

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS, NUTRIÇÃO E SAÚDE

ISADORA BRAGA CONTREIRAS CARNEIRO

DESNUTRIÇÃO PROTEICA NA LACTAÇÃO E PLASTICIDADE FENOTÍPICA:
ESTUDO DE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E HEPÁTICOS EM RATOS
ADULTOS SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA PÓS-DESMAME

SALVADOR – BAHIA
2014

ISADORA BRAGA CONTREIRAS CARNEIRO

DESNUTRIÇÃO PROTEICA NA LACTAÇÃO E PLASTICIDADE FENOTÍPICA:
ESTUDO DE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E HEPÁTICOS EM RATOS
ADULTOS SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA PÓS-DESMAME

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde da Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Bomfim de Jesus Deiró

Coorientador: Profa. Dra. Adenilda Queirós Santos Deiró

SALVADOR – BAHIA
2014

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,
SIBI - UFBA.

C289 Carneiro, Isadora Braga Contreiras

Desnutrição proteica na lactação e plasticidade fenotípica: estudo de parâmetros imunológicos e hepáticos em ratos adultos submetidos à dieta hiperlipídica pós-desmame. Salvador, 2014.

65 f.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tereza Cristina Bomfim de Jesus Deiró

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Adenilda Queirós Santos Deiró

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Escola de Nutrição, 2014.

1. Lactação. 2. Nutrição. 3. Imunologia. 4. Fígado. I. Deiró, Tereza Cristina Bonfim de Jesus. II. Deiró, Adenilda Queirós Santos. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 612.3

TERMO DE APROVAÇÃO

Dissertação de autoria de Isadora Braga Contreiras Carneiro, intitulada, “DESNUTRIÇÃO PROTEICA NA LACTAÇÃO E PLASTICIDADE FENOTÍPICA: ESTUDO DE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E HEPÁTICOS EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA PÓS-DESMAME”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos Nutrição e Saúde, Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Alimentos, Nutrição e Saúde.

Banca Examinadora

Jairza Maria Barreto Medeiros

Doutora (Universidade Federal de Pernambuco)

Professora Associada I da Escola de Nutrição - Universidade Federal da Bahia

Wylla Tatiana Ferreira e Silva

Doutora em Nutrição (Universidade Federal de Pernambuco)

Professora Adjunta III do Centro Acadêmico de Vitória (CAV) - Universidade Federal de Pernambuco

Tereza Cristina Bomfim de Jesus Deiró (Orientadora)

Doutora (Universidade Federal de Pernambuco)

Professora Adjunta IV da Escola de Nutrição - Universidade Federal da Bahia

Parecer da Banca Examinadora _____

Salvador, 23 de Abril de 2014

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Nutrição Experimental da Escola de Nutrição, sob a orientação da Professora Dra. Tereza Cristina Bomfim de Jesus Deiró e coorientação da Professora Dra. Adenilda Queirós Santos Deiró. Contou com apoio financeiro do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD)

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. (Albert Eistein)

DEDICATÓRIA

*A minha mãe
Ao Lucas
Aos meus amores Úrsula, Pedro e Matheus*

AGRADECIMENTOS

A Professora Doutora Tereza Cristina Bonfim de Jesus Deiró por me conduzir no caminho da contextualização e da crítica científica.

A Professora Doutora Adenilda Queirós Santos Deiró pela paciência e ensinamentos na coorientação deste trabalho.

A todos os acadêmicos de nutrição do Laboratório de Nutrição Experimental da ENUFBA que fizeram possível a concretização deste trabalho.

A Professora Doutora Jairza Maria Barreto Medeiros por sua disponibilidade e prazer em ajudar sempre.

A Lúcia por sua grande habilidade e ajuda na estatística.

A Professora Doutora Wylla Tatiana Ferreira e Silva por sua ajuda na leitura da fagocitose.

Aos colegas do mestrado, em especial a Gabriela Perez pelos conselhos e disposição à discussão de ideias.

Ao Sr. José Carlos por toda ajuda na resolução dos problemas administrativos ou não e pelo “socorro” constante. Pessoa fundamental para os alunos da pós-graduação.

Ao meu companheiro Lucas pela inspiração e apoio constante.

A minha família, por ser de longe ou perto a maior torcedora pelo meu progresso.

Aos amigos especiais, que me apoiam nos momentos precisos.

A todos aqueles que de uma maneira ou de outra, estiveram ao meu lado, inspirando-me as idéias.

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Ilustrações -----	09
Lista de Tabelas -----	09
Lista de Gráficos -----	09
Lista de abreviaturas e siglas -----	10
Resumo -----	11
Abstract -----	12
1. Introdução -----	13
Transição nutricional: desnutrição e obesidade -----	14
Desnutrição e Período Crítico do Desenvolvimento -----	15
Sistema Imunológico: considerações gerais -----	15
Sistema imunológico mediado pela nutrição -----	17
2. Justificativa -----	20
3. Objetivos -----	22
4. Hipóteses -----	24
5. Metodologia -----	26
5.1. Animais e grupos experimentais -----	27
5.2. Composição das dietas -----	28
5.3. Avaliação corporal -----	29
5.4. Coleta do soro -----	30
5.5. Retirada dos órgãos -----	31
5.6. Aderência de macrófagos -----	31
5.7. Análise estatística -----	33
5.8. Aspectos éticos -----	34
6. Resultados -----	35
7. Discussão -----	42
8. Conclusão -----	50
9. Perspectivas -----	52
9. Referências -----	54

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Filhotes amamentando (A) e ajuste das ninhadas a 8 filhotes (B)	27
FIGURA 2	Organograma dos grupos experimentais	28
FIGURA 3	Dieta padrão (A); dieta hipoproteica (B); dieta hiperlipídica (C)	29
FIGURA 4	Procedimento para coleta do lavado broncoalveolar	32
FIGURA 5	Procedimento de cultura de macrófagos no fluxo laminar (A) e Cultura de macrófagos em placas (B)	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Análise centesimal de ácidos graxos na composição das dietas	29
TABELA 2	Efeito da desnutrição e da dieta hiperlipídica sobre o ganho de peso médio	38
TABELA 3	Efeito da desnutrição e da dieta hiperlipídica sobre peso corporal e de órgãos	38
TABELA 4	Efeito da desnutrição e da dieta hiperlipídica sobre o hemograma	39
TABELA 5	Efeito da desnutrição e da dieta hiperlipídica sobre a função dos macrófagos alveolares	40

