NOME DA DISSERTAÇÃO: “EFEITO EM LONGO PRAZO DA DESNUTRIÇÃO
PROTEICA PÓS-NATAL IMEDIATA SOBRE A FUNÇÃO DE MACRÓFAGOS EM
RATOS”**

ORIENTADOR: PROFA. DRA. WYLLA TATIANA FERREIRA E SILVA

DATA DA DEFESA: 27 DE FEVEREIRO DE 2012.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Profa. Dra. Cybelle Rolim de Lima

Prof. Dr. Marco Antônio Fidalgo Amorim

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

R E I T O R

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE- REITOR

Prof. Sílvio Romero Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Sousa Ramos

D I R E T O R DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof^a. Catarina de Oliveira Neves

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Mário Ribeiro de Melo Júnior

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof^a Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

R E C I F E

2012

Agradecimentos

Agradecer significa mostrar, demonstrar gratidão, tem como sinônimos as palavras recolher, recompensar e retribuir.

De fato, espero ter demonstrado a devida gratidão durante todo o percurso do Mestrado aos meus orientadores Wylla e José Cândido, saibam que sem seu apoio, amizade, direcionamento, otimismo e competência este trabalho jamais teria sido finalizado.

Nestes 2 anos de estudo pude “recolher” grandes amizades, que sem dúvida foram fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional. Sendo injusta com todos aqueles que me ajudaram, irei citar alguns nomes que me acompanharam de forma especial neste trajeto: Jakeline, Rebeca, João e Sueli, sem o apoio de vocês este trabalho teria sido menos agradável e bem mais árduo.

Muito obrigada a todos que fazem o programa de Pós-graduação em Patologia e a Pós-graduação em Nutrição. Ao Profº Nicodemos pelo apoio nos diversos momentos críticos de meus experimentos, aos colegas da turma 2010 cujas aflições científicas por tantas vezes foram compartilhadas e a todos que fazem parte da secretaria, sempre sorridentes e dispostas a nos ajudar no que for preciso. Ao profº Raul pela preocupação e bons conselhos.

Agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

Preciso também agradecer o apoio de Drº França, Ana e Srº José em meus experimentos, meus animais foram respeitados e bem cuidados, também pelo compromisso e respeito que vocês têm pelo trabalho desenvolvido.

A minha família e a Deus, pilares e base de minha existência. Incondicionais no amor e apoio, sempre presentes e sei que torcendo pela minha felicidade.

O poeta e escritor Fernando Pessoa escreveu a seguinte frase: “Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Muito obrigada a todos que direta ou indiretamente me ajudaram e me ajudam a construir a cada dia o meu palácio.

***Uma paixão forte por qualquer objeto
assegurar  o sucesso, porque o desejo pelo
objetivo mostrar  os meios.***

William Hazlitt

Resumo

Manipulações nutricionais em períodos críticos de desenvolvimento, que levam à desnutrição, promovem consequências negativas em longo prazo no funcionamento do sistema imunológico. O macrófago atua em diferentes momentos da resposta imune, participando tanto da resposta inata quanto da resposta imune adaptativa, contudo, ainda são poucos os estudos que se dedicam a esclarecer o comportamento desta célula em situações onde houve privação de nutrientes em períodos precoces da vida. Tais informações poderiam ajudar a esclarecer o comportamento do sistema imune submetido à privação nutricional bem como as possíveis consequências destas mudanças na homeostase de um organismo. No artigo “Desnutrição pós-natal imediata altera a viabilidade e função dos macrófagos em ratos”, o impacto da manipulação nutricional no período pós-natal imediato em macrófagos alveolares de ratos foi avaliado quanto à função, quantidade e viabilidade em animais adultos. Ratos foram amamentados por mães alimentadas com uma dieta purificada deficiente em proteínas ou por uma dieta multideficiente semelhante a consumido durante a década de 1960 pelas populações desnutridas no nordeste do Brasil, chamada de Dieta Básica Regional (DBR). Quando adultos foram avaliados quanto aos parâmetros hematológicos e suas células broncoalveolares foram examinadas quanto a funcionalidade e viabilidade. O presente estudo mostrou que não ocorreram modificações nos valores hematológicos das séries vermelha e branca, bem como não alterou o número de células totais no lavado broncoalveolar. O estudo da cultura celular revelou que ambas, as manipulações da dieta indicaram diminuição da viabilidade e da função da célula. Este último foi indicado pela redução da capacidade do macrófago em produzir NO. Em conclusão, as manipulações dietéticas ocorrida do período pós-natal imediato geram alterações permanentes nos macrófagos de ratos na vida adulta. Novos estudos ajudarão a desvendar os mecanismos pelos quais a desnutrição em períodos críticos de desenvolvimento prejudica o equilíbrio do sistema imune. O entendimento aprofundado destes mecanismos poderá, quem sabe, no futuro, permitir a prevenção dos efeitos deletérios da má nutrição no início da vida, quer seja por meio de intervenção medicamentosa, nutricional ou com mudanças dos hábitos de vida.

Descritores: Desnutrição, Macrófago Alveolar, Óxido Nítrico, Viabilidade, Ratos.

Abstract

Nutritional manipulation during critical periods of development, leading to malnutrition, promote long-term negative consequences on the immune system. The macrophage acts on different moments in the immune response, participating in the innate response as well as in the adaptive immune response, however, few studies have devoted to clarify the behavior of this cell in situations where nutrient deprivation happens in early periods of life. Such information would help clarify the behavior of the immune system subjected to nutritional deprivation as well the possible consequences of these changes in the homeostasis of an organism. In the paper "immediate postnatal malnutrition alters the viability and function of macrophages in rats," the impact of nutritional manipulation during the immediate postnatal rat alveolar macrophages was evaluated in terms of function, number and viability in adult animals. Rats were breastfed by mothers that were fed with a purified diet deficient in proteins or by diet deficient in many aspects, similar to the one that were consumed in the 60's by the malnourished population in the northeast of Brazil, called Regional Basic Diet (RBD). When adults were evaluated the hematologic parameters and its bronchoalveolar cells were examined as for its functionality and viability. The present study showed that it didn't occurred modifications in the hematologic values concerning the red and white series. The cell culture analysis revealed that both diet manipulations indicated a decrease in the viability and the function of the cell. This last one was indicated by the reduction of the macrophage capacity of producing NO. Worth mentioning that the different tests of cellular viability made indicated different answers from these cells, which indicates that there has been a structural adaptation to the new nutritional conditions, but its cellular machinery, however, were injured. In conclusion, dietary manipulations that occurred in the immediate postnatal period produce permanent changes in the macrophages of rats in adulthood. Further studies will help unravel the mechanisms by which malnutrition during critical periods of development affect the balance of the immune system. The deeper understanding of these mechanisms could, perhaps, in future, to prevent deleterious effects of malnutrition in early life, whether with through medication, nutrition or changes in lifestyle.

Descriptors: Malnutrition, Alveolar Macrophage, Nitric Oxide, viability, rats.

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição centesimal da dieta Labina^{a,c}

Tabela 2. Composição das dietas normo e hipoprotéica, com adaptações, à base de caseína, segundo Reeves; Nielsen; Fahey (1993).

Tabela 3. Composição centesimal da Dieta Básica Regional (DBR) segundo Teodósio *et al.*, (1990). A DBR é deficiente em vitaminas hidro e lipossolúveis

Lista de figuras

Figura 1: Diagrama do estudo experimental. Separação da prole em grupos conforme a dieta recebida pela mãe durante a lactação. Foram utilizados 29 animais para a realização deste estudo ao final do período de 360 dias. Grupo controle (n=13), grupo caseína 8% (n=6), grupo DBR (n=10).

Artigo Original:

Figura 1: Valores hematológicos da série vermelha de ratos. Caseína 17%: grupo normonutrido (N=13), caseína 8%: grupo desnutrido com dieta contendo 8% de caseína (N=6). DBR: grupo desnutrido com dieta contendo 8% de proteína, principalmente de origem vegetal (N=10). HC: hemácias, HB: hemoglobina, HT: hematócrito, VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, RDW: red cell distribution width. Não houve diferenças entre os grupos. (two-way ANOVA seguido de "Bonferroni posttest").

Figura 2 Valores hematológicos da série branca de ratos. Caseína 17%: grupo normonutrido (N=13), caseína 8%: grupo desnutrido com dieta contendo 8% de caseína (N=6). DBR: grupo desnutrido com dieta contendo 8% de proteína, principalmente de origem vegetal (N=10) **A:** número total de leucócitos/mm³ (one-way ANOVA seguido de Tukey post test). **B:** contagem diferencial dos leucócitos, valores em porcentagem (two-way ANOVA seguido de "Bonferroni posttest"). Não houve diferenças entre os grupos.

Figura 3: Análise da integridade da membrana celular das células do LBA por citômetro de fluxo. Caseína 17%: grupo normonutrido (N=13), caseína 8%: grupo desnutrido com dieta contendo 8% de caseína (N=6). Não ocorreu diferença estatística entre os grupos. (one-way ANOVA seguido de Tukey post test).

Figura 4: Determinação da porcentagem de macrófagos viáveis do LBA por trypan blue. Caseína 17%: grupo normonutrido (N=13), caseína 8%: grupo desnutrido com dieta contendo 8% de caseína (N=6). Não ocorreu diferença estatística entre os grupos (one-way ANOVA seguido de Tukey post test).

Figura 5: Produção de formazan no sobrenadante da cultura de macrófagos alveolares de animais com 360 dias pela técnica de redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo de difenil tetrazólio (MTT) ao formazan. Caseína 17%: grupo normonutrido (N=13), caseína 8%: grupo desnutrido com dieta contendo 8% de caseína (N=6). * diferença significativa entre o grupo caseína 8% e o grupo normonutrido com $p < 0.05$ (two-way ANOVA seguido de "Bonferroni posttests"). ** diferença significativa entre o grupo DBR e o grupo caseína 8% com $p < 0.05$ (two-way ANOVA seguido de "Bonferroni posttests"). Vale salientar que as diferentes concentrações de LPS não conferiram variações na viabilidade dos macrófagos alveolares de ambos os grupos.

Figura 6: Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria das células do LBA por citômetro de fluxo. Caseína 17%: grupo normonutrido (N=13), caseína 8%: grupo desnutrido com dieta contendo 8% de caseína (N=6). Os grupos desnutridos apresentam valores significativamente baixos de potencial transmembrânico da mitocôndria (* $P < 0.0001$, one-way ANOVA seguido de Tukey post test), alteração indicativa de fase inicial apoptótica.

Figura 7: Produção de nitrito do sobrenadante da cultura de macrófagos alveolares de animais com 360 dias. Os valores estão expostos em média $\pm$ desvio padrão da média, com n=13 para controle, n=6 para caseína 8% e n=10 para DBR. * diferença significativa entre o grupo caseína 8% ou DBR e o grupo controle com $p < 0.05$ (two-way ANOVA seguido de "Bonferroni posttests"). ** diferença significativa entre o grupo DBR e o grupo caseína 8% com $p < 0.05$ (two-way ANOVA seguido de "Bonferroni posttests"). Vale salientar que as diferentes concentrações de LPS não conferiram variações na produção de nitrito do sobrenadante da cultura dos macrófagos alveolares de ambos os grupos.

Lista de Siglas

DBR: dieta básica regional

LON: liberação de óxido nítrico

LPS: lipopolissacarídeo

MA: macrófago alveolar

NO: óxido nítrico

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3. MÉTODOS.....	26
5.1 ÁREA.....	26
5.2 PERÍODO DE REFERÊNCIA.....	26
5.3 DESENHO DO ESTUDO.....	26
5.4 PROCEDIMENTOS ÉTICOS.....	27
5.5 MANIPULAÇÃO NUTRICIONAL E FORMAÇÃO DOS GRUPOS.....	27
5.5.1 <u>Divisão dos grupos experimentais</u>	27
5.5.2 <u>Procedimentos de coleta e realização do ensaio experimental</u>	31
5.5.2.1 <i>Obtenção das amostras de sangue periférico e realização do hemograma</i>	31
5.5.2.2 <i>Obtenção do lavado broncoalveolar</i>	32
5.5.2.3 <i>Contagem de células totais do lavado broncoalveolar</i>	32
5.5.2.4 <i>Análise da integridade da membrana celular das células do LBA</i>	32
5.5.2.5 <i>Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria</i>	33
5.5.2.6 <i>Cultivo das células do LBA</i>	33
5.5.2.7 <i>Incubação das células cultivadas com diferentes concentrações de lipopolissacarídeo (LPS) e avaliação de seu efeito sobre a liberação de óxido nítrico</i>	34
5.5.2.8 <i>Análise da viabilidade celular pela técnica de redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- brometo de difenil tetrazólio (MTT) ao formazan</i>	35
5.6 MÉTODO DE ANÁLISE.....	35
6. RESULTADOS — ARTIGO ORIGINAL.....	36
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
8. REFERÊNCIAS.....	69

APÊNDICE A- Gráfico da curva ponderal dos animais em estudo.....	74
ANEXO A: Carta de Anuência.....	75
ANEXO B- Carta de aprovação do Comitê de Ética.....	76
ANEXO C- . Declaração de autorização do uso do laboratório do HC/PE.....	77
ANEXO D- Submissão do artigo original para a revista The Journal of Nutrition.....	78
ANEXO E - Normas para publicação da revista The Journal of Nutrition.....	79

1. APRESENTAÇÃO

Os índices de fome no mundo vêm diminuindo desde 1990, na última década a proporção de pessoas desnutridas no mundo diminuiu, ligeiramente (FAO 2010). No entanto, vinte e seis países ainda apresentam níveis de fome que são preocupantes (GHI, 2011). A desnutrição é um dos índices apurados no levantamento da fome do mundo, sendo um distúrbio internacionalmente reconhecido como um importante problema de saúde pública (SCHWEIGERT; SOUZA; PERRY, 2009) devido a sua magnitude em esfera mundial e consequências desastrosas para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência dos indivíduos (MONTE, 2000). No Brasil, a população desnutrida na década de 90 era de 11%, já entre os anos de 2005 e 2007 esse valor passou a ser de 6% (GHI, 2011).

É incontestável o papel fundamental da nutrição para o crescimento e desenvolvimento saudável do organismo. Por isso, uma manipulação nutricional que resulte em uma dieta deficiente, e que é oferecida em períodos críticos de formação (pré-natal e pós-natal), promoverá falhas nos sistemas orgânicos em desenvolvimento (LUCAS, 1994). Mesmo após a introdução de uma dieta adequada, os sistemas que foram acometidos podem não se adaptar a nova condição, o que poderia ocasionar uma diminuição do potencial para longevidade e / ou aumento da suscetibilidade a doenças metabólicas (HANSON et al, 2011; GODFREY et al, 2010; SLOBODA et al, 2009; GLUCKMAN et al, 2009).

A desnutrição é a principal causa de caráter não-hereditária de imunodeficiência no mundo, e são bem documentados seus efeitos agudo e crônico nas respostas imunológicas, não sendo claro, contudo, de que forma tais efeitos são desencadeados (SCRIMSHAW, 2003). Estudos realizados com animais demonstram que o ambiente nutricional inadequado nos períodos pré-natal e pós-natal poderiam conferir modificações duradouras na resposta imune, predispondo os indivíduos à doença (FERREIRA-e-SILVA et al, 2009; PRESTES-

CARNEIRO et al, 2006). Sabe-se que a maturação do sistema imunológico inicia a partir das primeiras semanas de vida pré-natal, sendo a competência imunológica adquirida gradualmente após o nascimento tanto em humanos quanto em animais (SPENCER et al, 2006)

As células do sistema imunológico são responsáveis pelo combate a microorganismos invasores, remoção de células mortas e detritos celulares bem como pelo estabelecimento da memória imunológica (SCHULENBURG; KURZ; EWBANK, 2004). Neste sentido, o macrófago, que é a forma tecidual do monócito, participa da resposta imune inata (primeira defesa do organismo com atuação imediata contra qualquer agente e não determina uma imunidade permanente, apesar de poder agir por vários dias) e adaptativa (reação específica para cada antígeno, variando quanto à qualidade e à intensidade) por meio da liberação de diversos mediadores químicos, tais como radicais livres de oxigênio e nitrogênio, proteases e hidrolases, fazendo parte importante da defesa primária e da memória imunológica de um indivíduo (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2001).

Apesar do conhecimento a cerca da diversidade funcional do macrófago, ainda são incipientes os estudos relativos às implicações da manipulação nutricional gerando a desnutrição, em períodos iniciais de desenvolvimento, para a resposta imunológica de um organismo. Sabe-se, no entanto que condições nutricionais inadequadas nos períodos pré-natais e pós-natais podem conferir modificações em longo prazo, predispondo os indivíduos a uma grande variedade de doenças (LUCAS, 1994).

A melhor compreensão de como a nutrição interfere em parâmetros hematológicos, imunológicos e no maquinário celular, possibilita a visualização dos mecanismos pelos quais a manipulação nutricional pode influenciar na ativação e/ou inibição da resposta imune. Deste modo, o presente estudo busca esclarecer de que forma o macrófago pode ter sua atividade

modificada por meio da influência de condições nutricionais enfrentadas no início de sua vida.