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Evolução ponderal durante o período da lactação	36
GRÁFICO 2	Evolução ponderal após o desmame	37
GRÁFICO 3	Índice de aderência de macrófagos alveolares	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
C	Dieta Controle
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CT	Colesterol total
D	Desnutrido
DC	Desnutrido Controle
DH	Desnutrido Hiperlipídico
DHGNA	Doença hepática gordurosa não-alcoólica
H	Dieta hiperlipídica
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HDL	Lipoproteína de alta densidade
Hm	Hemácias
Ht	Hematócrito
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
N	Nutrido
NC	Nutrido Controle
NH	Nutrido hiperlipídico
PR	Peso relativo
SI	Sistema Imune
TG	Triglicérides
VCM	Volume corpuscular médio
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

No presente trabalho, foram investigados os efeitos da dieta hiperlipídica sobre parâmetros imunológicos e hepáticos em ratos adultos, programados pela desnutrição proteica no período de lactação. Ratos machos Wistar foram divididos em grupos, segundo a dieta empregada: Desnutrido (D), submetido no aleitamento, período crítico do desenvolvimento, à dieta contendo 8% de proteínas e Nutrido (N), submetido à dieta contendo 23% de proteínas. Após o desmame, os grupos foram alimentados com dieta padrão (C) ou dieta hiperlipídica (H). Constituindo-se os grupos: NC, NH, DC e DH. Foram realizados os seguintes estudos no animal adulto: evolução ponderal e pesos do baço, fígado e timo, parâmetros hematológicos, transaminases e perfil lipídico e o lavado broncoalveolar para avaliação do índice de aderência de macrófagos. Os dados foram avaliados utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações Holm-Sidak e do teste t de Student, considerando-se significativo $p < 0,05$. O consumo de dieta hiperlipídica por animais programados pela desnutrição provocou redução no ganho ponderal e no peso do fígado; causou aumento do VCM e do HCM e redução do VHCM; aumento dos linfócitos e redução dos neutrófilos, redução do ALT e aumento da razão AST:ALT; aumento do colesterol total, o LDL e o HDL; ainda, causou redução na função de aderência dos macrófagos alveolares. Esses resultados demonstram que a dieta excessiva em lipídios em ratos programados pela desnutrição não promove recuperação total do déficit ponderal gerado no período de lactação, e produz modificações em parâmetros imunológicos, hepáticos e lipídicos, com possível indicação de lesão hepática e sequelas na função de aderência dos macrófagos alveolares.

ABSTRACT

In the present study , we investigated the effects of high fat diet on hepatic and immunological parameters in adult rats programmed by protein malnutrition during lactation. Male Wistar rats were divided into groups according to the diet employed : Malnourished (D) , submitted to breastfeeding , critical period of development , the diet containing 8 % protein and Nourished (N) , subjected to the diet containing 23 % protein . After weaning , the groups were fed a control (C) or high-fat diet (H) . Constituting groups : CN , NH DC and HD. The following studies were conducted in the adult animal : weight gain and weights of spleen, liver and thymus , hematological parameters , transaminases and lipid profile and bronchoalveolar lavage for evaluation index of adhesion of macrophages . Data were evaluated used the ANOVA test followed by the Holm - Sidak multiple comparisons test and Student's t test , considering significant $p < 0.05$. The consumption of high-fat diet in an organism programmed by malnutrition reduced weight gain and liver weight ; increased MCV and MCH and reduced VHCM ; increased lymphocytes and decreased neutrophils , reduced ALT and increased AST reason: ALT ; increased the total cholesterol, LDL and HDL ; function and reduced the adhesion of alveolar macrophages . These results demonstrate that excess lipid in rats programmed by malnutrition not fully recover weight deficits generated during lactation , produces changes in immunological , hepatic and lipid parameters , indicating possible liver injury sequelae and the role of adherence of alveolar macrophages.

1. INTRODUÇÃO

Transição nutricional: desnutrição e obesidade

A desnutrição é uma condição patológica, provocada por insuficiência de um ou mais dos nutrientes essenciais para a sobrevivência, crescimento, reprodução e capacidade de aprender e de se relacionar em sociedade (Latham, 1997), podendo ainda, indicar uma deficiência global de nutrientes, ou seja, todos os nutrientes podem estar presentes na dieta, porém suas quantidades são insuficientes (Morgane et al, 2002).

A desnutrição e a fome ainda estão entre as principais consequências da pobreza mundial. Um terço das mortes entre crianças menores de cinco anos de idade nos países em desenvolvimento estão ligadas à desnutrição (UNICEF, 2006).

Aproximadamente 925 milhões de pessoas no mundo não consomem quantidades suficientes de alimentos para serem consideradas saudáveis (FAO, 2011). No entanto, as tendências para a desnutrição mostram um decaimento ao longo dos anos, tendo sido representada por 37% da população mundial em 1969 e em 2010, pouco mais de 16% (FAO, 2010). Embora o estado nutricional esteja melhorando para muitas pessoas em todo o mundo, para alguns a taxa não é rápido o suficiente (FAO, 2010).

Mães desnutridas muitas vezes dão à luz crianças com baixo peso ao nascer, definido pela OMS (1977) como o peso de nascimento abaixo de 2.500g. Cerca de 17 milhões de crianças nascem com baixo peso a cada ano (UNICEF, 2007). Essas crianças tem 20% mais probabilidade de morrer antes dos cinco anos de idade (UNICEF, 2007).

Entre 1989 e 2006, o Brasil alcançou as metas relativas à redução da desnutrição infantil estabelecidas pela ONU, com queda maior que quatro vezes na prevalência de crianças com menos de cinco anos abaixo do peso (de 7,1% para 1,7%) (ONU, 2009). No entanto, ainda apresenta 16 milhões de habitantes vivendo abaixo da linha de pobreza (BRASIL, 2012), o que representa um desafio. Dados do Censo Demográfico de 2010 (BRASIL, 2010) indicam que no município de Salvador, 5,5% da população encontra-se em extrema pobreza.

Com desigualdades regionais expressivas, verificam-se no Brasil divergências na redução da desnutrição a depender da região, estado ou município observado. A maior redução das prevalências de desnutrição infantil se deu na Região Nordeste e nas populações mais pobres do país, sendo os principais fatores responsáveis por esses

avanços: o aumento da escolaridade materna, o aumento da renda familiar, o maior acesso aos serviços da rede de atenção básica de saúde e a expansão do saneamento básico (BRASIL, 2012).

A diminuição da fome e da desnutrição veio acompanhada do aumento vertiginoso da obesidade em todas as camadas da população, apontando para um novo cenário de problemas relacionados à alimentação e nutrição (BRASIL, 2012). A dieta dos brasileiros atualmente é caracterizada por conter alimentos classificados como ultraprocessados, com altos teores de gorduras, sódio e açúcar e com baixo teor de micronutrientes e alto conteúdo calórico, e o consumo desses vem aumentando a cada ano (BRASIL, 2012). Desta forma, muitos dos indivíduos que sofreram desnutrição no passado encontram-se hoje em situação nutricional diferente, compatível com o excesso de nutrientes.

Desnutrição e Período Crítico do Desenvolvimento

Uma dimensão importante da nutrição e da saúde deve ser valorizada, com enfoque na existência de janelas críticas no início do desenvolvimento, tanto pré quanto pós-natal, durante o qual a nutrição pode ter consequências para o desenvolvimento da vida e das principais doenças na vida adulta (Lucas, 1998).

Durante o crescimento e desenvolvimento fetal, os vários tecidos do corpo crescem nos diferentes períodos de rápida divisão celular, denominados períodos críticos. As mudanças nutricionais e hormonais da gestante nestes momentos podem atuar através dos processos de plasticidade e modificar a epigenética, levando a efeitos permanentes sobre uma série de processos fisiológicos que alteram as estruturas e funções de sistemas orgânicos com repercussão na vida adulta (Godfrey, 1998; Pereira, 2009; Gluckman, 2005).

O Comitê Permanente da ONU (2009) declarou que os primeiros 1.000 dias da vida de uma criança, desde a gravidez até os dois anos de idade, são a janela crítica para combater a desnutrição. Isto porque é nesta fase que todos os sistemas orgânicos são formados.

Sistema Imunológico: considerações gerais

O sistema imunológico é constituído por uma complexa rede de células e moléculas dispersas por todo o organismo e se caracteriza biologicamente pela capacidade de reconhecer especificamente determinadas estruturas moleculares ou antígenos e desenvolver uma resposta efetora diante destes estímulos, provocando a sua destruição ou inativação (Martinez e Alvarez-Mon, 1999).

A defesa imunológica é representada pela imunidade inata, responsável pela proteção inicial contra as infecções, e pela imunidade adquirida, que é mais tardia, porém altamente específica e de longa duração, com capacidade de gerar memória imunológica (Schulenburg et al, 2004).

A imunidade inata é constituída por células fagocíticas (neutrófilos, monócitos e macrófagos), células que liberam mediadores inflamatórios (basófilos, mastócitos e eosinófilos) e células natural killer (Delves e Roitt, 2000). Os macrófagos são células extremamente dinâmicas envolvidos na atividade de neutralização, internalização e destruição de partículas, bem como na remoção de restos celulares, que são gerados durante a remodelação de tecidos, e de forma rápida e eficiente as que tenham sido submetidos a apoptose (Mosser e Edwards, 2008). São também essenciais na apresentação dos antígenos aos linfócitos T (Roitt, 2003).

Os mecanismos da imunidade inata, no homem, surgem no início da gestação, e estão completamente maturados na 28ª semana. Apesar disto, apenas são ativadas algumas semanas após o nascimento, visando fornecer proteção adequada ao organismo (Gleeson e Cripps, 2004). Entretanto, os níveis de monócitos e macrófagos tornam-se semelhantes aos encontrados no indivíduo adulto apenas por volta dos 3 anos de idade (Palmer, 2011).

Durante os períodos de desenvolvimento e ao longo da vida adulta, os macrófagos residentes são distribuídos pelos tecidos, e identifica-se extensa heterogeneidade a depender do microambiente e do órgão em que residem (Gordon, 2007; Woods, 2006). Durante uma resposta inflamatória os macrófagos teciduais residentes são ativados ou são recrutados por quimiocinas, capacitando-os a iniciar alterações inflamatórias e vasculares agudas através da sua estreita associação com a microcirculação (Gordon, 2007).

A resposta imunológica adquirida tem como células responsáveis os linfócitos, que se desenvolvem principalmente nos órgãos linfoides primários, sendo as células T amadurecidas no timo e as células B, no fígado fetal e na medula óssea (Roitt et al, 2003). Dentre os órgãos imunes secundários, o baço é notadamente importante por sua densa população de linfócitos T e B presentes na polpa branca, desempenhando um papel essencial no desenvolvimento da resposta imune. O baço é formado ainda pela polpa vermelha, carregados de macrófagos que desempenham um papel na depuração de bactérias e células sanguíneas mortas da corrente sanguínea (Cesta, 2006).

Os linfócitos são células que possuem receptores específicos para antígenos (Abbas e Lichtman, 2009), e que ao reconhecê-los, reage por meio da expansão clonal das células específicas do antígeno visando construir uma linha de defesa (Goronzy e Weyand, 2009). A imunidade adaptativa humoral é mediada por imunoglobulinas (Ig), proteínas produzidas pelos linfócitos B que reconhecem os antígenos extracelulares, e a imunidade adaptativa celular é mediada pelos linfócitos T (Goronzy e Weyand, 2009) que atuam como moduladores da resposta imunológica, ativam linfócitos B, suprimem a produção de imunoglobulinas pelos linfócitos B, interagem com os macrófagos e as células dendríticas durante a resposta imunológica e lisam células infectadas, células neoplásicas ou microorganismos (Peakman e Vergani, 1999).