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar as consequências em longo prazo da desnutrição protéica pós-natal imediata sobre a função de macrófagos alveolares de ratos adultos. Os objetivos específicos deste trabalho consistiram em analisar de forma quantitativa e qualitativa as células do sangue periférico e do lavado broncoalveolar de ratos adultos submetidos a desnutrição protéica durante a lactação; quantificar a liberação do óxido nítrico em cultura *in vitro* do lavado broncoalveolar de ratos adultos submetidos a desnutrição protéica durante a lactação e verificar a viabilidade de macrófagos de animais normonutridos e desnutridos incubados com diferentes concentrações de lipopolissacarídeo (LPS). As seguintes hipóteses foram propostas: ocorre comprometimento quantitativo e qualitativo dos macrófagos broncoalveolares de ratos adultos submetidos a desnutrição protéica, a liberação de óxido nítrico produzida mediante ativação de macrófagos é alterada pela manipulação nutricional sofrida durante o período pós-natal imediato e a viabilidade dos macrófagos é diminuída pela manipulação nutricional realizada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLASTICIDADE DO DESENVOLVIMENTO

A plasticidade do desenvolvimento é definida como a capacidade de um genótipo único produzir mais de uma alternativa para formas estruturais, estados fisiológicos ou de comportamento em resposta às condições ambientais (BARKER, 2004). A plasticidade atua em períodos críticos, quando um sistema é adaptável e sensível ao ambiente. Influências ambientais levam à adaptações, culminando com a perda de plasticidade e desenvolvimento de uma capacidade funcional adaptada. Para a maioria dos órgãos e sistemas, este período crítico ocorre ainda dentro do útero (BARKER, 2007).

As influências ambientais atuando durante as janelas do desenvolvimento (períodos críticos de formação de determinados sistemas orgânicos, como o sistema imune, cardiovascular, nervoso, entre outros) induzem mudanças estruturais e funcionais duradouras, pelo menos em parte, por processos moleculares epigenéticos (GLUCKMAN; HANSON, 2004; WATERLAND; MICHELS, 2007), possibilitando assim a transmissão dessas novas características ao longo das gerações.

A hipótese de plasticidade fenotípica do desenvolvimento refere que, quando ocorre incompatibilidade entre o resultado fenotípico da plasticidade adaptativa e o ambiente atual, existiria o desenvolvimento de um fenótipo adaptado ocasionando uma diminuição do potencial para longevidade e / ou aumento da suscetibilidade a doenças metabólicas (GLUCKMAN, ET al. 2009). Um exemplo seria o de estímulos nutricionais imprecisos da

mãe ou da placenta antes do nascimento seguido de uma mudança ambiental rápida, como a melhoria do aporte nutricional, gerando uma incompatibilidade entre as adaptações esperadas no período intra-uterino e as adaptações necessárias para as condições encontradas neste novo ambiente (MCMILLEN; JEFFREY, 2005). Todas as adaptações observadas na prole adulta, devido aos ambiente intra-uterino e da infância são manifestações do fenômeno de plasticidade de desenvolvimento.

Quando ratos são expostos a uma dieta rica em gordura na fase intra-útero e durante o período de amamentação, estes animais tendem a apresentar menores chances de desenvolver disfunção endotelial se eles são mantidos em uma dieta rica em gordura também ao longo da vida (KHAN, et al, 2004). Este achado ilustra a importância do ambiente pós-natal ser similar ao previsto nas fases iniciais da vida.

O início do período pós-natal é também um período de plasticidade fisiológica, embora o tempo desta "janela de oportunidade" possa ser diferente, dependendo do resultado de interesse, da espécie e do gênero envolvido (BUCKLEY; JAQUIERY; HARDING, 2005). Exemplificando o exposto anteriormente, a dieta materna é um dos principais determinantes da composição do leite que tem um grande impacto sobre o recém-nascido em desenvolvimento. Ratas no período de amamentação alimentadas com uma "dieta de cafeteria" tiveram o conteúdo de ácidos graxos de seu leite alterado, bem como a redução do teor de proteínas (ROLLS; et al, 1986). Essa alimentação rica em gordura também faz com que os filhotes adiantem em até 2 dias o início da alimentação independente

(DOERFLINGER e SWITHERS, 2004), provoca o aumento de ganho de peso (SWITHERS; ET al, 2001) e desenvolvimento de hipertensão arterial, além do desequilíbrio das taxas glicêmicas na prole adulta (KHAN; et al, 2005).

Observa-se que a manipulação nutricional durante o período pós-natal pode ter efeitos profundos sobre o desenvolvimento da prole, contudo o mecanismo subjacente a esses efeitos são atualmente pouco conhecidos. Mudanças morfológicas nem sempre são identificadas, contudo o perfil metabólico e funcional das células se mostra alterado (PIRES; CURI; OTTON, 2007).

Como outros seres vivos, os seres humanos são capazes de se adaptar ao seu ambiente. As adaptações orgânicas frente a alterações nutricionais em períodos críticos de desenvolvimento permitem a sobrevivência, maturação sexual e perpetuação da espécie, ao se adequar em parte a nova realidade proposta, contudo danos a saúde inevitavelmente acompanham este processo. Estudos de Barker (1998) mostraram que mulheres com dietas restritas durante a gravidez tiveram placentas menores, e 40 anos mais tarde seus descendentes apresentaram pressão arterial mais elevada (um fator de risco para doença cardiovascular e acidente vascular cerebral). Além disso, medições da pelve de mães revelou que aquelas que têm uma pelve plana tendem a dar à luz bebês pequenos. Estes bebês pequenos, quando adultos, eram muito mais propensos a falecerem por acidente vascular cerebral. A explicação era de que a má nutrição durante a infância de sua mãe afetou o crescimento da pélvis que, por sua vez, reduziram o crescimento de sua prole durante a

gravidez que, por sua vez, aumentou o risco de sua prole para doença cardiovascular e acidente vascular cerebral na vida adulta (BATESON, 2001).

2.2 SISTEMA IMUNE E NUTRIÇÃO

O sistema imune protege o hospedeiro contra organismos patogênicos por meio de vias altamente complexas de reconhecimento, resposta, eliminação e memória que evoluíram a fim de cumprir este papel. A ruptura nessas vias ou a sua operação ineficiente pode levar ao aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas, bem como aumento da morbidade e mortalidade devido ao acometimento por doenças infecciosas (CALDER; ET al, 2006).

O desenvolvimento do sistema imune começa durante a embriogênese, quando as primeiras células hematopoiéticas se desenvolvem fora do embrião, no saco vitelino. Na 6^a semana de gestação, as primeiras células-tronco hematopoéticas podem ser detectadas no mesoderma do feto (LE DOUARIN, 1988). Em seguida, essas células-tronco migram para o fígado fetal e lá iniciam a eritropoiese (MARSHALL e THRASHER, 2001). Durante a 7^a semana de gestação, as células progenitoras migram para o timo em desenvolvimento. A migração destas células para a medula óssea ocorre na 20^a semana (BODEY; et al, 1988; PLUM; et al, 2000). Linfócitos T e células natural killer se desenvolvem no timo; linfócitos B, granulócitos e monócitos se desenvolvem na medula óssea (LORENZI, 2006).

O desenvolvimento de células e órgãos linfóides é um processo complexo que requer a expressão temporal de fatores de crescimento, receptores e moléculas de adesão. Além da

transferência materno-fetal, o desenvolvimento do sistema imune é independente da estimulação antigênica. (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2001)

Devido o sistema imunológico ser imaturo ao nascimento, a nutrição inadequada durante a infância pode ter efeitos em longo prazo sobre o estado de saúde. Falta de macronutrientes adequados ou a restrição calórica prejudica o desenvolvimento e diferenciação de um sistema imune normal. A combinação da desnutrição crônica e infecção enfraquecem ainda mais a resposta imune de um organismo (CUNNINGHAM-RUNDLES; MCNEELEY; MOON, 2005).

A deficiência simultânea de alguns micronutrientes pode ter efeitos atenuantes ou excitantes sobre os componentes do sistema imunológico. Portanto, quando a dieta de crianças é deficiente para um ou mais micronutrientes, é provável que a sua função imunológica também seja prejudicada. Infelizmente, não existe um teste que possa definir qual seria o estado imunológico adequado para um determinado indivíduo (ALBERS; ET al, 2005). Isto irá depender do ambiente e condições de saúde a que o indivíduo está exposto. No entanto, a medida de parâmetros de vários componentes separados do sistema imunológico, pode ser utilizado para avaliar sua capacidade funcional: a exemplo, mensuração de funções específica de células “ex vivo”, medição de respostas “in vivo” a estímulos antigênicos, caracterização da incidência e gravidade da infecção em determinada população-alvo durante os episódios de resposta a infecções que ocorrem naturalmente ou em resposta a patógenos

atenuados, a exemplo das vacinas (ALBERS; ET al, 2005; CUMMINGS;ANTOINE;AZPIROZ, 2004).

É difícil quantificar o papel de cada um dos fatores nutricionais sobre a função e desenvolvimento do sistema imunológico, visto que: nutrientes diferentes podem afetar distintos componentes do sistema imunológico, existem numerosas interações entre diferentes fatores nutricionais, é complicado determinar a relação dose-efeito em jovens e crianças devido aspectos metodológicos e éticos (variáveis não nutricionais podem confundir os resultados) e o fato de ser complexo estudar a relevância de deficiências subclínicas de nutrientes devido à tendência a classificar um pequeno déficit como uma grande deficiência de micronutrientes (KLEIN; HEIRD, 2005).

Baixas concentrações de determinados nutrientes como ácido ascórbico e ferro podem não necessariamente prejudicar a função imunológica, visto que o organismo tem capacidade de adaptar-se a diferentes situações. O mesmo vale para a relevância dos efeitos de curto prazo com a suplementação com doses supra-ótimas, em comparação com os montantes geralmente contidos em fórmulas infantis. Chama atenção o fato da ingestão excessiva de micronutrientes também estar associada a uma função imunológica deficiente (THURNHAM, 1997).

2.3 RESTRIÇÃO NUTRICIONAL PERINATAL E SISTEMA IMUNE NA VIDA ADULTA

Recentemente, tem aumentado o interesse sobre quais consequências as condições do período pré-natal, podem ter sobre o estado de saúde a longo prazo. Falha da via de fornecimento nutricional materno-placentário para satisfazer as exigências fetais podem acarretar em alterações permanentes na estrutura e metabolismo do organismo (ZADIK, 2003).

O favorecimento da função imunológica requer grande aporte nutricional direcionada para a manutenção do organismo. Durante o período pré-natal ocorre grande demanda da área de desenvolvimento e crescimento, restrições nutricionais nesta fase podem acarretar em um desenvolvimento imunológico frágil e limítrofe (MCDADE, 2005) . Um exemplo seria o efeito negativo sobre o crescimento e desenvolvimento pulmonar fetal em ratos que tiveram sua genitora exposta a desnutrição durante a gestação (CURLE e ADAMSON, 1978), sujeitando estes animais a uma maior suscetibilidade a infecções pulmonares.

A privação de um adequado aporte nutricional no período pós-natal pode acarretar em diminuição de investimentos no aperfeiçoamento imunológico em detrimento ao crescimento, marcadamente pronunciado neste período (MCDADE, 2005). Ocorre diminuição do recrutamento de leucócitos na medula óssea, redução da atividade fagocítica dos neutrófilos, aumento da produção de ânion superóxido e óxido nítrico, bem como estado ativado na expressão de óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) basal e NF-kappaB constitutiva em ratos adultos que foram desnutridos durante o período pós-natal imediato. Esta manipulação nutricional imprimiu alterações permanentes na produção de citocinas e ativação dos

neutrófilos (SILVA; Et al, 2010). Todos os elementos citados são importantes para o maquinário envolvido no aperfeiçoamento imunológico de um organismo.

São muitos os relatos demonstrando que a imunidade depende em certa medida da nutrição. Na verdade, a deficiência nutricional está comumente associada com uma mudança na modulação da resposta imune, levando à diminuição de sua capacidade de proteger o organismo contra agressões do ambiente (CHANDRA e NEWBERNE, 1977). Esta função diminuída é em parte justificada pela ocorrência de hipocelularidade da medula óssea e diminuição das células sanguíneas circulantes em ratos adultos, submetidos a desnutrição intra-uterina (LANDGRAF; et al, 2007). Além disso observa-se a diminuição do numero total de células CD4 e CD8, bem como redução plasmática das IL-2 e IL-7. Os linfócitos também apresentam uma diminuição da sobrevida (BADR e MOHANY, 2011).

Estudos têm demonstrado que deficiências nutricionais e outros fatores (estresse, doenças, alterações hormonais, entre outros) que reduzem o crescimento durante períodos críticos da vida podem afetar permanentemente a estrutura e a fisiologia de uma variedade de órgãos e tecidos. A associação entre a desnutrição durante a lactação e a perda de tecido linfóide foi evidenciada por déficit no peso corporal, peso do timo, baço e numero de células destes órgãos, o que ilustra alterações estruturais destes tecidos (ORTIZ; Et al, 2009). Além disso, ocorre também um aumento da suscetibilidade destas células a apoptose, demonstrando a alteração funcional sendo causada pela agressão nutricional.

Em ratos velhos, cuja desnutrição ocorreu no período perinatal e após longo período de recuperação nutricional, observa-se uma diminuição do peso dos músculos e um aumento do peso do pâncreas, enquanto que nas mesmas condições, animais jovens apresentam diminuição do peso relativo nos pulmões, cérebro e mais marcadamente no pâncreas, baço, músculos e fígado (DESAI; Et al, 1996). Estes achados ilustram de forma simplificada que as consequências da desnutrição podem ser em parte amenizadas pela ingestão adequada de nutrientes em longo prazo, contudo, não são completamente corrigidas.

Vale salientar que mesmo que as modificações causadas pela desnutrição não sejam tão aparentes em alguns modelos experimentais avaliando ratos em longo prazo (BARRETO-MEDEIROS; ET al, 2007), fica evidente que a resposta imune é prejudicada, mesmo após recuperação nutricional. Estudos relacionando o sistema imunológico, por meio do estudo do macrófago e a desnutrição, encontraram uma diminuição do número de células totais e macrófagos no lavado broncoalveolar dos animais desnutridos, bem como, alteração da liberação de óxido nítrico e da viabilidade destas células. Os animais jovens apresentaram menor peso persistente, mesmo após oferta de dieta normal (FERREIRA-E-SILVA; ET al, 2009).

Embora essas adaptações possam ser benéficas para sobrevivência em curto prazo, é possível que elas também levem a alterações permanentes na estrutura corporal e do metabolismo e, desta forma, predisponha o desencadeamento de doença cardiovascular e metabólica na vida adulta (GODFREY e BARKER, 2000). Alterações permanentes da

secreção de insulina e de glucocorticóides , bem como resposta inflamatória ineficaz, por exemplo, foram evidenciados em animais desnutridos com dieta livre de proteína durante a lactação, fatores que podem predispor o surgimento de doenças crônicas na vida adulta (BARJA-FIDALGO, Et al. 2003).

Importante causa de alteração da modulação da resposta imune, a desnutrição (PETERS-GOLDEN; et al, 2004) em períodos críticos da gestação, maturação neonatal e desmame, prejudica o desenvolvimento e diferenciação de um sistema imune adequado. Constata-se que um desenvolvimento Intra-uterino e pós-natal prejudicado têm consequências em longo prazo, predispondo ao risco de doenças infecciosas e outras doenças que possuam um componente imunológico, isto é preocupante, particularmente nos países em desenvolvimento (MCDADE; et al, 2001), onde mesmo que em menor proporção em relação ao passado ainda são alarmante os índices de fome e insegurança alimentar (GHI, 2011).

3. MÉTODOS

5.1 ÁREA

Os experimentos foram realizados na sala de cultura de tecidos e Multiusuário do Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica (LENIB) do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (DN/UFPE) (Anexo A).

O LENIB foi fundado em 2006 através da parceria entre a UFPE e a Universidade de Tecnologia de Compiègne (UTC), na França, por meio da aprovação do projeto de Cooperação Internacional Capes/Cofecub em 2003. É composto por: biotério com ciclo de luz invertido, para estudos de atividade física; laboratório multiusuário, com potencial para pesquisas na área de cultura de células e Imunologia, além de um laboratório de biomecânica muscular, com interesse sobre o desenvolvimento da atividade locomotora.

5.2 PERÍODO DE REFERÊNCIA

Este estudo foi iniciado em Setembro de 2010 e foi finalizado em Dezembro de 2011.

5.3 DESENHO DO ESTUDO

Estudo do tipo experimental utilizando ratos machos Wistar para a avaliação de parâmetros da função imune em animais submetidos à desnutrição protéica pós-natal, através da avaliação da viabilidade e da produção de nitrito por macrófagos frente a diferentes concentrações de LPS.

5.4 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

Este estudo respeitou os princípios éticos da Experimentação Animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi avaliado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA/UFPE) e aprovado sob o protocolo: 23076.03154512010-60 (Anexo B). Vale salientar que a coleta de dados e manipulação dos animais somente foi iniciada após a obtenção da aprovação do referido comitê.

Todos os pesquisadores e colaboradores envolvidos neste trabalho foram treinados e possuem competência para a execução de suas atividades.

Os animais não foram submetidos à privação de água e alimentos e receberam tipos de ração diferentes conforme etapa do experimento a que foram submetidos.

Foram respeitadas as formas de eutanásia aceitas pela comunidade científica onde não há sofrimento do animal.

5.5 MANIPULAÇÃO NUTRICIONAL E FORMAÇÃO DOS GRUPOS

5.5.1 Divisão dos grupos experimentais

Foram necessárias 10 matrizes (ratas para procriação) nulíparas, com idade entre 90 a 120 dias, pesando entre 220 e 260 gramas e que não possuíssem parentesco familiar com outras fêmeas do mesmo grupo experimental, nem com os machos que a fecundaram. As ninhadas foram formadas por 8 filhotes machos e cada um pesava entre 6 e 7 g no primeiro ciclo escuro após o nascimento. Os animais foram mantidos à temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, em

ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes das 06 às 18 h). Tais critérios foram definidos para todos os trabalhos do grupo de pesquisa em que este trabalho está inserido.

As matrizes foram acasaladas e receberam dieta padrão (ração comercial: LABINA, Agribands do Brasil, Tabela 1) até o nascimento dos filhotes. Após este período, as genitoras passaram a receber durante a amamentação: dieta normal com caseína a 17% (Tabela 2) [GRUPO CONTROLE]; dieta purificada hipoprotéica, com caseína 8% (Tabela 2) [GRUPO CASEÍNA 8%] e dieta do tipo DBR- dieta básica regional (Tabela 3), [GRUPO DBR], caracterizada por déficit protéico quantitativo (8%) e qualitativo (proteína de origem vegetal em maior proporção). Após os 21 dias de lactação, os filhotes de todos os grupos passaram a ser alimentados com a ração industrial padrão (LABINA), com proteína a 23%. A seguir é apresentado um diagrama detalhado com a construção dos grupos experimentais (figura 1).