No período neonatal humano, a resposta humoral é considerada imatura, iniciando sua maturação com aproximadamente 15 semanas de gestação, com aumento crescente apenas a partir da 32ª semana (Palmer, 2011). No entanto, durante a gestação, esta defesa obtém auxílio dos anticorpos maternos, com início da transferência ocasionada em torno da 9ª semana gestacional, e aumento na 26ª semana (Palmer, 2011).

Sistema imunológico e nutrição

O sistema imunitário funciona de forma precária quando em condições adversas, em particular na presença de desnutrição (Moore, 1998; Savino e Dardenne, 2010). Segundo Palmer (2011), os insultos nutricionais durante o período crítico do desenvolvimento podem programar a estrutura e/ou função das populações de células distintas, sistemas de órgãos, ou vias homeostáticas, alterando permanentemente as

populações de células específicas e/ou organogênese, bem como as células da defesa imunitária.

As conseqüências da privação nutricional durante a gestação podem persistir por muitos anos, podendo comprometer a função imunológica de forma permanente (Hughes, 1998). Para Silva (2010) a desnutrição no período crítico de maturação gestacional, neonatal ou durante o desmame pode prejudicar o desenvolvimento adequado da resposta imune. A coorte prospectiva desenvolvida por Ngom et al (2004) observou que a maioria das mortes de indivíduos adultos nascidos na época de fome foram decorrentes de doenças infecciosas, levando-os à hipótese de que eventos no início da vida estão correlacionados com a programação permanente da imunidade no adulto.

A desnutrição proteica tem sido relacionada aos déficits de ganho ponderal e de estatura, com implicações gerais sobre o desenvolvimento de órgãos e sistemas em humanos e em ratos (Pereira, 2009). Segundo Cunningham-Rundles e colaboradores (2005) a subnutrição no período crítico pode comprometer o sistema imunológico, com sequelas na capacidade de defesa do indivíduo adulto. Melo e colaboradores (2008) descrevem que durante o período crítico de desenvolvimento dos sistemas orgânicos, a deficiência proteica é capaz de interferir na formação de processos essenciais para a defesa do hospedeiro e alterar a resposta imune específica e inespecífica do organismo frente a agentes infecciosos.

A desnutrição e as alterações na estrutura e função do baço relacionam-se com alterações nas células sanguíneas (de Paulo et al, 2010). Os tecidos hematopoiéticos apresentam uma alta taxa de renovação celular e alta demanda por nutrientes, justificando a intensa necessidade de proteína, especialmente para a eritropoiese (Borelli et al, 2007). A hematopoiese ocorre em ondas distintas, uma durante o desenvolvimento fetal e outra no adulto, e cada geração de populações distintas de células pode coexistir por um período de tempo (Mold, 2010), gerando ao organismo a possibilidade de recuperação.

Dentre as alterações observadas no sistema imune estão a atrofia do timo (Savino, 2002) e do baço (Ortiz, 2009), com dano a sua função (Cunningham-Rundles et al, 2005), a diminuição da resposta dos linfócitos T de memória (Savino, 2002) e a programação da função de macrófagos (Ferreira-e-Silva et al, 2009). Em estudo com

animais, a contagem de linfócitos circulantes está reduzida e há um aumento da proporção de neutrófilos (Langley-Evans, 1997).

Em contrapartida, dietas ricas em lipídeo induzem intensa resposta inflamatória, com aumento dos níveis basais de rolamento, adesão e imigração de leucócitos (Stokes et al, 2002; Stokes et al, 2003; Stokes e Granger, 2005). São estimulados os linfócitos T, macrófagos e as citocinas, interleucina 12 (IL-12) (Stokes et al, 2003), interleucina 6 (IL-6) (Stokes e Granger, 2005) e fator de necrose tumoral (TNF) (Stokes et al, 2002).

Os macrófagos têm plasticidade notável que lhes permite responder de forma eficiente aos sinais ambientais e alterar seu fenótipo (Mosser e Edwards, 2008). Em ratos magros, os macrófagos presentes no tecido adiposo produzem pouca ou nenhuma citocina pró-inflamatória (Lumeng, 2007). No entanto, a resposta imunológica torna-se notadamente pronunciada quando associada à exposição aguda a dieta rica em lipídeo (Ji, 2012). Estudo experimental realizado por Enos e colaboradores (2013) ofertando uma dieta contendo 40% das calorias provenientes das gorduras levou ao aumento da inflamação e da infiltração de macrófagos no tecido adiposo de ratos.

Desta forma, pergunta-se de que forma a resposta imunológica do indivíduo programado pela desnutrição e que, por consequência apresenta alterações no sistema imunológico, responde aos efeitos estimuladores gerados pela dieta hiperlipídica.

A relação do desenvolvimento imunológico com os insultos nutricionais no período crítico do desenvolvimento ainda requer estudos, em especial se considerado, ao invés dos sistemas globais, os aspectos individuais afetados nesse momento da vida. Como no Brasil muitos indivíduos que sofreram desnutrição perinatal estão sendo expostos a dietas excessivas em lipídeos; é de relevância estudar o efeito da dieta hiperlipídica sobre o sistema imunológico, associado a uma condição de deficiência proteica materna durante a lactação.

2. JUSTIFICATIVA

Diversos estudos mostram que a desnutrição, em mamíferos, imposta logo após o nascimento (período crítico do desenvolvimento) trazem alterações no crescimento, desenvolvimento e funcionamento do sistema imunológico, gerando efeitos negativos que podem ser permanentes. Entretanto, ainda são escassos estudos que avaliem esses organismos já submetidos à desnutrição proteica e que foram expostos à dietas com excesso de nutrientes. Assim, estudos experimentais em ratos utilizando-se modelos de desnutrição no período da lactação seguido de dieta hiperlipídica pós desmame até a vida adulta, pode elucidar questões ainda não respondidas.

Ainda são pouco conhecidos mecanismos de como indivíduos programados pela desnutrição precoce reagem à oferta de uma alimentação com alto teor lipídico e suas implicações sobre a evolução ponderal e parâmetros bioquímicos e imunológicos. Uma pergunta seria se a desnutrição pregressa pode ser superada pela oferta posterior de uma dieta com preponderância de lipídios na sua composição e ainda outra, se indivíduos programados pela desnutrição, apresentariam alterações fisiológicas e celulares em órgãos e no sistema imune após submissão à dieta hiperlipídica. Não menos importante é que pesquisas com agressões nutricionais ajudarão profissionais da área de saúde e afins a melhor entender aspectos da programação metabólica e do surgimento de doenças relacionados à alimentação no início da vida, comprometendo a saúde desses indivíduos quando adultos.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito do consumo habitual da dieta hiperlipídica pós-desmame sobre parâmetros imunológicos e hepáticos em ratos adultos, submetidos à desnutrição proteica no período de lactação.

Objetivos Específicos

Em ratos submetidos à desnutrição proteica no período de lactação e consumo da dieta hiperlipídica do pós-desmame ao fim da vida, avaliar:

- Ganho de peso;
- Peso de órgãos linfoides (timo e baço) e do fígado;
- Parâmetros hematológicos, perfil lipídico e transaminases;
- Aderência de macrófagos alveolares.

4. HIPÓTESES

Consumo de dieta hiperlipídica pós-desmame por ratos desnutridos no período de lactação causa prejuízo as funções hepáticas e imunológicas

5. METODOLOGIA

5.1. Animais e Grupos experimentais

Foram utilizados 51 ratos, albinos, machos da linhagem Wistar, oriundos do Laboratório de Nutrição Experimental da Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Os ratos permaneceram no laboratório sob condições controladas de temperatura e ciclos de claro/escuro de 12h. Foram utilizados filhotes gerados a partir de oito fêmeas primíparas.

Os filhotes foram manipulados um dia após o nascimento, chamado P1, em que foi realizada a separação por sexo observando-se a distância anogenital, sendo a ninhada ajustada a oito filhotes, preferencialmente machos, pesando entre 6 a 7g.

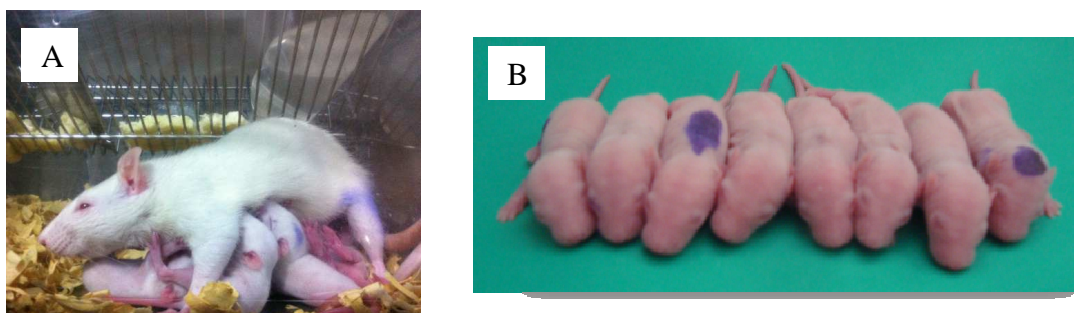


Figura 1. Filhotes amamentando (A) e ajuste das ninhadas a 8 filhotes (B)

Durante a gestação, as fêmeas foram alocadas em caixas individuais e receberam dieta padrão para ratos (Nuvilab® CR1) até o nascimento dos animais. Do início da lactação até o desmame (21^o dia), as progenitoras foram divididas em dois grupos segundo a manipulação nutricional, grupo nutrido (N) que recebeu dieta padrão e o grupo desnutrido (D) que recebeu dieta hipoproteica. Após o término da lactação, os conceptos machos foram divididos em dois grupos, um com dieta padrão (C) e outro com dieta hiperlipídica (H) até os 140-160 dias de vida, formando os grupos finais nutrido controle (NC, n=13), nutrido hiperlipídico (NH, n=12), desnutrido controle (DC, n=13) e desnutrido hiperlipídico (DH, n=13).

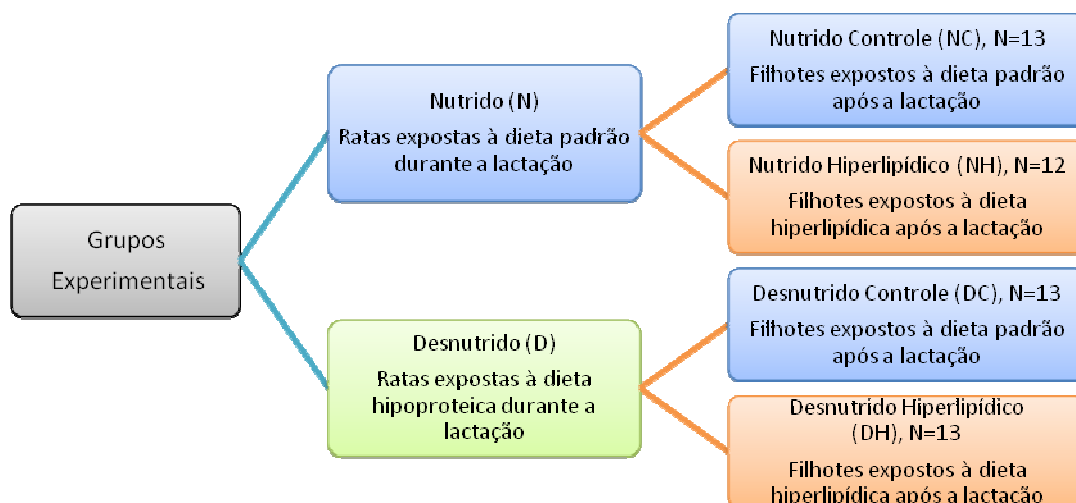


Figura 2. Organograma dos grupos experimentais

5.2. Composição das dietas

A dieta padrão (Nuvilab® CR1, Brasil) é composta de milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, pré mix vitamínico mineral e aminoácidos, contendo por 100g: 22% de proteína, 57% de carboidrato, 4% de lipídeos, 5% de celulose, 5% de vitaminas e minerais. A dieta hipoproteica (Carvalho-Santos, 2010) contém em 100g: 8% de proteína, 75% de carboidrato, 7% de lipídeo, 5% de celulose, 5% de vitaminas e minerais. As misturas de sais e vitaminas foram formuladas de acordo com as recomendações do American Institute of Nutrition Rodents Diets, AIN-93, para as fases de crescimento, gravidez e lactação de roedores, nas mesmas quantidades da dieta padrão.