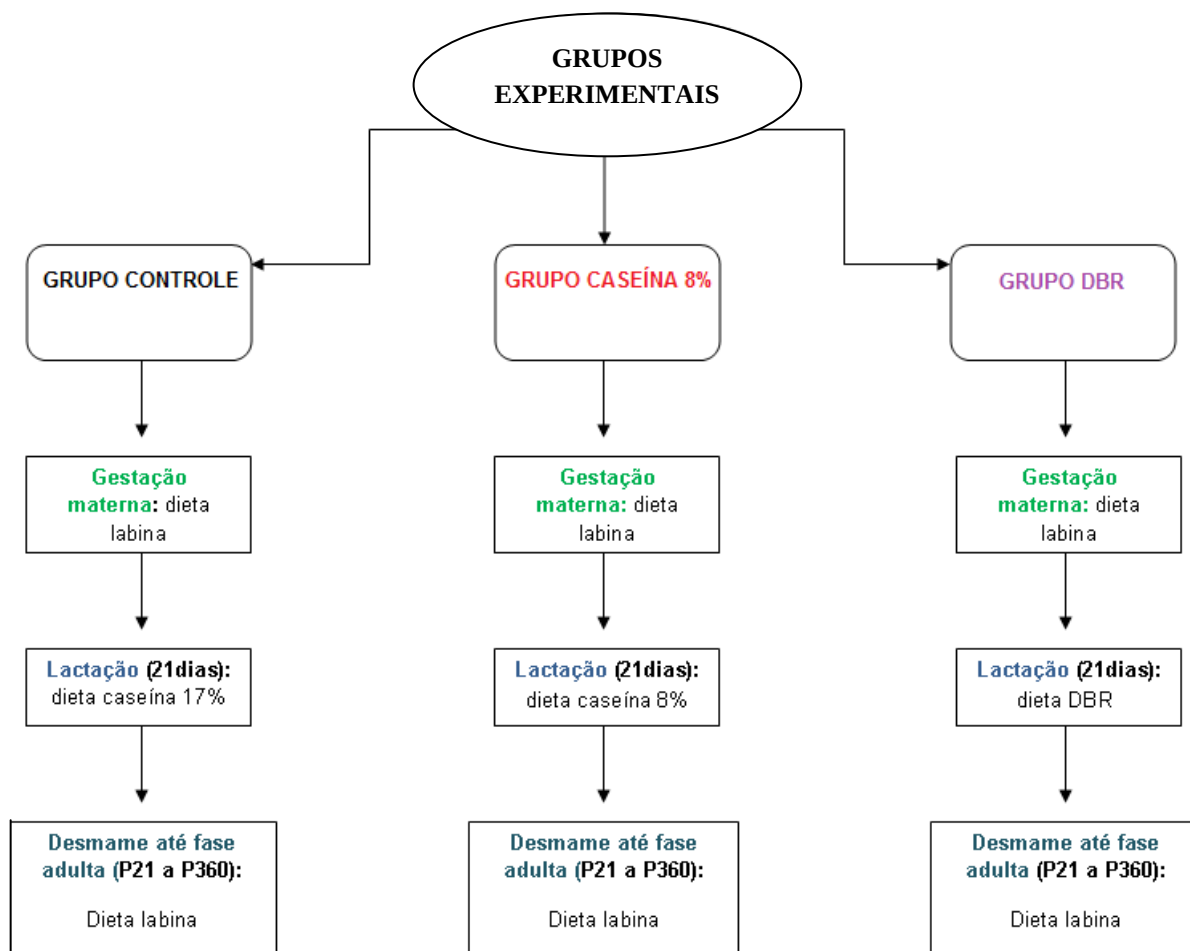


Figura 1: Diagrama do estudo experimental. Separação da prole em grupos conforme a dieta recebida pela mãe durante a lactação. Foram utilizados 29 animais para a realização deste estudo ao final do período de 360 dias. Grupo controle (n=13), grupo caseína 8% (n=6), grupo DBR (n=10).

O peso corporal da prole foi registrado periodicamente durante a fase de lactação e a cada 30 dias entre os 30 e 360 dias pós-natais (P30 a P360), usando uma balança (MARTE AS 1000), com capacidade de 1000 g e sensibilidade de 0,01g. A curva ponderal de cada grupo experimental foi elaborada a fim de ilustrar o crescimento destes animais, tendo sido observado menor ganho ponderal em longo prazo dos animais alimentados com a dieta do tipo DBR (Apêndice A).

Aos 360 dias pós-natais (P360), foram iniciados os procedimentos de coleta e realização dos ensaios experimentais.

Tabela 1. Composição centesimal da dieta Labina^{a,b,c}

Composição centesimal (g%)					Kcal%
Proteínas	Carboidratos	Lipídeos	Cinzas	Fibras	
23,27	56,81	4,24	6,60	8,00 ^b	358,48

a: itens de enriquecimento por Kg de ração: ácido fólico (14,00 mg), antioxidante (150,00 mg), biotina (0,20 mg), cobalto (2,00 mg), cobre (30,00 mg), colina (2.800,00 mg), ferro (180,00 mg), iodo (2,00 mg), manganês (110,00 mg), niacina (242,00 mg), selênio (0,20 mg), pantotenato de cálcio (100,00 mg), piridoxina (12,00 mg), tiamina (12,00 mg), vitamina A (28.000,00 UI), vitamina B12 (44,00 mg), vitamina B2 (28,00 mg), vitamina D3 (4.400,00 UI), vitamina E (90,00 UI), vitamina K (7,00 mg), zinco (110,00 mg)

b: segundo a Agribrands do Brasil

^cFonte: Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos, DN/UFPE

Tabela 2. Composição das dietas normo e hipoprotéica, com adaptações, à base de caseína, segundo Reeves; Nielsen; Fahey (1993).

Constituintes	Dieta normoprotéica (17%)	Dieta hipoprotéica (8%)
*g%	100,0	100,00
Proteínas	17,30	8,10
Carboidratos	65,90	75,10
Lipídios	7,00	7,00
Fibras	5,00	5,00
Vitaminas	1,00	1,00
Minerais	3,50	3,50
Metionina	0,30	0,30
% Kcal	363,44	362,48

*grama

Tabela 3. Composição centesimal da Dieta Básica Regional (DBR) segundo Teodósio *et al.*, (1990). A DBR é deficiente em vitaminas hidro e lipossolúveis.

Ingredientes	g%	Composição centesimal					Kcal%
		Proteínas	Carboidratos	Lipídeos	Cinzas	Fibras	
Feijão ^a	18,34	3,99	10,66	0,24	0,57	1,09	60,76
Farinha de mandioca	64,81	0,84	48,59	0,12	0,43	5,64	198,80
Charque (carne) ^a	3,74	2,74	-	0,06	0,06	-	11,50
Charque (gordura)	0,35	-	-	0,35	-	-	3,15
Batata-doce ^a	12,76	0,30	9,99	0,03	0,20	0,48	41,43
Total	100,00	7,87	69,24	0,80	1,26	7,21	315,64

a: cozido em água e desidratado

5.5.2 Procedimentos de coleta e realização do ensaio experimental

5.5.2.1 Obtenção das amostras de sangue periférico e realização do hemograma

Os animais aos 360 dias de vida foram anestesiados com uma solução de cloralose e uretana (0,5% e 12,5%, respectivamente) (Sigma-Aldrich, SP Brasil), via injeção intraperitoneal, na proporção de 10 ml/Kg de peso corporal. O primeiro procedimento realizado foi a retirada de amostra sanguínea para realização de hemograma.

Na extremidade da cauda de cada animal anestesiado foi realizado um corte usando um bisturi e 0,2 mL de sangue foram coletados em tubo de ensaio contendo EDTA a 3%. As amostras foram processadas pelo analisador hematológico automático Horiba ABX, Pentra DX 120, com revisão de lâmina. Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas (HC-PE) de Pernambuco (ANEXO C).

5.5.2.2 Obtenção do lavado broncoalveolar

Após retirada de amostra sanguínea para realização de hemograma, os procedimentos para obtenção do lavado broncoalveolar (LBA) foram iniciados.

O LBA foi obtido de acordo com a técnica descrita em De Castro et al. (2000). Foi injetado NaCl a 0,9% à temperatura ambiente através de uma seringa conectada a uma cânula plástica inserida na traquéia. Várias alíquotas de aproximadamente 5 mL foram injetadas e coletadas em um tubo tipo falcon estéril. Foram recuperados aproximadamente 50 ml de LBA por animal.

5.5.2.3 *Contagem de células totais do lavado broncoalveolar*

Após a coleta, uma alíquota do LBA coletado foi diluída na proporção de 1:10 (v:v) com solução de azul de Tripán (1%) e a contagem total de macrófagos foi realizada em hemocitômetro de Neubauer, com auxílio de microscópio de luz (Olympus optical BX41TF, Japão Co Ltda.).

5.5.2.4 *Análise da Integridade da membrana celular das células do LBA*

Os macrófagos do LBA foram coletados como descrito anteriormente e, uma alíquota foi separada e centrifugada, o precipitado foi ressuspenso em 500 μ L de tampão fostato-salino (PBS). Foram adicionados 50 μ L de solução de iodeto de propídio (PI) (50 μ g/mL em PBS) e as células foram analisadas no citômetro de fluxo de acordo com a técnica de Nicoletti, Et al (1991). A fluorescência foi mediada no canal FL2 (fluorescência laranja-avermelhada – 585/42 nm). Dez mil eventos foram adquiridos por amostra em histogramas. Os histogramas foram analisados através do “Cell Quest Software” (Becton Dickinson).

5.5.2.5 Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria

Alíquotas de LBA (1×10^6 células) foram ressuspensas em 1 ml de solução salina, adicionado 1 μ L de solução de rodamina 123 (5mg/mL em etanol) e incubadas por 10 min a 37°C segundo a técnica descrita em Peres, Curi (2005). As células foram lavadas com PBS duas vezes, ressuspensas em 0,5 mL de PBS e incubadas por 30 minutos a 37°C. A leitura foi realizada no citômetro de fluxo imediatamente após o período de incubação (Pithon-Curi, De Melo et al. 2004). A Rodamina 123 (corante fluorescente catiônico) é excitável por laser de argônio (480 nm) e emite fluorescência na faixa de 515-530 nm (FL1). É permeável à membrana celular e é rapidamente sequestrada pela mitocôndria. Células com potencial mitocondrial transmembrânico inalterado captam a rodamina e emitem alta fluorescência quando atingidas pelo laser. Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria, gerando eventos que emitirão menor fluorescência.

5.5.2.6 Cultivo das células do LBA

Os macrófagos obtidos do LBA foram cultivados conforme descrito em De-Castro et al. (2000). As células do LBA foram centrifugadas (10 minutos, 4703g) e ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) suplementado com soro fetal bovino a 10%, 100 U/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich, SP, Brasil). A seguir, as células foram distribuídas em placas de cultura com 96 poços (5×10^5 /mL células) (TPP, Cultilab, SP, Brasil) e levadas para aderir por 2 h em incubadora a 37°C em CO₂ a 5%. As células não aderidas foram removidas com NaCl a 0,9% estéril.

5.5.2.7 Incubação das células cultivadas com diferentes concentrações de lipopolissacarídeo (LPS) e avaliação de seu efeito sobre a liberação de óxido nítrico

Com o intuito de analisar a liberação de óxido nítrico (LON) por MA em resposta a diferentes concentrações de substância estimulante, as células aderidas de animais controles e desnutridos foram incubadas com 10, 25 e 50 μ g de lipopolissacarídeo (1mg/ml) (LPS, Sigma-Aldrich, SP, Brasil). Para controle negativo, foi adicionada somente meio de cultura em alguns poços.

Após 24 horas de incubação com LPS, o sobrenadante de cultura foi coletado e foi realizada a análise da LON através de método colorimétrico quantitativo baseado na reação de Griess, culminando com a leitura dos níveis de nitrito/nitrato em sobrenadante de cultura de macrófagos broncoalveolares, sendo os resultados expressos em μ M de nitrato por 5×10^5 células. Neste estudo foram utilizadas alíquotas de 50 μ L em duplicata dos sobrenadantes de cultura incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos com 50 μ L de reagente de Griess imediatamente preparados (sulfanilamida a 1% e naftiletileno a 0,1% em ácido ortofosfórico a 5%). A absorbância foi mensurada a 550 nm por espectrofotometria. A concentração de nitrito foi determinada a partir de uma curva padrão construída com nitrato de sódio nas concentrações de 0-35 μ M. Todas as amostras foram avaliadas em relação a um branco correspondente a RPMI-1640 incubado por 24 h nas mesmas placas das amostras, mas na ausência de células.

5.5.2.8 Análise da viabilidade celular pela técnica de redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- brometo de difenil tetrazólio (MTT) ao formazan

A viabilidade dos macrófagos do LBA cultivados na placa foi avaliada pela redução mitocondrial do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- brometo de difenil tetrazólio (MTT) ao formazan como descrito em Mossman (1983). As células foram incubadas com 5 μ L de MTT/mL (0,5 mg/ml) e meio de cultura (50 μ L) por 12 h em incubadora a 37°C e CO₂ a 5%. O formazan resultante foi solubilizado com 50 μ L de dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS), incubados por 12 h nas mesmas condições.

A quantificação do formazan solubilizado foi realizada por espectrofotometria a 540 nm. Os resultados foram expressos em absorbância de formazan por 5×10^5 células.

5.6 MÉTODO DE ANÁLISE

Foram utilizados para a análise dos dados os testes de média +/- desvio padrão da média. Na comparação entre os grupos, foi utilizada, quando apropriado, análise múltipla de variância com ou sem medidas repetidas (RM ANOVA), seguida de teste Tukey ou Bonferroni, conforme apropriado. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

6. RESULTADOS — ARTIGO ORIGINAL

Nesta dissertação, foram estudadas as consequências em longo prazo da desnutrição pós-natal pela dieta purificada com caseína 8% e Dieta Básica Regional (DBR) sobre a função de macrófagos broncoalveolares, bem como o possível papel da manipulação dietética na modificação de parâmetros de viabilidade da célula. O artigo intitulado: “*Desnutrição pós-natal imediata altera a viabilidade e função dos macrófagos em ratos*” foi submetido (Anexo D) à revista THE JOURNAL OF NUTRITION, fator de impacto: 4,3. Qualis: classificação A1 (medicina II), tipo: “RESEARCH ARTICLES” (Anexo E).

IMMEDIATE POSTNATAL MALNUTRITION CHANGES THE VIABILITY AND FUNCTION OF MACROPHAGE IN ADULT RATS^{1,2,3}.

**Queliane Gomes da Silva Carvalho^{*4}, Raul Manhães de Castro⁵, Jakeline Olindina Francelino⁶
Sueli Moreno Senna⁷, João Ricardo Sá Leitão Camaroti⁸, José Cândido de Souza Ferraz Junior⁹,
Wylla Tatiana Ferreira e Silva¹⁰**

4. Nurse. Master's degree student in Pathology, Pathology Post-Graduation Program, Health's Science Center, UFPE. Mailing Address: Rua Profº Chaves batista, nº262, Apt: 201.Recife-PE. Cep:50740-030, Fone: (81)8867-5297. E-mail: nealique@gmail.com.

5. Doctor. Associate Professor, Nutrition's Department, Health's Science Center, UFPE. E-mail: raulmanhaesdecastro@yahoo.com.br.

6. Graduate in Nutrition School, Maurício de Nassau College, Recife,PE. E-mail: jakeviver@hotmail.com.

7. Nurse. Doctor's degree student in Nutrition Post-Graduation. Health's Science Center, UFPE. E-mail: susenna@hotmail.com.

8. Biomedic. Master's degree student in Pathology , Pathology Post-Graduation Program, Health's Science Center , UFPE. E-mail: joaoricardocamarotti@hotmail.com.

9. Biomedic. Associate Professor, Physical Education and Sports Sciences Nucleus, Vitória de Santo Antão's Academic Center. Post-Doctor in Immunology, Fiocruz/PE College. E-mail: jcferraz.2009@gmail.com.

10. Nutritionist. Associate Professor, Nutrition's Nucleus, Vitória de Santo Antão's Center. Doctor in Nutrition, UFPE. E-mail: wyllatfs@hotmail.com.

RUNNING TITLE: Immediate Postnatal Malnutrition Changes the viability and function of macrophage in adult rats.

WORD COUNT: 4346; NUMBER OF FIGURES: 7; NUMBER OF TABLES: 3

SUPPLEMENTARY MATERIAL: Online Supporting Materials: 7

AUTHOR LIST FOR INDEXING: Carvalho, Manhães-de-Castro, Francelino, Senna, Camaroti, Ferraz, Ferreira-e-Silva.

1. Article produced from the results obtained in the master's dissertation in pathology entitled: "Long term effects of the immediate postnatal protein malnutrition concerning the macrophage in rats". Financing source: CNPq/CAPES.

2. Author disclosure: Q.G.S. Carvalho, R. Manhães-de-Castro, J.O. Francelino, S.M. Senna, J.R.S.L. Camaroti, J.C.S. Ferraz Junior, W.T. Ferreira-e-Silva have no conflicts of interest.

3. Supplemental Figures 1-7 are available as Online Supporting Material with the online posting of this paper at <http://jn.nutrition.org>.

To Whom Correspondence should be addressed, e-mail: nealique@hotmail.com.

Abbreviations used: BAL: Bronchoalveolar lavage, LPS: lipopolysaccharide, NO: nitric oxide, PBS: phosphate buffered saline, RBD: regional diet basic.