A dieta hiperlipídica (Oliveira, 2011) constitui-se por uma mistura de alimentos hipercalóricos contendo ração comercial (Nuvilab ®), amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito do tipo maisena na proporção de 3:2:2:1. Estes ingredientes foram moídos, misturados e oferecidos na forma de *pelet*, contendo por 100g: 17% de proteína, 46% de carboidrato e 23% de lipídeos, 4,0% de celulose, 5,0% de vitaminas e minerais. A composição de ácidos graxos da dieta controle e da dieta hiperlipídica podem ser observados na tabela 1.

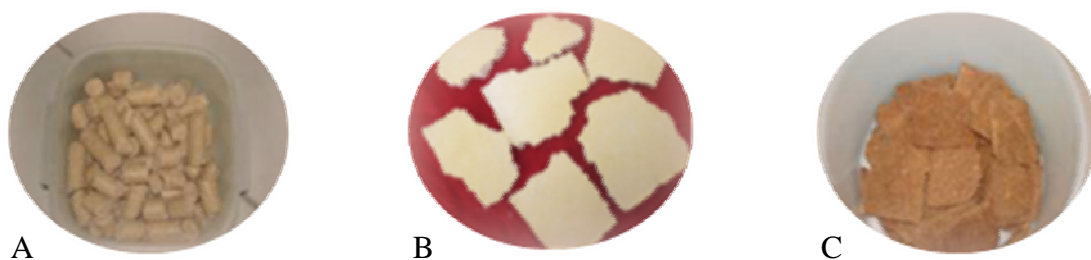


Figura 3. Dieta padrão (A); dieta hipoproteica (B); dieta hiperlipídica (C).

Tabela 1. Análise centesimal de ácidos graxos na composição das dietas

Ingredientes (g/100g)	Dieta controle	Dieta hiperlipídica
Carboidrato	57	46
Proteína	22	17
Lipídio	4	23
Energia (Kcal/g)	3,5	4,5
Ácidos graxos (g/100g do total de ácidos graxos)		
Ômega 9 cis	26,24	34,52
Ômega 9 trans	1,18	0,41
Ômega 6	49,68	21,68
Ômega 3	3,72	0,27
Total de ácidos graxos		
Saturados	19,17	41,71
Monoinsaturados	26,24	35,32
Polinsaturados	53,40	21,95
Trans	1,18	0,41
Ômega 6:ômega 3	13,35	80,30

Adaptado de Oliveira et al, 2011.

5.3. Avaliação corporal

Os animais dos diferentes grupos foram avaliados diariamente, do 1^o ao 21^o dia pós-natal, entre 12:00 e 13:00 horas. O peso corporal foi aferido utilizando-se uma balança eletrônica com capacidade de 4 kg (Marte, modelo S-000 com sensibilidade para 0,01g). Do 22^o ao 140-160^o dia pós-natal, os animais tiveram seu peso corporal avaliado semanalmente, entre 12:00 e 13:00 horas.

Ganho de peso corporal

O ganho de peso corporal (GPC) foi calculado através da seguinte fórmula (Novelli et al, 2007):

$\% \text{ GPC} = (P_x / P_1) * 100$ Onde: % GPC = ganho de peso corporal em percentual

P_x = Peso de cada dia subsequente

P_1 = Peso ao nascer

Taxa de crescimento

Baseado no peso corporal, a taxa de crescimento foi calculada a partir da fórmula (Novelli et al, 2007):

$TC = P_x - P_A$ Onde: TC = Taxa de crescimento (em gramas)

P_x = Peso de cada dia subsequente

P_A = Peso do dia anterior

5.4. Coleta do soro

A coleta do soro foi realizada entre 140 e 160 dias de vida. Os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas e em seguida anestesiados (0,5mL de Xilazina, 2,0mL Ketamina em soro fisiológico, volume final 10mL), sendo aplicados 0,1mL da solução para 10g de peso corporal do animal. O sangue foi coletado por punção cardíaca, sendo colocado 0,5mL em tubo contendo anticoagulante EDTA para análise do hemograma e 2ml deixados em banho-maria a 37°C por 10 minutos, sendo em seguida centrifugado; o soro resultante foi utilizado para a análise do colesterol total e frações (HDL-c, LDL-c e VLDL-c), triglicérides, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). As amostras foram acondicionadas sob refrigeração e encaminhadas ao laboratório para análise no prazo de 24 horas pós coleta. As determinações de colesterol total e frações e triglicérides foram realizados por método colorimétrico enzimático e a AST e ALT por método cinético UV, utilizando-se Kit comercial BioSystem/Spain.

5.5. Retirada dos órgãos

Por meio da laparotomia e toracotomia, os órgãos foram expostos e procedeu-se à retirada do timo, baço e fígado. Os tecidos foram imersos em soro fisiológico para a remoção dos resíduos de sangue e retirado o excesso de líquido posteriormente com papel de filtro para proceder a pesagem. Os órgãos foram separadamente armazenados em solução de formol tamponado a 10%.

O fígado foi localizado e pinçado com pinça cirúrgica e separado com tesoura de ponta fina. Para a retirada do baço, inicialmente localizou-se o órgão na porção esquerda do abdômen, abaixo do estômago, sendo pinçado e separado com tesoura de ponta fina o tecido conectivo que prende o baço ao abdômen (Peres e Curi, 2005). Para a retirada do timo, cortou-se o diafragma e as costelas dos dois lados da caixa torácica e removeu-se o esterno. Identificou-se o timo (branco, bilobado e achatado), localizado ao redor da traqueia e próximo ao coração. O órgão foi pinçado com a ajuda de uma pinça de ponta fina (Peres e Curi, 2005).

5.6. Aderência dos Macrófagos

Obtenção dos macrófagos

Foram utilizados ratos com idade entre 140 e 160 dias, os quais foram distribuídos nos quatro grupos anteriormente descritos.