ABSTRACT

Nutrition manipulation causing malnutrition in crucial development stages generates long term negative consequences in the immune system. Macrophage acts on different moments in the immune response, participating in the innate response as well as in the adaptive immune response. To evaluate if the nutrition manipulation with different hypoproteic diets in the beginning of life interferes in the immune function on the adult rat were examined hematological values in peripheral blood, the viability of alveolar macrophage through different methodologies and the nitric oxide liberation by stimulation with the antigenic agent. Rats were breastfed by mothers that were fed with a purified diet deficient in proteins or by diet deficient in many aspects, similar to the one that were consumed in the 60's by the malnourished population in the northeast of Brazil, called Regional Basic Diet . It didn't occurred modifications in the hematologic values concerning the red and white series. The cell culture analysis revealed that both diet manipulations indicated a decrease in the viability and the function. This last one was indicated by the reduction of the macrophage capacity of producing nitric oxide. The different tests of cellular viability made indicated different answers from these cells, which indicates that there has been a structural adaptation to the new nutritional conditions, but its cellular machinery, however, were injured. In conclusion, the different nutritional manipulation occurred in the immediate postnatal period cause permanent alterations in the adult life of the macrophage, which can result in the commitment of the rat's immunological system.

Descriptors: Malnutrition, Alveolar Macrophage, Nitric Oxide, viability, rats.

INTRODUCTION

The malnutrition role in the organism healthy growth and development have been being the center of attention of each time more comprehensive studies due to the negative consequences that an inadequate diet can cause on both these parameters. The nutritional inadequacies are recognized as an important public health problem (1) due to the global wide magnitude and its disastrous consequences to the growth, development and survival of the individuals (2).

A nutrition manipulation that result in a deficient diet and is offered in critical times of the shaping (pre-natal and postnatal) can foment fails on the organic development systems (3). Even after the insertion of an adequate diet, the systems that were affected couldn't adapt to the new condition, which could cause a decrease on the potential for longevity and/or rise of susceptibility to metabolic diseases (4-7).

Malnutrition is the principal nonhereditary cause for immunodeficiency in the world, e are well documented it's acute and chronicle effects on the immunological responses, not being clear, however, in which way those effects are triggered (8). Studies realized on animals and humans show that the nutritional environment on the pre-natal and postnatal periods can grant long lasting modifications concerning the immune response, predisposing individuals to sickness (9-10). It is known that the immunological system maturation starts from the first weeks of pre-natal life, and the immunological competence is only acquired gradually after birth, in humans as well as in animals (11).

To evaluate the nutritional manipulation with different low protein diets in the beginning of life interferes on the immune function of the adult rat were examined hematological values in the peripheral blood, viability of the alveolar macrophage through different methodologies and the release of nitric oxide by stimulation with antigenic agent.

Such parameters made possible to trace a quantitative and functional profile of the immune response of the malnourished adult organisms in the initials periods of life.

MATERIALS AND METHOD

The experiments were made on the tissue culture lab and Multiuser of the Lab of Nutrition and Biomedical Instrumentation Studies (LNBIS) of the Nutrition Department in the Federal University of Pernambuco. This study respected the ethical principles of the Animal Experimentation made by the Brazilian School of Animal Experimentation and it was valued by the Animal Experimentation Ethical Committee of the Federal University of Pernambuco and approved, having the code: 23076.03154512010-60.

Experimental groups division

Were mated 10 arrays that were never pregnant before, weighing between 220 and 260 grams. In this period, they were fed with a standard diet (commercial ration: LABINA, Agribands do Brasil, **Table 1**) until the puppies birth. The litters were formed by 8 male puppies and each weighted among 6 and 7g in the first dark cycle after birth. The animals were maintained at the temperature of $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, in a bright-dark cycle of 12 hours (lights from 06 until 18h). During the breastfeeding the mothers started receiving different diets according to the experimental group: normal diet with casein 17% (**Table 2**) (12) [CONTROL GROUP]; low protein purified diet, with casein 8% (**Table 2**) (12) [CASEIN 8% GROUP] and the diet kind RBD – regional basic diet, characterized by the quantitative (8%) and qualitative (vegetal protein in higher proportion) protein deficit (**Table 3**) (13), [GROUP RBD]. After 21 days of lactation, the puppies of all groups started being feed with the standard industrial ration (LABINA), with protein 23%, and the weight of all animals were

periodically monitored. It was observed the lowest weight in long term on the animals feed with the RBD diet.

Attainment of the peripheral blood samples

When the animal had 360 days of life there were anesthetized with a chloralose and urethane solution (0,5% and 12,5%, respectively) (Sigma-Aldrich, SP Brasil), by way of intraperitoneal injection, on the proportion of 10 ml/kg of corporal weight. The first procedure made was the extraction of the blood sample for the CBC. 0,2 mL of blood was collected through distal transection on the tail, in a test-tube containing EDTA 3%. The samples were processed by the automatic hematologic analyzer method (Horiba ABX, Pentra DX 120), with blade review. All samples were processed on the Clinic Analysis Lab of Clinic Hospital of Pernambuco (CH-PE).

Attainment of the Bronchoalveolar lavage (BAL) and the total cells score

The BAL was obtained according to the technique described in De Castro et al. (2000) (14), recovering approximately 50 ml of BAL in each animal.

After the collect, a part of the BAL was diluted in the proportion of 1:10 with solution of Trypan blue (1%) and the total score of macrophages was made in a Neubauer's hemocytometer, with aid of a light microscope (Olympus optical BX41TF, Japão Co Ltda).

Analysis of the integrity of the cellular membrane in the BAL cells

A part of BAL fluid of each animal was separated and centrifuged, the result was suspended again in 500 μ L of PBS. It was added 50 μ L of PI (50 μ L/mL in PBS) and the cells were analyzed in the flow cytometer according to the Nicoletti technique (15). The fluorescence was measured in the channel FL2 (orange-red fluorescence – 585/42 nm). Ten

thousand events were acquired by samples in histograms. The histograms were analyzed through the “Cell Quest Software” (Becton Dickinson).

Determination of the transmembrane potential of the mitochondria

Parts of BAL fluid were suspended again in 1mL of saline, adding 1 μ L of solution of rhodamine 123 (5mg/mL in ethanol) and incubated for 10 minutes at 37°C. The cells were washed with PBS twice, suspended again in 0,5 mL of PBS and incubated for 30 minutes at 37°C. The reading was made in the flow cytometer immediately after incubation (16).

Cultivation of the BAL cells and incubation with different concentrations of lipopolysaccharide (LPS) for evaluation of its effects on the liberation of nitric oxide

The macrophages obtained in the BAL were cultivated as described in De-Castro et al (2000) (14). The cells of the BAL fluid were centrifuged (10 minutes, 4703g) and suspended again in a culture medium RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, SP, Brazil) supplemented with bovine fetal serum at 10%, 100 U/ml of penicillin and 100 μ g/ml of streptomycin (Sigma-Aldrich, SP, Brazil). Hereafter, the cells were distributed in culture plates with 96 wells (5×10^5 /ml cells) (TPP, Cultilab, SP, Brazil) and taken to adhere for 2h in an incubator at 37°C in CO₂ at 5%. The cells that didn't adhere were removed with sterile NaCl at 0,9%.

In order to analyze the liberation of nitric oxide (LON) per macrophage in response to different concentrations of stimulant substance, the cells adhered from controlled and malnourished animals were incubated with 10, 25 e 50 μ g of lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich, SP, Brazil). For negative control, it was added only culture medium in some wells.

After 24 hours of incubation with LPS, the supernatant of culture was collected and it was made an analyze of nitric oxide release by the quantitative colorimetric method based on the Griess reaction, culminating with nitrite/nitrate level readings in a supernatant culture of

bronchoalveolar macrophage. The results were expressed in μM of nitrate by 5×10^5 cells. The absorbance was measured in 550 nm per spectrophotometry.

Analyzes of the cellular viability by the reduction technique of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-il]-2,5-difezil tetrazolium bromide (MTT) to formazan.

The BAL's macrophage viability cultivated on the plate was evaluated by the mitochondrial reduction of the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-il]-2,5-difezil tetrazolium bromide (MTT) to formazan as described in Mossman (17). The cells were incubated with 5 μL of MTT/mL (0,5 mg/ml) and culture medium (50 μL) for 12 h in an incubator at 37°C and CO₂ at 5%. The resulting formazan was solubilized with 50 μL of sodium dodecyl sulfate at 10% (SDS), incubated for 12h in the same conditions.

The quantification of the solubilized formazan was realized by spectrophotometry at 540nm. The results were expressed in formazan's absorbance of 5×10^5 cells.

Statics Analyzes

It was used for the data analyze of the tests media $\pm$ standard deviation. To compare the groups was used, when proper, multiple analyze of variance with or without repeated measures (RM ANOVA), followed by Tukey or Bonferroni test, as appropriate. The data were expressed in media $\pm$ standard deviation.

RESULTS

Hematological parameters. There was no significant difference of the hematological values on the red series (**Figure 1**) and white (**Figure 2A and 2B**) among the studied groups. All the values found are according to the age reference values.

Analyze of the cellular viability. It was observed that the alveolar macrophages from the malnourished groups, as well as the ones from the control group, presented a mostly full plasma membranes (above 80%, when evaluated by the flow cytometer technique (**Figure 3**) and around 95% by the microscope, according to the trypan blue technique which attests the integrity of the cellular membrane by colorimetric method (**Figure 4**). Concerning the viability technique by MTT, the cell from the malnourished groups presented significantly higher values ($p < 0,05$) than the ones from the control group (**Figure 5**). However, when the viability is made by the transmembrane potential evaluation of the mitochondria's test, it can be observed that the malnourished groups showed an indicative response that these cells were in a initial phase of the apoptotic process, with significantly lower values than the control group ($p < 0,05$) (**Figure 6**).

Cultivation of the BAL cells and incubation with different concentrations of lipopolysaccharide (LPS) for evaluation of its effects on the nitric oxide liberation. The RBD group presented a basal production of nitrite significantly higher than the group casein 17%. When stimulated, the groups behaved in similar ways in all concentrations of LPS (10, 25 and 50 μ g), not occurring differences concerning the concentration of LPS. Generally, the group casein 8% and RBD presented significantly lower values than the group casein 17% and the RBD, on the other hand, presented significantly higher values than the casein 8% (**Figure 7**).

DISCUSSION

The impact of the nutritional manipulation on the immediate postnatal period on the alveolar macrophage in rats was evaluated as its function, amount and viability in adult rats. The animals were breastfed for a month by mothers that were fed with a purified diet deficient in proteins or with a diet multideficient similar to the one consumed on the 60's by the malnourished populations from the northeast in Brazil, called Regional Basic Diet (RBD). When adults were evaluated concerning the hematological parameters and their bronchoalveolar cells were examined as its functionality and viability. The present study showed that it did not occurred modifications on the hematological values of the red and white series. The study of the cellular culture reveled that both manipulations caused decrease on the cell's viability and function. This last was indicated by the reduction of the macrophage capacity of produce NO. These findings indicate that the nutritional manipulation occurred in critical phases of the development causes permanent alterations on the macrophage adult's life.

The diets used to provoke malnutrition didn't cause modifications on the hematological values of the red and white series, which corroborates with the conclusions of studies where the malnutrition is induced for evaluation of hematological parameters (18). Despite the evidence that the nutrition privation interferes on the array and cellularity of the bone marrow (19), the study that focus on the consequences of these medullary alterations in a long term, after periods of nutritional recovery, indicates normalization on the pattern of cytokines and growth factors (20). These immune modulators are fundamental for an adequate balance between stimulation and inhibition on the cell production by the medullar medium. The proof is that the hematological parameters of malnourished animals and evaluated after a recovering phase are normal (21).

Both diet manipulations indicated decrease of the viability and the function of the alveolar macrophage. This last was indicated by the reduction of the macrophage capacity of produce NO. Different viability techniques made an indication of possible altered mechanisms on the cell, so helping to elucidate certain functional data found on the study. Colorimetric techniques as the utilization of trypan blue and MTT indicate integrity of the plasma membranes and the functional capacity of the cell in metabolize certain compounds by this endosomal vesicles and mitochondria. The study revealed that, apparently, by these techniques, the diets used to cause malnutrition did not alter the viability of the macrophage. However, in measuring the transmembrane potential of the mitochondria from the nutritionally manipulated cells was possible to observe that this organelle suffered delicate alterations in its function. It was observed that the morphology and function can be, at least in part, restored with the introduction of a normal diet (20), which corroborate in part with the results obtained, although more profound alterations can also happen on the machinery of these cells, causing future damages with the triggering of diseases in long-term (22).

The finding of these mitochondrial alterations indicates initial damages on the cell's machinery, which affects the way of the cell responding to stimulation. The data contained in this study concerning the production of NO illustrate the malnutrition causing mitochondrial damages and the resulting alteration on the function of the macrophage. The production of NO is profoundly altered and is well characterized by the low responses of these cells when antigenic stimulated. These finding demonstrate the incapacity of the immune system in respond properly to the antigenic stimulation, which is concordant with the findings in study realized in younger animals (9), that also showed alteration on the production of NO as well as in the results of the alteration of their inflammatory response, like spreading, phagocytosis and the fungicide activity of the macrophages from animals that suffered malnutrition (23).

Thus, is admitted that the immediate post-natal malnutrition caused long term consequences concerning the function and viability on the alveolar macrophage in adult rats. It is necessary, trough new studies, the deepening of the comprehension of the mechanisms that interfere on the duo nutrition and immune system. This was it would be possible to glimpse in a near future the prevention of the deleterious effects of the malnutrition on the beginning of life.

LITERATURE CITED

1. Schweigert ID, Souza DOG, Perry MLS. Desnutrição, maturação do sistema nervoso central e doenças neuropsiquiátricas. *Rev. nutr.* 2009; 22(2): 271-281. doi.org/10.1590/S1415-52732009000200009.

2. Monte CMG. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. *J. Pediatr.* 2000 76 (3): S285-S297. Doi: 0021-7557/00/76-Supl.3/S285.

3. Lucas A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Archives of Disease in Childhood.* 1994; 71: 288-290. doi:10.1136/ad.71.4.288

4. Hanson M, Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD. Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: Theoretical considerations and epigenetic mechanisms .*Prog Biophys Mol Biol.* 2011; 106(1): 272–280. doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.12.008.

5. Godfrey KM, Gluckman PD, Hanson MA. Developmental origins of metabolic disease: life course and intergenerational perspectives. *Trends Endocrinol Metab.* 2010; 21(4):199-205. doi.org/10.1016/j.tem.2009.12.008

6. Sloboda DM, Beedle AS, Cupido CL, Gluckman PD, Vickers MH. Impaired perinatal growth and longevity: a life history perspective. *Curr Gerontol Geriatr Res.* 2009; 608740. doi:10.1155/2009/608740.

7. Gluckman PD, Hanson MA, Buklijas T, Low FM, Beedle AS. Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2009; 5(7):401-8. doi:10.1038/nrendo.2009.102.

8. Scrimshaw NS. Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection. *J Nutr*. 2003; 133:316S-21S.

9. Ferreira-e-Silva WT, Galvão BA, Ferraz-Pereira KN., De-Castro CB, Manhães-de-Castro R. Perinatal Malnutrition Programs Sustained Alterations in Nitric Oxide Released by Activated Macrophages in Response to Fluoxetine in Adult Rats. *Neuroimmunomodulation*. 2009; 16:219-227. Doi: 10.1159/000212382.

10. Macêdo EMC, Amorim MAF, Silva ACS, Castro CMMB. Efeitos da deficiência de cobre, zinco e magnésio sobre o sistema imune de crianças com desnutrição grave. *Rev Paul Pediatr*. 2010;28(3):329-36. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-05822010000300012>.

11. Spencer SJ, Martin S, Mouihate A, Pittman QJ. Early-Life Immune Challenge: Defining a Critical Window for Effects on Adult Responses to Immune Challenge. *Neuropsychopharmacology*. 2006, 31: 1910–1918. doi:10.1038/sj.npp.1301004

12. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. 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. *J Nutr*. 1993; 123(11):1939-51. doi: 0022-3166/93

13. Teodósio NR, Lago ES, Romani AS, Guedes RCA. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latino am Nutr.* 1990; 40(4): 533-47. ISSN: 0004-0622 [PMID]: 2136514

14. De castro CM, Manhaes-de-Castro R., Fernandes de Medeiros A., Queiros Santos A., Ferreira-e-Silva WT.; Lus de Lima Filho J. Effect of stress on the production of O₂(-) in alveolar macrophages. *J Neuroimmunol.* 2000;108(1-2): 68-72. doi.org/10.1016/S0165-5728(00)00276-9

15. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1991; 139: 271–279. doi.org/10.1016/0022-1759(91)90198-O.

16. Pithon-Curi TC, De Melo MP, Curi R. Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: a comparative study. *Cell Biochem Funct.* 2004; 22(5): 321-326. DOI: 10.1002/cbf.1109.

17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *JIM.* 1983;65(1-2):55-63. doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4.

18. Barreto-Medeiros J, Queiros-Santos A, Cabral-Filho JE, Ferreira e Silva WT, Leandro CG, Deiró TC, Manhaes-de-Castro R, Machado Barbosa de-Castro CM. Stress/Aggressiveness-Induced Immune Changes Are Altered in Adult Rats Submitted to

Neonatal Malnutrition. Neuroimmunomodulation. 2007;14:229-334. DOI: 10.1159/000112047.

19. Xavier JG, Favero ME, Vinolo MAR, Rogero MM, Dagli MLZ, Arana-Chavez VE, Borojevic R, Borelli P. Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. *Histol Histopathol*. 2007;22(6):651-60.

20. Oreffo ROC, Lashbrooke B, Roach HI, Clarke NMP, Cooper C. Maternal protein deficiency affects mesenchymal stem cell activity in the developing offspring. *Bone*. 2003; 33(1):100-107. DOI: 10.1016/S8756-3282(03)00166-2.

21. Dunki Jacobs PB, Ruevekamp M, Hart GA, de Graaf PW. Dietary influences on cell proliferation in bone marrow. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1989; 25(6):953-7. [.doi.org/10.1016/0277-5379\(89\)90153-3](https://doi.org/10.1016/0277-5379(89)90153-3).

22. Reusens B, Theys N, Remacle C. Alteration of mitochondrial function in adult rat offspring of malnourished dams. *World J Diabetes*. 2011 15; 2(9): 49-157. [doi:10.4239/wjd.v2.i9.49](https://doi.org/10.4239/wjd.v2.i9.49).

23. Souza IP, Kang HC, Nardinelli L, Borelli P. Desnutrição protéica: efeito sobre o espreiamento, fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoneais. *Rev Bras Cienc Farm*. 2001; 37(2): 143-51. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732008000600007>.

STATEMENT OF AUTHORS' CONTRIBUTIONS TO MANUSCRIPT

Manhães-de-Castro, R, Ferreira-e-Silva.W.T. designed research; C.Q.G.S., , F. J.O., S.S.M., C.J.R.S.L.,F. Jr. J.C.S. conducted research, C.Q.G.S, Ferreira-e-Silva.W.T analyzed data; C.Q.G.S. wrote the paper; C.Q.G.S, Ferreira-e-Silva.W.T had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Hematological values of the red series in rats. Casein 17%: group regular (N=13), casein 8%: malnourished group with diet containing 8% casein (N=6). RBD: malnourished group with diet containing 8% of protein, especially vegetal (N=10). HC: erythrocytes, HB: hemoglobin, HT: hematocrit, VCM: corpuscular average volume, HCM: corpuscular average hemoglobin, CHCM: corpuscular average hemoglobin concentration, RDW: red cell distribution width. There was no difference among the groups (two-way ANOVA followed by “Bonferroni posttest”)

FIGURE 2: Hematological values of the white series rats. Casein 17%: group regular (N=13), casein 8%: malnourished group with diet containing 8% casein (N=6). RBD: malnourished group with diet containing 8% of protein, especially vegetal (N=10). 2A: total number of leukocytes/mm³ (one-way ANOVA followed by Tukey posttest). 2B: differential counting of the leukocytes, percentage values (two-way ANOVA followed by “Bonferroni posttests”). There was no difference among the groups.

FIGURE 3: Analyze of the integrity of the BAL’s cell membrane by flow cytometer. Casein 17%: group regular (N=13), casein 8%: malnourished group with diet containing 8% casein (N=6). There was no statics difference among the groups (one-way ANOVA folloew by Tukey posttest).

FIGURE 4: Determination of the percentage of viable BAL’s macrophages by trypan blue. Casein 17%: group regular (N=13), casein 8%: malnourished group with diet containing 8%

casein (N=6), RBD group (N=10). There was no statics difference among the groups (one-way ANOVA folloew by Tukey posttest).

FIGURA 5: Formazan production in the supernatant culture of alveolar macrophage of 360 days old animals by the reduction technique 3-[4,5-dimethylthiazol-2-il]-2,5-difezil tetrazolium bromide (MTT) to formazan. Casein 17%: group regular (N=13), casein 8%: malnourished group with diet containing 8% casein (N=6), RBD group (N=10). *significant difference between the group casein 8% and the regular nourished group with $p < 0,05$ (two-way ANOVA followed by “Bonferroni posttests”). ** significant difference between RBD group and group casein 8% with $p < 0,05$ (two-way ANOVA followed by “Bonferroni posttests”). Worth mentioning that the different concentrations of LPS did not conferred variations on the alveolar macrophage’s viability on both groups.

FIGURE 6: Determination of the transmembrane potential of the BAL’s mitochondria’s cells by flow cytometer. Casein 17%: group regular (N=13), casein 8%: malnourished group with diet containing 8% casein (N=6), RBD group (N=10). The malnourished groups presented significantly low values of transmenbrane potential of mitochondria (* $P < 0,0001$, one way ANOVA followed by Tukey posttest), indicative alteration of the apoptotic phase.

FIGURE 7: Nitrite production in the supernatant culture of alveolar macrophage of 360 days old animals. The values are exposed in media +/- standard deviation, with n=13 for control, n=6 for casein 8% and n=10 for RBD. *significant difference between group casein 8% or RBD and group control with $p < 0,05$ (two-way ANOVA followed by "Bonferroni posttests"). ** significant difference between group DBR and group casein 8% with $p < 0,05$ (two-way ANOVA followed by "Bonferroni posttests"). Worth mentioning that the different

concentrations of LPS did not conferred variations on the nitrite production on the supernatant culture of alveolar macrophage on both groups.

Table 1. Centesimal composition of the Labina diet ^{a,b,c}

Centesimal composition (g%)					Kcal%
Proteins	carbohydrates	lipids	ashes	fibers	
23,27	56,81	4,24	6,60	8,00 ^b	358,48

a: Items of enrichment per Kg of ration: folic acid (14,00mg), antioxidants (150,00mg), biotin (0,20mg), cobalt (2,00mg), copper (30,00mg), choline (2.800,00mg), iron (180,00mg), iodine (2,00mg), manganese (110,00mg), niacin (242,00), selenium (0,20mg), calcium pantothenate (100,00), pyridoxine (12,00mg), (4.4000,00UI), vitamin A (28.000,00UI), vitamin B12 (44,00mg), vitamin B2 (28,00mg), vitamin D3

b: According to Agribands of Brazil

c: Source: Experimentation and Food Analyses Lab, DN/UFPE.

Table 2. Composition of the regular and low protein diets, with adaptations, based on casein, according Reeves; Nielsen; Fahey (1993).

Constituents	Regular protein diet (17%)	Low protein diet (8%)
*g%	100,0	100,00
Proteins	17,30	8,10
Carbohydrates	65,90	75,10
Lipids	7,00	7,00
Fibers	5,00	5,00
Vitamins	1,00	1,00
Minerals	3,50	3,50
Methionine	0,30	0,30
% Kcal	363,44	362,48

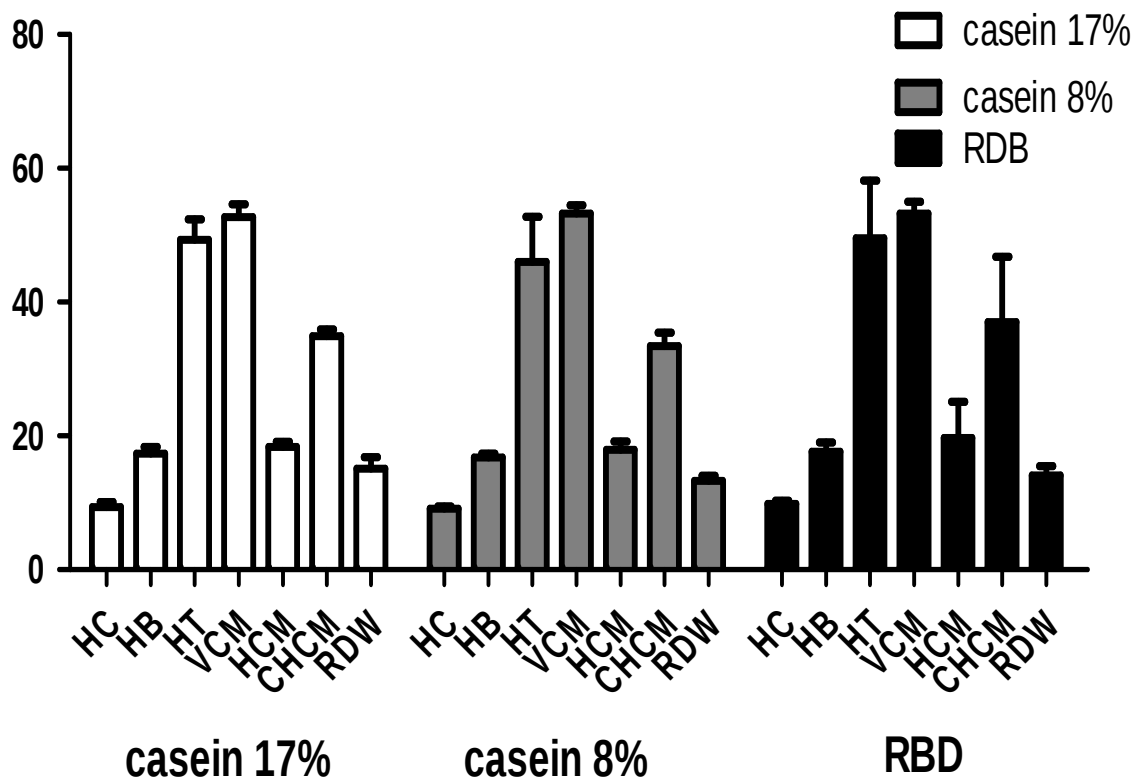
* grams

Table 3. Centesimal Composition of the Regional Basic Diet (RBD), as reported in Teodósio *et al.*, (1990). RBD is totally deprived of water soluble and fat soluble vitamins.

Ingredients	g%	Centesimal composition					Kcal%
		Proteins	Carbohydrates	Fats	Ash	Fibers	
Beans ^a	18.34	3.99	10.66	0.24	0.57	1.09	60.76
Manioc flour	64.81	0.84	48.59	0.12	0.43	5.64	198.80
Dried & salted meat^a	3.74	2.74	-	0.06	0.06	-	11.50
Dried & salted fat	0.35	-	-	0.35	-	-	3.15
Sweet potato^a	12.76	0.30	9.99	0.03	0.20	0.48	41.43
Total	100.00	7.87	69.24	0.80	1.26	7.21	315.64

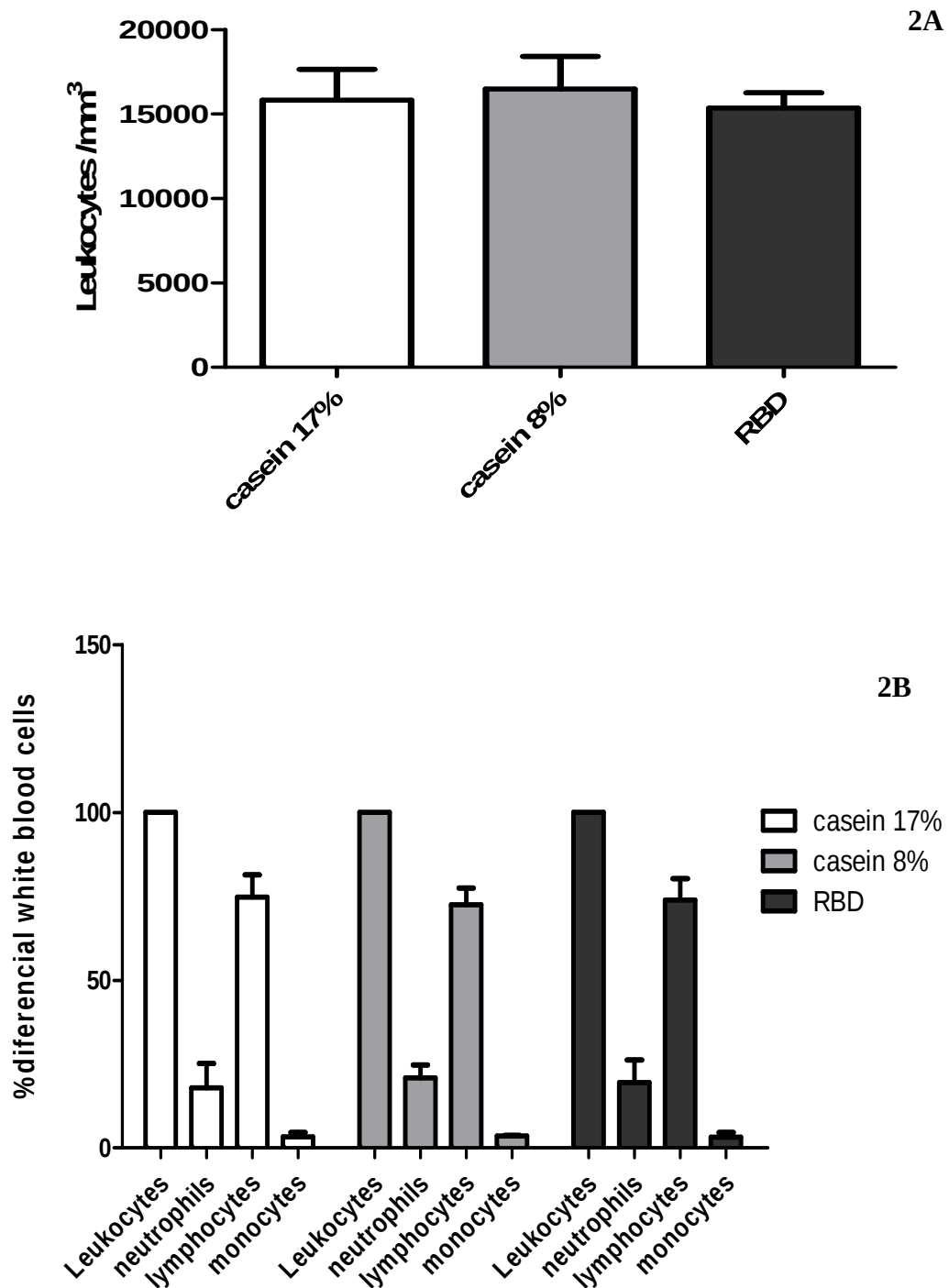
a: cooked in water and dried.

Online Supporting Material



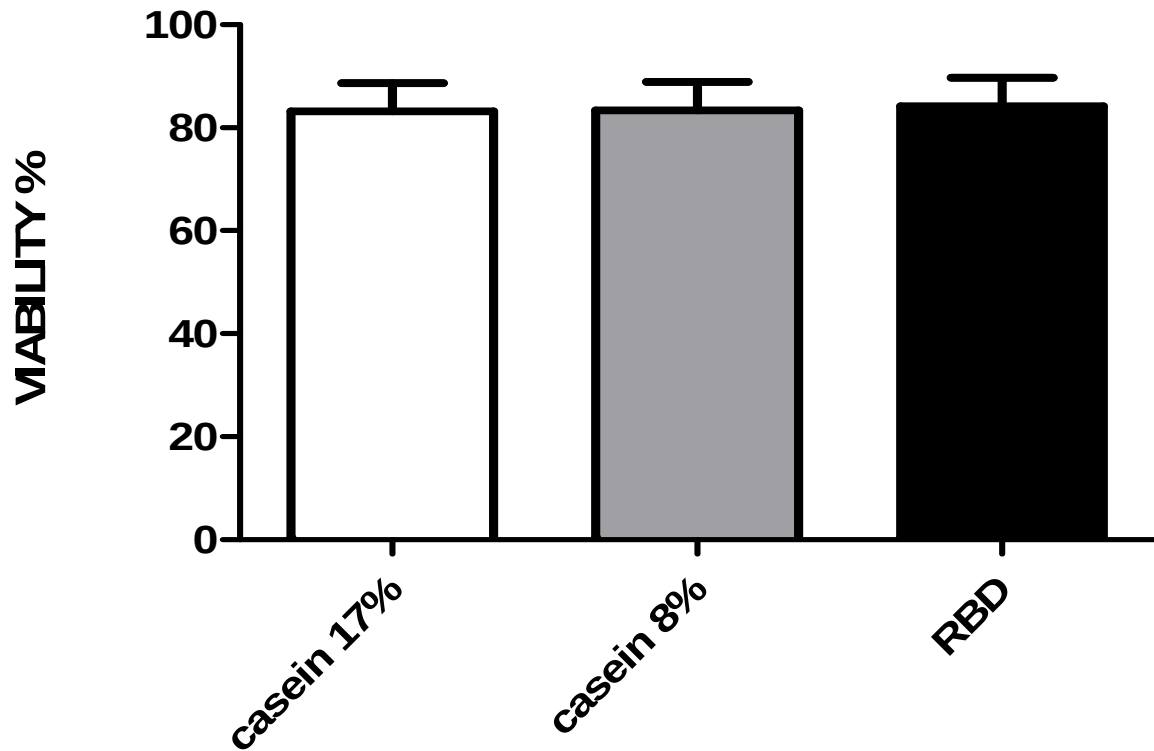
Supplemental Figure 1: Hematological values of the red series in rats. Casein 17%: group regular (N=13), casein 8%: malnourished group with diet containing 8% casein (N=6). RBD: malnourished group with diet containing 8% of protein, especially vegetal (N=10). HC: erythrocytes, HB: hemoglobin, HT: hematocrit, VCM: corpuscular average volume, HCM: corpuscular average hemoglobin, CHCM: corpuscular average hemoglobin concentration, RDW: red cell distribution width. There was no difference among the groups (two-way ANOVA followed by “Bonferroni posttest”)

Online Supporting Material



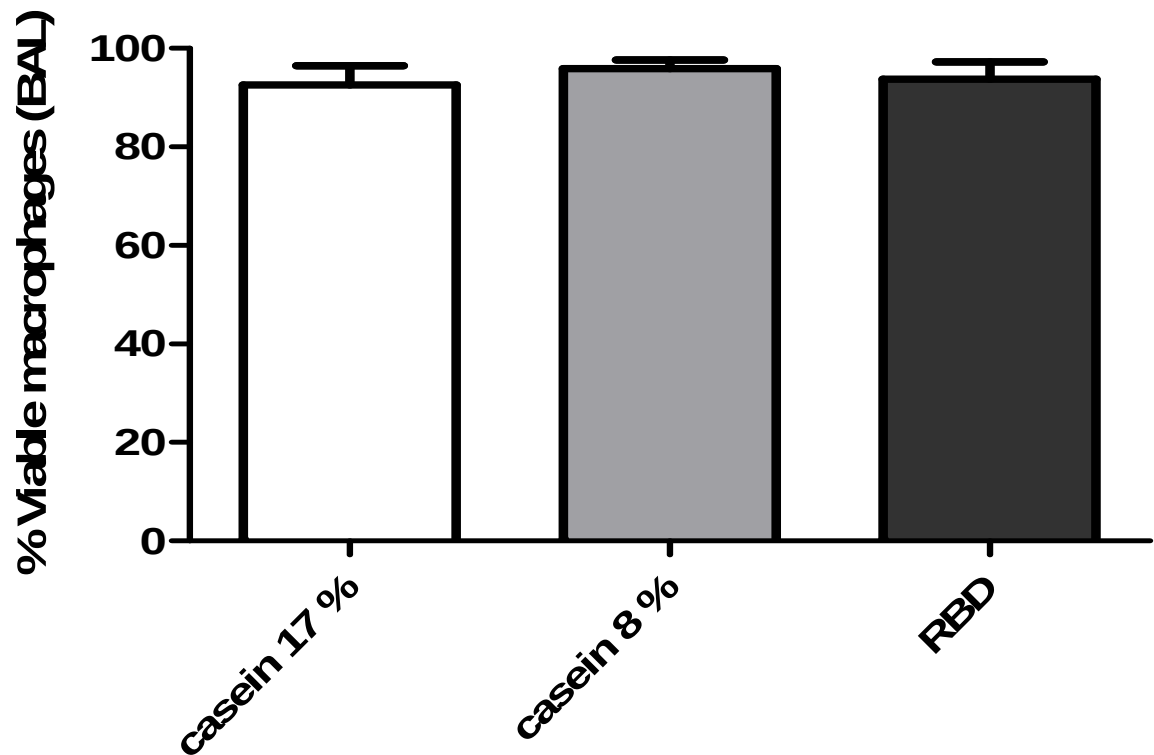
Supplemental Figure 2: Hematological values of the white series rats. Casein 17%: group regular (N=13), casein 8%: malnourished group with diet containing 8% casein (N=6). RBD: malnourished group with diet containing 8% of protein, especially vegetal (N=10). 2A: total number of leukocytes/mm³ (one-way ANOVA followed by Tukey posttest). 2B: differential counting of the leukocytes, percentage values (two-way ANOVA followed by “Bonferroni posttests”). There was no difference among the groups.