Os macrófagos foram obtidos por lavado broncoalveolar (De Castro et al, 2000). Com o animal anestesiado seguia-se o procedimento cirúrgico de traqueostomia, colocando-se o animal numa superfície plana em posição dorsal. Para limpeza da área a ser trabalhada, era utilizado álcool a 70%. Após a limpeza, cortava-se a pele na porção média do pescoço do animal abrindo-se a camada de músculos e afastando-as até obter acesso à traquéia. Com uma pequena pinça isolava-se e prendia-se a traquéia onde era feito um pequeno corte entre dois anéis da traquéia na parte superior. Após a abertura do orifício era inserida na traquéia uma cânula de plástico acoplada a uma seringa contendo 2 a 3ml de soro fisiológico à temperatura ambiente. Posteriormente fazia-se a introdução do líquido com movimentos de entrada e saída por 3 a 5 vezes. O material recolhido era colocado em tubo de 30ml.

O procedimento de coleta do material era realizado até que se completasse cerca de 25ml de lavado broncoalveolar, por rato. O material recolhido ficava armazenado em

recipiente estéril e em banho de gelo, protegido da luz até que se iniciasse a próxima etapa.

Todo o procedimento com os macrófagos era realizado em fluxo laminar objetivando não contaminar as culturas de células.



Figura 4. Procedimento para coleta do lavado broncoalveolar.

O lavado broncoalveolar recolhido era centrifugado a 1500 rpm durante 15 minutos. Após essa etapa o precipitado correspondente às células era ressuspenso em meio RPMI 1640 e antibióticos (penicilina 100U/ml e estreptomicina 100 μ g/ml) e, em seguida, contadas.

A contagem era feita na Câmara de Neubauer colocando-se a suspensão de células e o corante azul tripan a 0.05% em uma diluição de 1:10. O azul tripan é um corante vital que tem a propriedade de corar as células mortas, excluindo-as das células vivas. Esse corante é, portanto, utilizado para avaliar a viabilidade e fazer ao mesmo tempo a contagem das células.

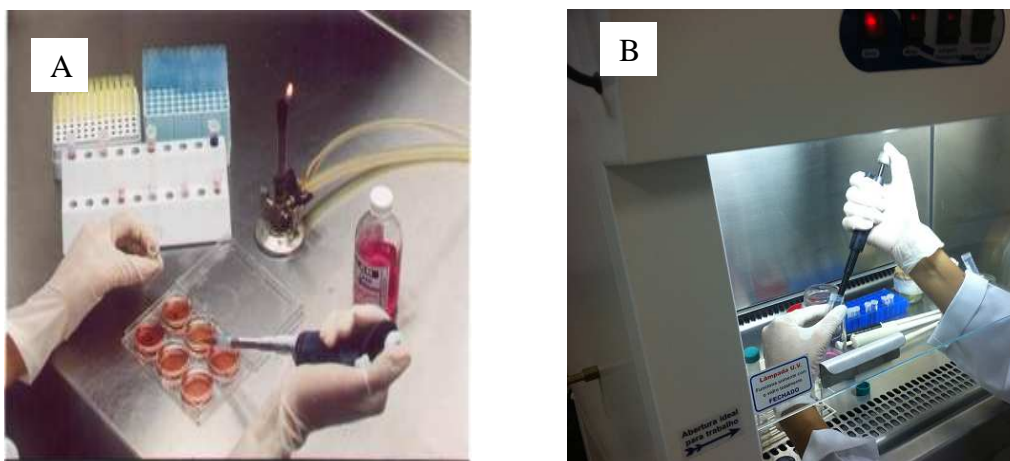


Figura 5. Procedimento de cultura de macrófagos no fluxo laminar (A) e Cultura de macrófagos em placas (B).

Avaliação do índice de aderência dos macrófagos

Para determinar o índice de aderência de macrófagos foi utilizada a técnica descrita por Segura et al (1997). Os macrófagos eram colocados em placas de cultura tipo Falcon, com 6 poços de 35 milímetros de diâmetro cada, onde eram dispensados 1ml da suspensão de células em uma proporção de 10^6 células/ml de meio de cultura RPMI 1640 em cada poço e levados à incubadora com 5% de CO_2 e a $37^\circ C$ por 1 hora.

Decorrido esse período, o sobrenadante era homogeneizado e uma alíquota de $10\mu l$ era adicionada a $90\mu l$ de azul tripan (diluição de 1:10). Assim, a contagem de células era realizada em câmara de Neubauer e o cálculo para o índice de aderência era feito segundo fórmula abaixo:

$$IA = 100 - \frac{\text{células não aderidas/ml}}{\text{n}^\circ \text{ inicial de células/ml}} \times 100$$

5.7. Análise estatística

Todos os dados foram colocados em planilha do Programa Excel, já desenvolvida de forma a fornecer os valores relativos, e outros valores específicos e necessários à interpretação dos resultados e, em seguida submetidos à análise estatística.

Foi utilizado o programa estatístico SigmaStat (Systat Software, Port Richmond, CA, USA) versão 3.5, 2005. Os dados foram expressos por média e desvio padrão após

atestada normalidade. Para comparação entre os grupos, os dados que foram avaliados uma única vez, utilizou-se o teste ANOVA OneWay seguido do teste de múltiplas comparações Holm-Sidak e para os dados de acompanhamento, o teste t de Student ou o teste ANOVA TwoWay para medidas repetidas, seguido do teste de múltiplas comparações Holm-Sidak. Em todos os casos será usado $p < 0,05$ como critério de significância.

5.8. Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, número 01.13. Todas as atividades foram realizadas de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA) e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care Use of Laboratory Animal.

6. RESULTADOS

O peso corporal do grupo D comparado ao grupo N (Gráfico 1) apresentou-se menor ($p < 0,05$) a partir do 5º dia de vida perdurando até o final do período de lactação (21º dia), sendo o ganho de peso de 41,29g (689,47%) e de 21,65g (420,45%) para N e D, respectivamente.