Online Supporting Material



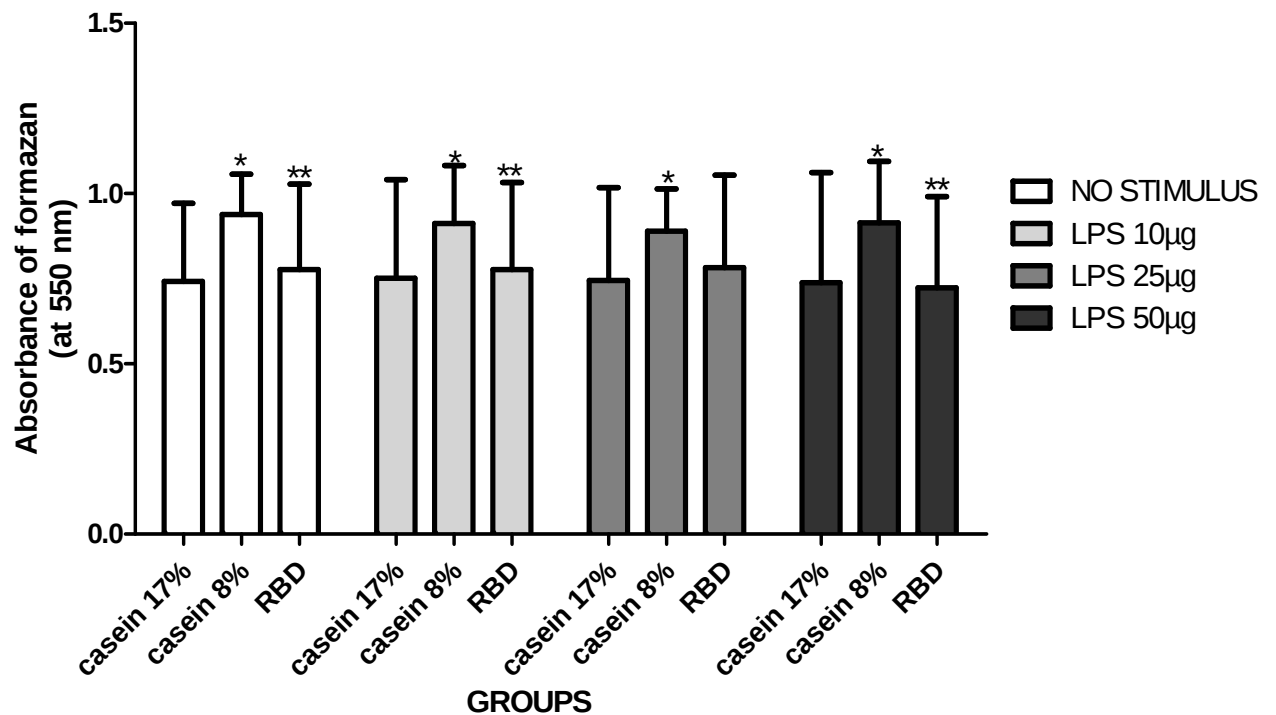
Supplemental Figure 3: Analyze of the integrity of the BAL's cell membrane by flow cytometer. Casein 17%: group regular (N=13), casein 8%: malnourished group with diet containing 8% casein (N=6), RBD group (N=10). There was no statics difference among the groups (one-way ANOVA follow by Tukey posttest).

Online Supporting Material



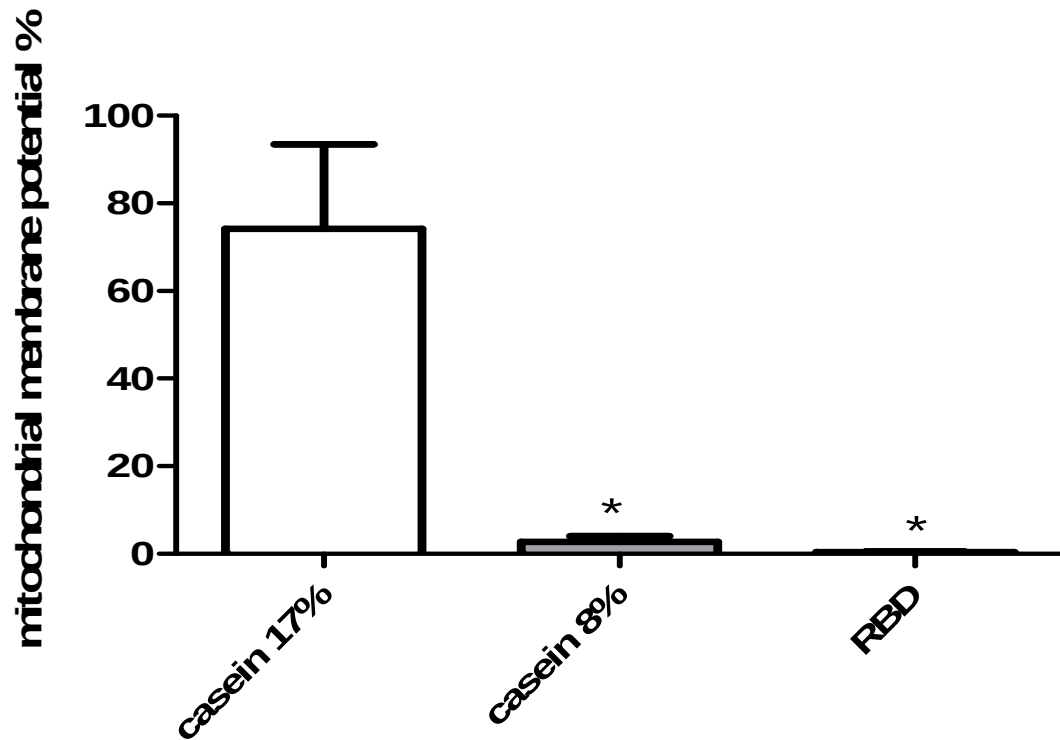
Supplemental Figure 4: Determination of the percentage of viable BAL's macrophages by trypan blue. Casein 17%: group regular (N=13), casein 8%: malnourished group with diet containing 8% casein (N=6), RBD group (N=10). There was no statics difference among the groups (one-way ANOVA folloew by Tukey posttest).

Online Supporting Material



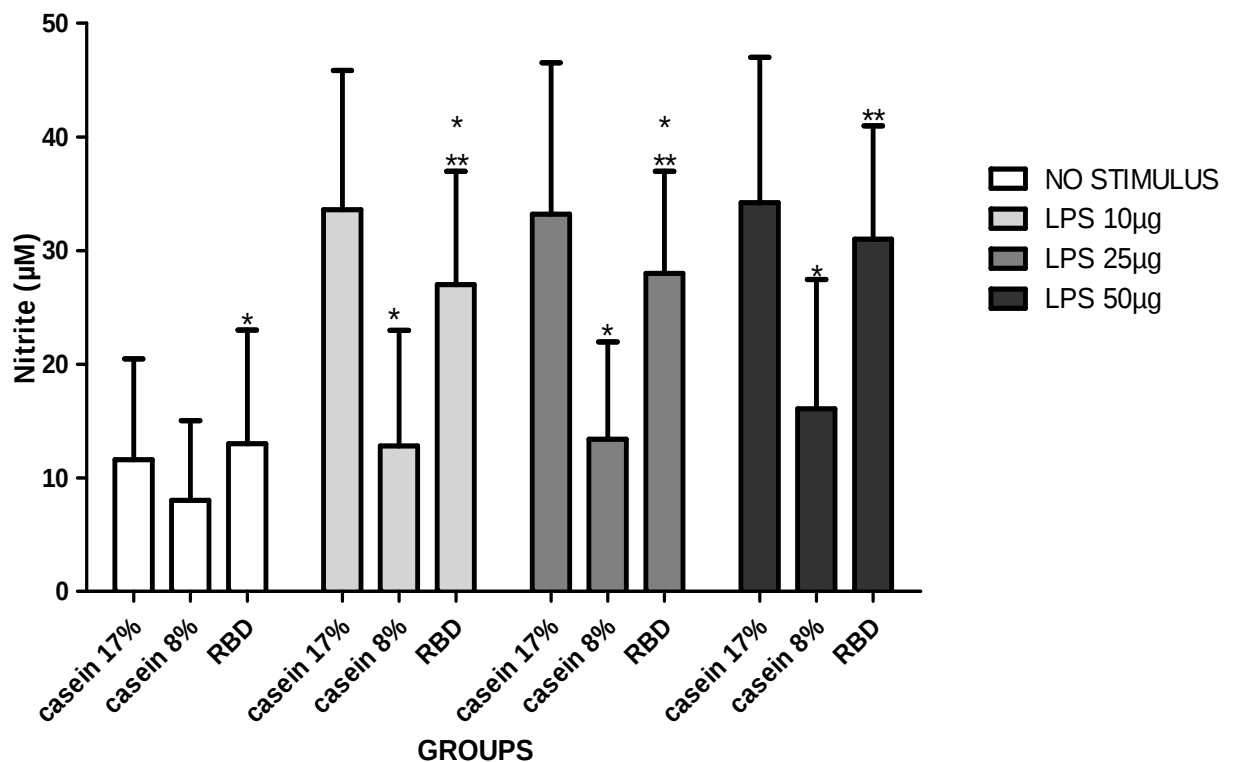
Supplemental Figure 5: Formazan production in the supernatant culture of alveolar macrophage of 360 days old animals by the reduction technique 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenzil tetrazolium bromide (MTT) to formazan. Casein 17%: group regular (N=13), casein 8%: malnourished group with diet containing 8% casein (N=6), RBD group (N=10). *significant difference between the group casein 8% and the regular nourished group with $p < 0.05$ (two-way ANOVA followed by “Bonferroni posttests”). ** significant difference between RBD group and group casein 8% with $p < 0.05$ (two-way ANOVA followed by “Bonferroni posttests”). Worth mentioning that the different concentrations of LPS did not conferred variations on the alveolar macrophage’s viability on both groups.

Online Supporting Material



Supplemental Figure 6. Determination of the transmembrane potential of the BAL's mitochondria's cells by flow cytometer. Casein 17%: group regular (N=13), casein 8%: malnourished group with diet containing 8% casein (N=6), RBD group (N=10). The malnourished groups presented significantly low values of transmembrane potential of mitochondria (* $P < 0,0001$, one way ANOVA followed by Tukey posttest), indicative alteration of the apoptotic phase.

Online Supporting Material



Supplemental Figure 7. Nitrite production in the supernatant culture of alveolar macrophage of 360 days old animals. The values are exposed in media +/- standard deviation, with n=13 for control, n=6 for casein 8% and n=10 for RBD. *significant difference between group casein 8% or RBD and group control with $p < 0,05$ (two-way ANOVA followed by "Bonferroni posttests). ** significant difference between group RBD and group casein 8% with $p < 0,05$ (two-way ANOVA followed by "Bonferroni posttests"). Worth mentioning that the different concentrations of LPS did not conferred variations on the nitrite production on the supernatant culture of alveolar macrophage on both groups

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A desnutrição proteica pós-natal imediata causou consequências em longo prazo sobre a função e viabilidade de macrófagos alveolares de ratos adultos. O estudo quantitativo das células do sistema hematológico, no entanto, não demonstrou alterações, o que levanta a possibilidade da ocorrência de adequações orgânicas ao longo do tempo, proporcionada pelo extenso período de recuperação nutricional. Tais adequações resultariam em um padrão morfológico normal das células, contudo, como foi visto, a funcionalidade destas células permaneceu alterada.

A desnutrição pela DBR causou modificação da curva ponderal, com identificação de menor peso persistente, mesmo após longo período de ingestão de dieta normal. A curva ponderal ilustrou a severidade da desnutrição causada pela DBR, em contraponto, a dieta purificada hipoprotéica não demonstrou alterar a curva ponderal, o que não significa que sua ação no sistema imune tenha sido menos ofensiva.

Observou-se que a manipulação dietética ocasionou menor produção de nitrito pelos macrófagos, estando estas células mais ativadas (maior valor basal, na ausência de estímulos antigênicos), contudo menos responsivas quando estimuladas com agente antigênico. Este fato pode ser explicado por uma possível alteração do metabolismo destas células, bem como pelo possível desequilíbrio de citocinas e mediadores químicos pró e antiinflamatórias, que mesmo não sendo o foco de nosso estudo, são sabidamente influenciadores do processo de ativação do sistema imune.

Outro dado relevante encontrado foi a variação de resultados quanto a viabilidade das células de acordo com o tipo de método utilizado. A avaliação deste parâmetro por meio do uso de algumas técnicas de apoptose e metabolismo permitiu vislumbrar um quadro indicativo de iminente processo de morte celular. As células apresentaram integridade da membrana e boa viabilidade por métodos colorimétricos, indicando estarem vivas, por outro lado, tiveram

baixa responsividade ao estímulo antigênico e conseqüentemente menor morte por ativação, demonstrando estar funcionalmente alteradas, o que pôde ser entendido quando a avaliação do potencial transmembrânico da mitocôndria destas células indicaram alto dano mitocondrial.

Novos estudos ajudarão a desvendar os mecanismos pelos quais a desnutrição em períodos críticos de desenvolvimento prejudica o equilíbrio do sistema imune. Neste sentido, pesquisas podem ser realizadas a fim de testar a ação de alguns mediadores químicos na função destas células, buscando compreender como outros sistemas orgânicos, como o neuroendócrino poderia melhorar ou potencializar os efeitos da desnutrição. O entendimento aprofundado destes mecanismos poderá, quem sabe, no futuro, permitir a prevenção dos efeitos deletérios da má nutrição no início da vida, quer seja por meio de intervenção medicamentosa, nutricional ou com mudanças dos hábitos de vida.

8. REFERÊNCIAS

- ALBERS, R.; ANTOINE, J.M.; BOURDET-SICARD, R.; CALDER, P.C.; GLEESON, M.; LESOURD, B.; SAMARTIN, S.; SANDERSON, I.R.; VAN LOO, J.; VAS DIAS, F.W.; WATZL, B. Markers to measure immunomodulation in human nutrition intervention studies. **Br J Nutr.** v. 94, p.452–481, 2005.
- BADR, G.; MOHANY, M. Maternal perinatal undernutrition attenuates T-cell function in adult male rat offspring. **Cell Physiol Biochem.** v.27, n.3-4, p.381-90, 2011.
- BARJA-FIDALGO, C.; SOUZA, E.P.; SILVA, S.V.; RODRIGUES, A.L.; ANJOS-VALOTTA, E.A.; SANNOMYIA, P.; DEFREITAS, M.; MOURA, A.S. Impairment of inflammatory response in adult rats submitted to maternal undernutrition during early lactation: role of insulin and glucocorticoid. **Inflamm Res.** v.52, n.11, p.470-6, 2003.
- BARKER, D.J.P. Developmental origins of adult health and disease. **J Epidemiol Community Health.** v.58, p.114–115, 2004.
- BARKER, D.J.P. The origins of the developmental origins theory. **J Inter Med.** v.261, p.412–417, 2007.
- BARKER, DJP. Mothers, Babies and Health in Later Life. Edinburgh: Churchill ivingstone, 1998.
- BARRETO-MEDEIROS, J.; QUEIROS-SANTOS, A.; CABRAL-FILHO, J.E.; FERREIRA E SILVA, W.T.; LEANDRO, C.G.; DEIRÓ, T.C.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; MACHADO BARBOSA DE-CASTRO, C.M. Stress/aggressiveness-induced immune changes are altered in adult rats submitted to neonatal malnutrition. **neuroimmunomodulation.** v.14, n.5, p.229-334, 2007.
- BATESON, P. Fetal experience and good adult design. **Int. J. Epidemiol.** v.26, p.561–570, 2001.
- BODEY, B.; BODEY, B. Jr.; SIEGEL, S.E.; KAISER, H.E. Intrathymic non-lymphatic hematopoiesis during mammalian ontogenesis. **In Vivo.** v.12, p.599–618, 1998
- BUCKLEY, A.J.; JAQUIERY, A.L.; HARDING, J.E. Nutritional programming of adult disease. **Cell Tissue Res.** v.322, p.73–79, 2005.
- CALDER, P.C.; KRAUSS-ETSCHMANN, S.; DE JONG, E.C.; DUPONT, C.; FRICK, J.S.; FROKIAER, H.; HEINRICH, J.; GARN, H.; KOLETZKO, S.; LACK, G.; MATTELIO, G.; RENZ, H.; SANGILD, P.T.; SCHREZENMEIR, J.; STULNIG, T.M.; THYMANN, T.; WOLD, A.E.; KOLETZKO, B. Early nutrition and immunity – progress and perspectives. **Brit J Nutr** 96:774–790, 2006.
- CHANDRA, R.K.; NEWBERNE, P.M. Nutrition, immunity and infection mechanisms of interactions. **Plenum**, New York, 1977.

CUMMINGS, J.H.; ANTOINE, J.M.; AZPIROZ, F. PASSCLAI, M. Gut health and immunity. **Eur J Nutr.** v.43, Suppl. 2, p.II118–II173, 2004.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; MCNEELEY, D.F.; MOON, A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. **J Allergy Clin Immunol.** v.115, p.1119–1128, 2005.

CURLE, D.C.; ADAMSON, I.Y. Retarded development of neonatal rat lung by maternal malnutrition. **J Histochem Cytochem.** v.26, Suppl 5, p.401-8, 1978.

DE CASTRO, C. M., *et al.* Effect of stress on the production of O₂(-) in alveolar macrophages. **J Neuroimmunol**, v.108, n.1-2, Aug 1, p.68-72. 2000.

DESAI, M.; CROWTHER, N.J.; LUCAS, A.; HALES, C.N. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. **Br J Nutr.** v.76, n.4, p.591-603, 1996.

DOERFLINGER, A.; SWITHERS, S.E. Effects of diet and handling on initiation of independent ingestion in rats. **Dev Psychobiol.** v.45, p.72–82, 2004.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **State of Food Insecurity in the World 2010.** Roma: 2010.

FERREIRA-E-SILVA, W.T; GALVÃO, B.A.; FERRAZ-PEREIRA, K.N.; DE-CASTRO, C.B.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Perinatal Malnutrition Programs Sustained Alterations in Nitric Oxide Released by Activated Macrophages in Response to Fluoxetine in Adult Rats. **Neuroimmunomodulation.**16:219-227, 2009.

GHI (GLOBAL HUNGER INDEX). **The Challenge of Hunger: Taming Price Spikes and Excessive Food Price Volatility.** Bonn, Washington, DC, Dublin: 2011

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A.; BUKLIJAS, T.; LOW, F.M.; BEEDLE, A.S. Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. **Nat Rev Endocrinol.** 5 (7):401-8, 2009.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. **Science**, v. 305, n. 5691, p. 1733–1736, 2004.

GODFREY, K.M.; BARKER, D.J. Fetal nutrition and adult disease. **Am J Clin Nutr.** v.71, p.1344S–1352S, 2000.

GODFREY, K.M.; GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A. Developmental origins of metabolic disease: life course and intergenerational perspectives. **Trends Endocrinol Metab.** Apr;21(4):199-205, 2010.

HANSON, M.; GODFREY, K.M.; LILLYCROP, K.A.; BURDGE, G.C.; GLUCKMAN, P.D. Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: Theoretical considerations and epigenetic mechanisms. **Prog Biophys Mol Biol.** 2011

KHAN, I.Y.; DEKOU, V.; DOUGLAS, G.; JENSEN, R.; HANSON, M.A.; POSTON, L.; TAYLOR, P.D. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular

dysfunction in adult offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v.288, p.R127–R133, 2005.

KHAN, I.Y.; DEKOU, V.; HANSON, M.A.; POSTON, L.; TAYLOR, P.D. Predictive adaptive responses to maternal high-fat diet prevent endothelial dysfunction but not hypertension in adult rats offspring. **Hypertension.** v.110, p.1097–1102, 2004.

KLEIN, C.J.; HEIRD, W.C. Summary and comparison of recommendations for nutrient contents of low-birth-weight infant formulas. Bethesda, Maryland: **Life sciences Research Office**, 2005. Available at: www.lsro.org/articles/lowbirthweight_rpt.pdf

LANDGRAF, MA, TOSTES Rde C, BORELLI P, ZORN TM, NIGRO D, CARVALHO MH, Fortes ZB. Mechanisms involved in the reduced leukocyte migration in intrauterine undernourishment. **Nutrition.** Feb;23(2):145-56, 2007.

LE DOUARIN, N.M. The claudes bernard lecture, 1987. Embryonic chimeras: a tool for studying the development of the nervous and immune systems. **Proc R Soc Lond B Biol Sci** 235:1–17, 1988.

LORENZI, T.F. **Manual de Hematologia:** Propedêutica e Clínica. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan, 2006.

LUCAS. A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. **Archives of Disease in Childhood.** 71: 288-290, 1994.

MARSHALL, C.J.; THRASHER, A.J. The embryonic origins of human haematopoiesis. **Br J Haematol.** (112):838–850, 2001.

MCDADE, T.W.; BECK, M.A.; KUZAWA, C.; ADAIR, L.S. Prenatal undernutrition, postnatal environments, and antibody response to vaccination in adolescence. **Am J Clin Nutr.** v.74, p.543–548, 2001.

MCDADE, T.W. Life history, maintenance, and the early origins of immune function. **Am J Hum Biol.** v.17, Suppl 1, p.81-94, 2005.

MCMILLEN, I.; JEFFREY, C.; ROBINSON, S. Developmental Origins of the Metabolic Syndrome: Prediction, Plasticity, and Programming. **Physiol Rev.** v. 85, p. 571–633, 2005.

MONTE, C. M.G. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. **Jornal de Pediatria.** 76 (3): S285-S297, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **JIM.**;65(1-2):55-63, 1983.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGGLIACCI, M.C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods.** 139: 271–279, 1991.

OLIVEIRA, D. A. G.; SGARBIERI, V. C. Impacto de diferentes fontes proteicas sobre o desenvolvimento celular hepático de ratos recém-desmamados submetidos à dieta restritiva

seguida de recuperação alimentar. **Nutrire**: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr., v. 36, n. 1, p. 1-21, abr. 2011.

ORTIZ, R.; CORTÉS, L.; CORTÉS, E.; MEDINA, H. Malnutrition alters the rates of apoptosis in splenocytes and thymocyte subpopulations of rats. **Clin Exp Immunol**. v. 155, n.1, p. 96–106, 2009.

PETERS-GOLDEN, M.; CANETTI, C.; MANCUSO, P.; COFFREY, M.J. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. **J Immunol**. v.173, p.589–594, 2004.

PIRES, J.; CURI, R.; OTTON, R. Induction of apoptosis in rat lymphocytes by starvation. **Clin Sci (Lond)**.v.112, n.1, p.59-67, 2007.

PLUM, J.; DE SMEDT, M.; VERHASSELT, B.; KERRE, T.; VANHECKE, D.; VANDEKERCKHOVE, B.; LECLERCQ, G. Human T lymphopoiesis. In vitro and in vivo study models. **Ann N Y Acad Sci**. v.917, p.724–731, 2000.

PERES, C.M.; CURI, R. **Como Cultivar Células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PITHON-CURI, T. C., DE MELO, M. P.; CURI, R. "Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: a comparative study." **Cell Biochem Funct** 22(5): 321-326, 2004.

PRESTES-CARNEIRO, L.E., LARAYA, R.D., SILVA, P.R., MOLITERNO, R.A., FELIPE, I., MATHIAS, P.C. Long-term effect of early protein malnutrition on growth curve, hematological parameters and macrophage function of rats. **J Nutr Sci Vitaminol**; 52(6):414-20, 2006.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. Jr. 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. **J Nutr**. Nov;123(11):1939-51,1993.

ROLLS, B.A.; GURR, M.I.; VAN DUJVENVOORDE, P.M.; ROLLS, B.J.; ROWE, E.A. Lactation in lean and obese rats: effect of cafeteria feeding and of dietary obesity on milk composition. **Physio Behav**. v.38, p.185–190, 1986.

SCHULENBURG, H., KURZ, C.L., EWBANK, J.J. Evolution of the innate immune system: the worm perspective. **Immunol Rev**.198:36-58, 2004.

SCHWEIGERT, I.D.; SOUZA, D.O. G. de; PERRY, M.L.S. Desnutrição, maturação do sistema nervoso central e doenças neuropsiquiátricas. **Rev. nutr**; 22(2): 271-281, mar.-abr. 2009.

SCRIMSHAW, N.S. Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection. **J Nutr**.133:316S-21S, 2003.

SILVA, S.V.; GARCIA-SOUZA, E.P.; MOURA, A.S.; BARJA-FIDALGO, C. Maternal protein restriction during early lactation induces changes on neutrophil activation and TNF- α production of adult offspring. **Inflammation**. v.33, n.2, p.65-75, 2010.

SLOBODA, D.M.; BEEDLE, A.S.; CUPIDO, C.L.; GLUCKMAN, P.D.; VICKERS, M.H. Impaired perinatal growth and longevity: a life history perspective. **Curr Gerontol Geriatr Res.** Set; 608740. 2009.

SPENCER, S.J.; MARTIN, S.; MOUIHATE, A.; PITTMAN, Q.J. Early-Life Immune Challenge: Defining a Critical Window for Effects on Adult Responses to Immune Challenge. **Neuropsychopharmacology.** 31: 1910–1918, 2006.

SWITHERS, S.E.; MELENDEZ, R.I.; WATKINS, B.A.; DAVIS, J. Metabolic and behavioral responses in pre- weanling rats following alteration of maternal diet. **Physiol Behav.** v.72, p.147–157, 2001.

TEODÓSIO, N.R.; LAGO, E.S.; ROMANI, A.S.; GUEDES, R.C.A. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Arch Latino am Nutr.** 40(4): 533-47, 1990.

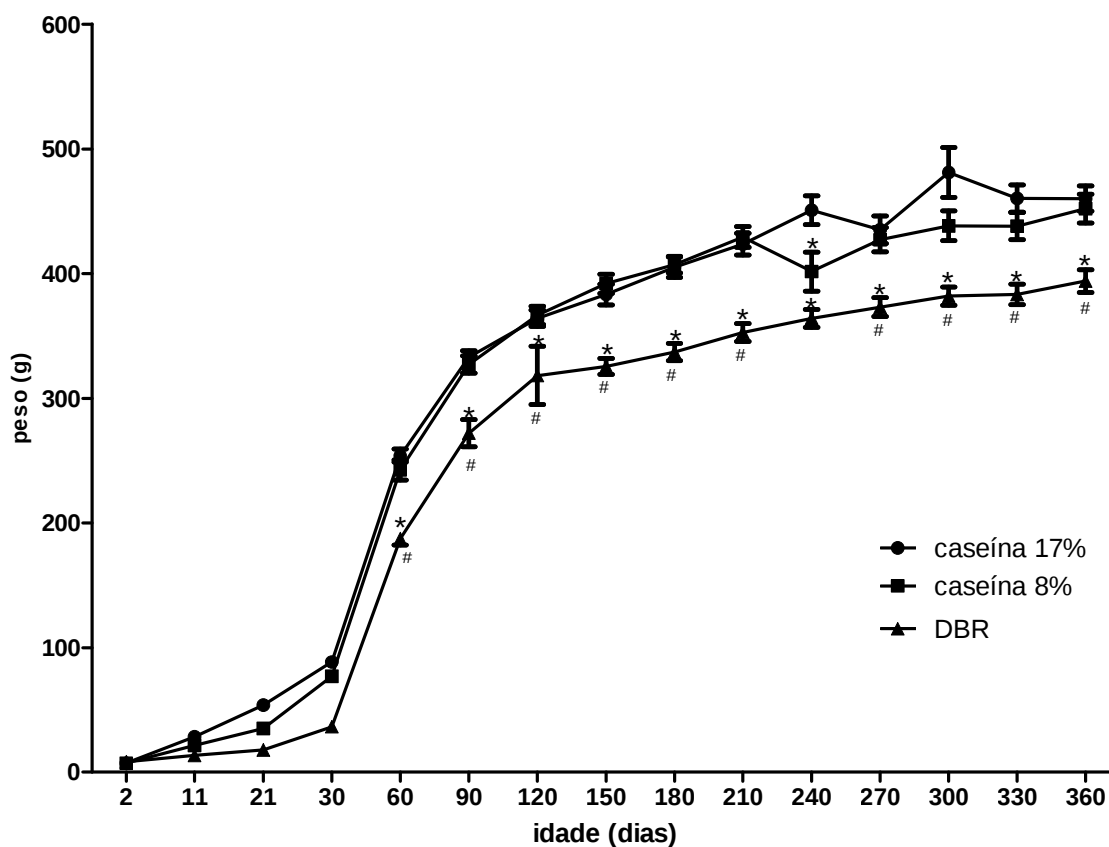
THURNHAM, D.I. Micronutrients and immune function: some recent developments. **J Clin Pathol.** v. 50, p.887–891, 1997.

WATERLAND, R. A.; MICHELS, K. B. Epigenetic epidemiology of the developmental Origins hypothesis. **Annual Review of Nutrition.** v. 27, n. 1, p. 363–388, 2007.

ZADIK, Z. Maternal nutrition, fetal weight, body composition and disease in later life. **J Endocrinol Invest.** v.26, p.941–955, 2003.

ZAGO, M.A; FALCÃO, R.P; PASQUINI, R. **Hematologia:** Fundamentos e Práticas. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

APÊNDICE A- Gráfico da curva ponderal dos animais em estudo



Curva ponderal dos animais: O grupo caseína 8% apresentou ganho ponderal similar ao grupo caseína 17%, mesmo tendo recebido dieta hipoprotéica durante a lactação. O grupo DBR, por sua vez apresentou ganho ponderal significativamente mais baixo que o grupo caseína 17% e também se comparado ao grupo caseína 8%. O grupo DBR não apresentou recuperação ponderal após a introdução da dieta normal. * diferença significativa entre o grupo DBR e o grupo controle com $p < 0.05$ (two-way ANOVA seguido de "Bonferroni posttests"). # diferença significativa entre o grupo DBR e o grupo caseína 8%. com $p < 0.05$ (two-way ANOVA seguido de "Bonferroni posttests").

ANEXO A



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE
 Fone: (81) 2126.8470/8471/8475 Fax: (81) 2126.8473
 chefianutricao@ufpe.br



CARTA DE ANUÊNCIA

Declaramos para os devidos fins que concordamos em receber Queliene Gomes da Silva Carvalho, mestranda da Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, facultando-lhe o uso das instalações, biotério e Sala de cultura e Multiusuária do Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica (LENIB) do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (DN/UFPE), para o desenvolvimento da pesquisa intitulada: **PROGRAMAÇÃO NUTRICIONAL PELA DESNUTRIÇÃO: EFEITO SOBRE A FUNÇÃO DO MACRÓFAGO ATRAVÉS DA INVESTIGAÇÃO DA VIA SEROTONINÉRGICA**, sob a orientação da Profª Drª Wylla Tatiana Ferreira e Silva.

Recife 13 de julho de 2010.

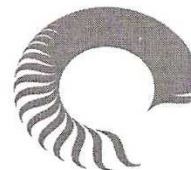
Dr. Raul Manhães de Castro
 Prof. do Deptº. de Nutrição - UFPE.
 e-mail: rcastro@nutricao.ufpe.br
 CRM 6903

*A aluna em pauta
 deverá se submeter aos
 procedimentos de utilização *
 de cada laboratório do LENIB
 em acordo com toda a responsabilidade
 do biotério claro/exato não
 está disponibilizado para
 outros usuários no
 momento além dos
 já programados.*

ANEXO B

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



Recife, 25 de agosto de 2010.

Ofício nº 309/2010

Da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Wylla Tatiana Ferreira e Silva**

Departamento: Núcleo de Nutrição – Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.031545/2010-60

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, **“PROGRAMAÇÃO NUTRICIONAL PELA DESNUTRIÇÃO: EFEITO SOBRE A FUNÇÃO DO MACRÓFAGO ATRAVÉS DA INVESTIGAÇÃO DA VIA SEROTONINÉRGICA.”**

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.

Observação:

Origem dos animais: Biotério de Experimentação do Departamento de Nutrição, Animais: Ratos, sexo: Machos; Idade: 180(cento e oitenta) dias; Nº de Animais : 45(quarenta e cinco).

Atenciosamente,


 Prof. Maria Teresa Jansen
 Presidente do CEEA



ANEXO C



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Patologia

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE
 Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo
 Fone/Fax: (81) 2126.8529
<http://www.pgmap@ufpe.br> <http://www.pospat.ufpe.br>



Recife, 09 de Novembro de 2010.

Ao: Responsável pelo setor de Laboratório do Hospital das Clínicas HC-PE
 Sr. Juliano Cazuzu.

A fim de viabilizar o projeto **“PROGRAMAÇÃO NUTRICIONAL PELA DESNUTRIÇÃO: EFEITO SOBRE A FUNÇÃO DO MACRÓFAGO ATRAVÉS DA INVESTIGAÇÃO DA VIA SEROTONINÉRGICA** (Comitê de Ética no uso de Animais, CEUA-UFPE ofício nº 309/2010; processo nº 23076.031545/2010-60) da mestrandia: Queliane Gomes da Silva Carvalho, sob orientação da Dr^a. Wylla Tatiana Ferreira e Silva, solicita-se a realização da contagem de células total e a diferencial de leucócitos de amostras de sangue.

Tais amostras serão oriundas dos ratos submetidos ao protocolo de desnutrição na lactação (caseína 8% e dieta básica regional) bem como de seu grupo controle, totalizando 45 amostras a serem processadas entre os meses de Novembro/2010 e Maio/2011.

Vale salientar que estas amostras serão processadas com o auxílio de Danielly do Rêgo Ageu de Lima, biomédica do referido setor.

Desde já agradecemos a colaboração.

Atenciosamente,

Orientadora: Wylla Tatiana Ferreira e Silva
 Mestranda: Queliane Gomes da Silva Carvalho
 Ciente: De acordo em 09/11/10
 Chefe do Laboratório: _____

Wylla Tatiana Ferreira e Silva
 Centro Acadêmico de Vitória / UFPE
 Professor Adjunto / Nutrição
 SIAPE: 3346571

UFPE - HOSPITAL DAS CLÍNICAS
 Juliano Sávio I. Cazuzu
 Chefe Unidade de Laboratório - ULAB
 CRM - 6888 SIAPE - 1134722

ANEXO D – Submissão do artigo original para a revista The Journal of Nutrition

JN Manuscript Submission

Voltar para mensagens |  

□ The Journal of Nutrition Editorial Office [Adicionar a contatos](#)

Para QUELIANE GOMES da SILVA CARVALHO

08:46 

Responder 

De: **The Journal of Nutrition Editorial Office** (jnsbmit@nutrition.org) 

Enviada: sexta-feira, 17 de fevereiro de 2012 08:46:40

Para: QUELIANE GOMES da SILVA CARVALHO (nealique@hotmail.com)

MS ID#: NUTRITION/2012/160010

MS TITLE: IMMEDIATE POSTNATAL MALNUTRITION CHANGES THE VIABILITY AND FUNCTION OF MACROPHAGE IN ADULT RATS

Dear QUELIANE GOMES da SILVA CARVALHO:

This is an automatic message acknowledging your online submission to JN.

As a reminder, please note that research manuscripts submitted to The Journal of Nutrition are assessed a \$75 submission and handling fee, unless the corresponding author is a member of the American Society for Nutrition. The manuscript submission fee is not assessed on the following manuscript categories: Recent Advances in Nutritional Sciences (RANS), Biographical Article, History of Nutrition, Commentary, invited American Society for Nutrition annual meeting symposia manuscripts, approved supplement publication manuscripts, Letters to the Editor and Errata.

You may submit the fee electronically in the Manuscript Processing System using the Bench>Press secure server. To do this, go to the Author Area (<http://submit.nutrition.org>) and enter the Awaiting Submission Payment queue. For information on how to submit a payment by check or how to request a fee waiver, please see The Journal of Nutrition Instructions for Authors, "Author Fees" section. Payment by credit card is encouraged to ensure expeditious processing of your manuscript.

Unless the manuscript is exempt from the fee or a waiver is granted, manuscripts will not move forward in the review process until payment is received.

Thank you for submitting your work to The Journal of Nutrition.

Sincerely,

The Journal of Nutrition Editorial Office

ANEXO E - Normas para publicação da revista The Journal of Nutrition

GUIDELINES, INCLUDING MANUSCRIPT WORD LIMIT - PLEASE READ CAREFULLY

Manuscripts longer than 7500 words will be returned without review. Word count includes the abstract, all text and the references (but excludes tables.) *The Journal* is limited in the number of pages that can be published each year and article length is a consideration in the editorial process.

Manuscript Preparation:

- Prepare your manuscript in Word 6.0 or later, saving the file in the .doc or .docx format. Please consult the "Help" feature in Word for assistance with fonts, line numbering, etc.
- Times, Times Roman, Courier, Helvetica and Arial are the recommended text fonts. Please see section on [Manuscript Digital Files](#) for information on figure fonts. For best quality conversions of special characters and symbols, use the Symbol font.
- Papers must be completely double-spaced.
- Number lines continuously (not per page) beginning with the abstract. Do not number lines of tables, figures, or literature citations.
- Please refer to ["Manuscript Digital Files"](#) for information on electronic file requirements.
- Use only standard [units of measure \(SI - le Systeme Internationale d'Unites\)](#).
- Use only standard [abbreviations](#).
- Use standard chemical and biochemical terms and follow ASN [nomenclature policy](#).
- Include [Conflict of Interest and Funding Disclosure](#) footnotes.
- Manuscript submissions which are not formatted correctly are returned to authors. For a list of the most frequent reasons manuscripts are returned to authors, please see [Returns to Authors](#)
- Sample Files are available to assist you in the preparation of the paper
 1. The [editorial checklist](#) that is completed for manuscripts being returned to authors for revision or resubmission.
 2. An [example JN manuscript](#), and
 3. Several JN [tables](#) and [figures](#) with comments.
 - 4.

Your Manuscript should include:

[A\) TITLE PAGE](#)

[B\) ABSTRACT PAGE](#)

[C\) INTRODUCTION](#)

[D\) MATERIALS AND METHODS](#)

[E\) RESULTS AND DISCUSSION](#)

[F\) LITERATURE CITED](#)

[G\) ACKNOWLEDGMENTS](#)

[H\) STATEMENT OF AUTHORS' CONTRIBUTIONS TO MANUSCRIPT](#)

A) TITLE PAGE: The title page must include:

1. A title that is composed as a single declarative statement. It should be focused on the results presented in the manuscript. Please do not use a colon or semicolon in the title. Keep the title as generally applicable as possible. It usually is not necessary to include the exact study location or a specific study name in the title, as this information can be included in the abstract.
2. The names of all authors (first name, middle initial, last name) including their departmental and institutional addresses. Indicate which authors are associated with which institutions by numbered footnotes. Identify a corresponding author and provide a mailing address, telephone number, fax number, and email address.
3. A list of all authors' last names exactly as they should appear for PubMed indexing. ASN will not replace files to correct author names once published.
4. The word count for the entire manuscript (title through references). (See http://jn.nutrition.org/site/misc/word_counts.pdf for more information.)
5. The number of figures (to print, not OSM).
6. The number of tables (to print, not OSM).
7. Whether supplemental online material has been submitted.
8. A running title of 48 or fewer characters and spaces.
9. Footnotes to the title disclosing: (a) all sources of financial support; (b) all potential conflicts of interest; (c) the existence of online supporting material, if appropriate (see section on [Online Supporting Material](#)).
- 10.

Conflict of Interest and Funding Disclosure:

Any existing financial arrangements between an author and a company whose product figures prominently in the submitted manuscript or between the author and any company or organization sponsoring the research reported in the submitted manuscript should be brought to the attention of the Editor in the cover letter that accompanies the manuscript submission. In addition, all authors must declare all sources of funding for research reported in their manuscript and report all potential conflicts of interest in separate footnotes on the manuscript title page. If an author has no conflicts of interest, the footnote should list the author's name, followed by "no conflicts of interest". For detailed guidelines on possible conflicts of interest, see the [ASN Journals Conflict of Interest Guidelines](#).

Individuals who are asked to review a manuscript should decline the solicitation if they have a conflict of interest. Detailed guidelines on conflicts of interest for reviewers can be found at [ASN Journals Conflict of Interest Guidelines](#).

B) ABSTRACT PAGE:

The abstract must be a single unstructured paragraph of no more than 250 words summarizing the relevant problem addressed by the study and the theory or hypothesis that guided the research. The abstract should include the study design/methodology and clear statements of the results, conclusions, and importance of the findings.

C) INTRODUCTION:

Background to the research conducted and specific objectives should be clearly indicated. This should not be a comprehensive review of the literature, however.

D) MATERIALS AND METHODS:

Documentation of methods and materials used should be sufficient to permit replication of the research. State the source of specialized materials, diets, chemicals, and instruments and other equipment, with model or catalog numbers, where appropriate. Specify kits, analyzers, and commercial laboratories used. Cite references for methods whenever possible and briefly explain any modifications made.

HUMAN AND ANIMAL RESEARCH Reports of human studies must include a statement that the protocol was approved by the appropriate institutional committee or that it complied with the Helsinki Declaration as revised in 1983. When preparing reports of randomized, clinical trials, authors should refer to the checklist published in the CONSORT Statement and should include as [online supporting material](#) a trial profile summarizing participant flow (2). Include in Methods the sizes (*n*) of initial (recruited, enrolled) and final groups. Research on animals should include a statement that the protocol was approved by the appropriate committee or complied with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (3). Describe how animals were killed. Describe control and experimental animals or participants, giving age, weight, sex, race, and for animals, breed or strain. Include the supplier of experimental animals.

DIETS Composition of control and experimental diets must be presented. When a diet composition is published for the first time in *The Journal of Nutrition*, utilize a table or a footnote to provide complete information on all components. If previously described in *The Journal of Nutrition* or *The American Journal of Clinical Nutrition*, a literature citation may be used. State specifically any modifications made to the published diet compositions. The proximate composition of closed formula diets should be given as amounts of protein, energy, fat, and fiber. Components should be expressed as g/kg diet. Vitamin and mineral mixture compositions should be included using *Journal of Nutrition* units and nomenclature. For a discussion of the formulation of purified animal diets, refer to Baker (4) and to a series of ASN publications (5-8).

STATISTICAL

METHODS

Describe all statistical tests utilized and indicate the probability level (*P*) at which differences were considered significant. If data are presented in the text, state what they represent (e.g. means $\pm$ SEM). Indicate whether data were transformed before analysis. Specify any statistical computer programs used.

Present the results of the statistical analysis of data in the body of each table and on figures per se. Use letters or symbols to indicate significant differences; define these in a table footnote or the figure legend. Provide the appropriate statistics of variability. An estimate of the error variance (SD or SEM) of group means should be displayed. Standard ANOVA methodology assumes a homogeneous variance. If error variance is tested and found to be heterogeneous, data should be transformed before ANOVA, or nonparametric tests should be used. For a discussion of variability calculations and curve-fitting procedures, see Baker (4).

The number of significant digits presented for a variable should be correct and consistent. Use no more than 3 significant digits (fewer, if appropriate) or justify the need for greater precision. (e.g. For diets, 17.8% or 18% fat, not 17.77% fat; for blood metabolite, 10.3 mmol/L not 10.257 mmol/L) Base the number on the precision of the analytical method and round accordingly.

If non-significant *P* values are reported, use only 2 digits past the decimal (e.g. *P*=0.15). Present significant *P* values to a maximum of 4 decimal places (e.g. *P*<0.0001); using fewer is acceptable. Present coefficients to a maximum of 2 decimal places (e.g. *r*=0.87, *R*²=0.16, etc.).

E) RESULTS AND DISCUSSION:

Report the results of the study in the RESULTS section; do not repeat methodology or the experimental design and do not include material that is more appropriate for the INTRODUCTION or DISCUSSION. In the DISCUSSION, explain the importance of the findings, put this into the context of the existing literature, and clearly state the overall conclusions. Do not repeat or present results in this section.

F) LITERATURE CITED

The Journal of Nutrition reference format is consistent with the [International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\) recommended format for bibliographic citations](#) with the following exception: references should include the names of all authors, unless there are more than ten, in which case list the first ten plus "et al." The ICMJE states, "as an option, if a journal carries continuous pagination throughout a volume (as many medical journals do) the month and issue number may be omitted." *The Journal of Nutrition* follows this optional style. If you are using software such as EndNote or Reference Manager that inserts this additional material, it will be automatically deleted during production of accepted manuscripts. Abbreviate journal names according to the [National Library of Medicine \(NLM\) journal abbreviations list](#).

References, including web citations, should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. References cited for the first time in tables or figure legends should be numbered in order, based on the placement of the table or figure in text. Identify references in text, tables, and legends for illustrations by Arabic numbers in parentheses. See current print issues of *The Journal of Nutrition* for style. Authors may add a doi for papers that have a doi number ("digital object identifier" number unique to the publication) to references. It should be included immediately after the citation in Literature Cited.

An example is:

Bodnar LM, Krohn MA, Simhan HN. Maternal vitamin D deficiency is associated with bacterial vaginosis in the first trimester of pregnancy. *J Nutr.* 2009;139:1157-61. doi:10.3945/jn.108.103168

Only published papers and accepted papers that are "in press" may be included in the Literature Cited section. "In press" papers must be submitted as supplemental files in PDF format at the time of manuscript submission. Personal communications from others and unpublished data of the authors, including submitted manuscripts, should appear parenthetically in the text. Include the full name and affiliation of the person providing a personal communication.

There is no limit on the number of citations allowed; recent literature should be comprehensively cited. The list of references must begin on a new page and should include a recognized heading that is not set in all caps (use upper and lower case letters, as shown below). Note that there should be no line numbers on the row with the heading or throughout the section. Recognized headings include the following:

1. References
2. Reference List
3. Literature Cited
4. References and further reading
5. Bibliography
6. Literature

[Reference Manager output style for Journal of Nutrition](#)

G) ACKNOWLEDGMENTS

Technical assistance and advice may be acknowledged in a section at the end of the text. Only named individuals should be included in this section. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone providing a personal communication or acknowledged by name in the manuscript and for providing to the Editor a copy of the permission, if requested.

H) STATEMENT OF AUTHORS' CONTRIBUTIONS TO MANUSCRIPT

Authors must indicate their contribution(s) to the manuscript in the Acknowledgments section. Use the descriptors listed below unless the author performed a function that clearly is not covered by one of these. While not all manuscripts will necessarily include all descriptors, all manuscripts, including reviews, must indicate who is responsible for design, writing, and final content.

1. designed research (project conception, development of overall research plan, and study oversight).
2. conducted research (hands-on conduct of the experiments and data collection).
3. provided essential reagents, or provided essential materials (applies to authors who contributed by providing animals, constructs, databases, etc., necessary for the research).
4. analyzed data, or, performed statistical analysis.
5. wrote paper (only authors who made a major contribution).
6. had primary responsibility for final content.
7. other (use only if categories above are not applicable; describe briefly).
8. All authors have read and approved the final manuscript. For single-authored research papers and reviews, please state: The sole author had responsibility for all parts of the manuscript.

Please do not include "obtained funding" (the initials of authors who received grants may be included in the footnote on the title page regarding Support).

An example is:

A. X., R. F. G., and P. G. Y. designed research; R.F. G. and Q. C. conducted research; P. T. analyzed data; A. X., P. G. Y. and Q. C. wrote the paper. P. G. Y. had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

UNITS OF MEASURE

Most measurements must conform to *le Systeme Internationale d'Unites* (SI) (9). The metric system and the Celsius scale (°C) must be used. Concentrations should be expressed on a molar basis. Except for diet composition, convert to substance concentration, e.g., mol/L. The

denominator should be L. Do not use *M*, *mM*, *N*, etc. Use one of three acceptable options to express measurements. (a) Use SI units exclusively. (b) Use SI units and, if appropriate, provide conventional units parenthetically in the text and give conversion factors in table footnotes and figure legends. (c) Use conventional units, if appropriate, and provide SI units parenthetically in the text and give conversion factors in table footnotes and figure legends. Units should not be pluralized.

Useful websites are:

- SI conversions: <http://www.onlineconversion.com/>
- SI conversions: http://en.wikipedia.org/wiki/Conversion_of_units
- Clinical SI conversions: http://www.unc.edu/~rowlett/units/scales/clinical_data.html
- Clinical SI conversions: <http://dwjay.tripod.com/conversion.html>

ABBREVIATIONS

Use standard abbreviations in *The Journal of Nutrition* without definition. An abridged list is in [Table 2](#). Other common standard abbreviations are listed in Scientific Style and Format [\(1\)](#). If three or more nonstandard (author-defined) abbreviations are used in the text, prepare an abbreviation footnote rather than defining them in the text. The footnote should be associated with the first abbreviated term in the text and should be an alphabetized listing of all author-defined abbreviations and their definitions. Define all group designations parenthetically at first mention [for example, "control (CON) and high-fat (HF) groups"] but also include definitions for these abbreviations in the abbreviation footnote. If there are fewer than three abbreviations used in the text, each abbreviation should be defined in the text at first mention. Any abbreviation used in the abstract should be defined in the abstract at first mention.

All nonstandard abbreviations, including group designations, used in a table or table title, must be defined alphabetically in a footnote to the table title. If the footnote to the table title contains multiple items, the definitions of the abbreviations should be the last item. If a table contains only one abbreviated term in the body of the table, then a separate footnote placed after that abbreviation should be used to define that term. Similarly, all nonstandard abbreviations, including group designations, used in a figure or figure legend must be defined alphabetically at the end of the figure legend.

Abbreviations should not be followed by a period and should not be pluralized (e.g. AA represents both "amino acid" and "amino acids"). Use the verb (e.g. "is" or "are") that is consistent with the context in which the abbreviation is used in the sentence. Units and statistical terms also should not be followed by a period or pluralized. Use the standard abbreviations for SI prefixes found in Young [\(9\)](#) and in [Table 3](#) and those for units of measure in [Table 4](#).

Full gene names are not required for tables and figures in which a database identifier number is given, and the standard gene symbols should not be included in the manuscript's abbreviation footnote. A full citation to the database used should be in Literature Cited and the sequential reference number to the citation provided in the text, figure legend, or table footnote. If the genes are listed in online supporting material (OSM, supplemental tables and figures), the citation can be given as a table footnote or in the figure legend [e.g. National Center for Biotechnology Information (NCBI) Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) or Unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>).]

Abbreviate mouse and rat genes using uppercase (first letter) and lowercase *italicized* letters (e.g., *Ifng* for interferon-gamma, and *Ifng*^{-/-} for the knockout). Abbreviate the protein in all caps, nonitalicized, e.g., IFN γ .

Abbreviate human genes using all uppercase *italicized* letters, e.g., *RBP4* for retinol-binding protein. Abbreviate the protein in all caps, nonitalicized, e.g., RBP4.

For the genes of other mammalian species (pig, etc.), follow the convention for abbreviating human gene and protein names.

If it is necessary to use a nonconventional abbreviation, please define it in the manuscript's abbreviation footnote and in table footnotes and figure legends

For genes that are discussed in some detail in the text of the manuscript, please include a brief word description in parentheses the first time that the gene is mentioned: this is helpful in case readers are unfamiliar with the gene and to avoid ambiguity; for example *CYP3A4* (cytochrome P450 3A4).

NOMENCLATURE

Chemical and biochemical terms and abbreviations and identification of enzymes must conform to the recommended usage of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology [\(10\)](#). Names for vitamins, related compounds, and abbreviations for amino acids should follow the ASN nomenclature policy [\(11,12\)](#).