Evolução do peso de ratos submetidos ou não à desnutrição durante o período da lactação

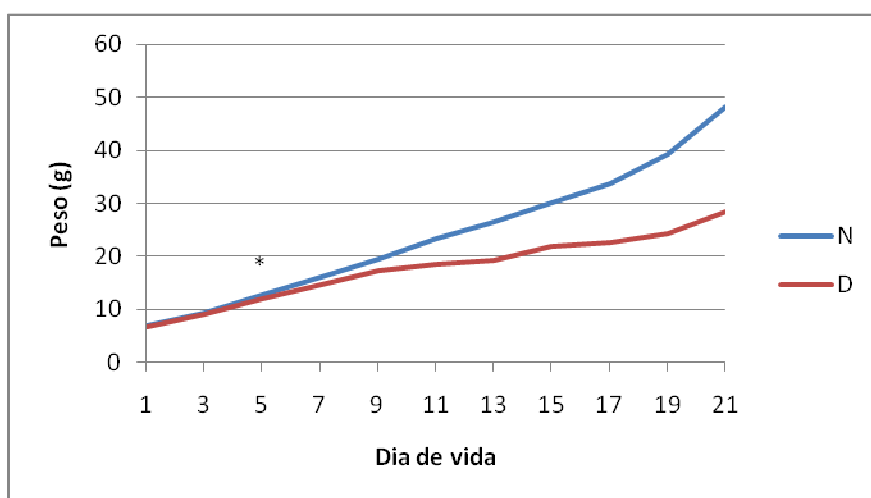


GRÁFICO 1. Evolução ponderal durante o período de lactação entre os grupos nutridos (N) e desnutridos (D). * do 5º ao 21º dia de vida o peso do grupo N foi maior que o grupo D. Teste t de Student, $p < 0,05$.

A média dos pesos corporais do grupo DH foi menor ($p<0,05$) do que dos demais grupos a partir do 35º dia de vida até 119º, inversamente ao grupo NC ($p<0,05$) que apresentou médias de peso maiores que os demais grupos. E no intervalo do 35º ao 119º, o peso do grupo DH apresentou-se menor do que os demais grupos e DC foi menor do que NC (Gráfico 2).

Evolução do peso de ratos nutridos e desnutridos, submetidos ou não ao consumo de dieta hiperlipídica pós-desmame

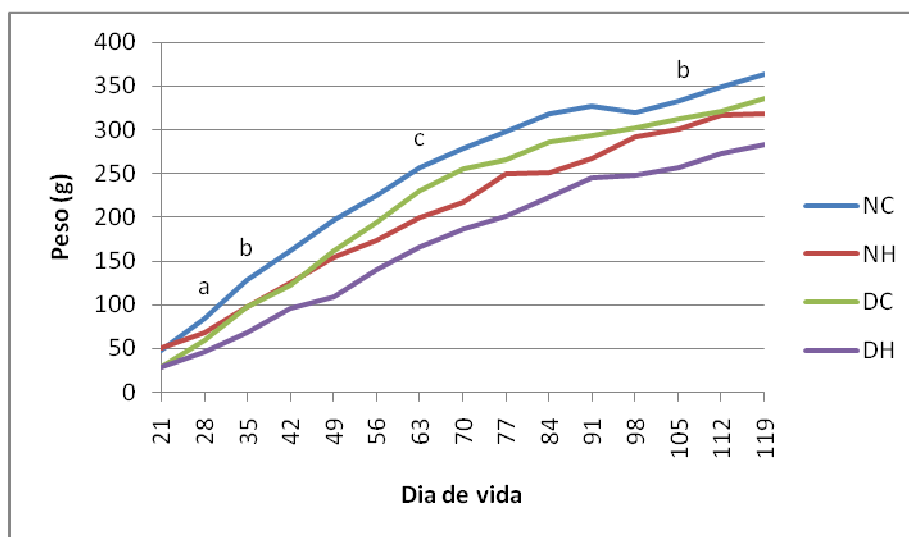


GRÁFICO 2. Ratos nutridos e desnutridos no período de lactação e que receberam ou não dieta hiperlipídica pós desmame (22-119 dias). Grupos NC (n=13), NH (n=12), DC (n=13), DH (n=13). **a.** 28º dia, o peso de DH e DC se apresentam menores do que NC, e NH maior do que DH; **b.** do 35º ao 119º o peso de DH apresentou-se menor do que NH, DC e NC. DC foi menor do que NC; **c.** do 63º a 98º, o peso de NH foi menor do que DC. TwoWay ANOVA medidas repetidas, $p<0,05$.

Ao longo do período de acompanhamento pós-desmame, a TC no grupo DH foi menor do que NC e DC aos 56, 91 e 119 dias de vida. O %GPC no grupo DH foi maior que o grupo NH e menor que DC aos 56 dias de vida e maior que NC e NH e menor do que DC aos 91 e 119 dias de vida. (Tabela 2).

Tabela 2. Ganho de peso corporal e taxa de crescimento após o término da lactação em ratos nutridos e desnutridos, submetidos ou não ao consumo de dieta hiperlipídica.

TC/%GPC	NC		NH		DC		DH	
	g	%	g	%	G	%	g	%
56 dias	178,04	482,32	123,58 ^a	353,88 ^a	156,19 ^b	693,94 ^{a,b}	110,98 ^{a,c}	488,70 ^{b,c}
91 dias	280,47	701,07	217,54 ^a	546,83 ^a	264,93 ^b	1052,01 ^{a,b}	216,23 ^{a,c}	866,67 ^{a,b,c}
119 dias	316,72	778,68	268,36 ^a	651,48	307,08 ^b	1203,45 ^{a,b}	254,68 ^{a,c}	1003,41 ^{a,b,c}

GPC = Ganho de peso corporal (usando como referência o dia 21). TC = taxa de crescimento. ^a p<0,05 vs NC, ^b p<0,05 vs NH, ^c p<0,05 vs DC. One way ANOVA, post hoc Holm-Sidak.

A tabela 3 apresenta os valores de peso corporal e os pesos relativos dos órgãos avaliados. O peso corporal no dia do sacrifício foi menor para o grupo DH comparado ao NC (p<0,001) e NH (p<0,001). O peso relativo do fígado foi menor no grupo DH comparado ao NC (p<0,001) e DC (p=0,007). Os pesos do timo e do baço não apresentaram diferenças entre os grupos.

TABELA 3. Peso corporal e pesos relativos do timo, do baço e do fígado em ratos nutridos e desnutridos, submetidos ou não ao consumo de dieta hiperlipídica, com 140-160 dias de vida.

	Grupos							
	NC (N=13)		NH (N=12)		DC (N=13)		DH (N=13)	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
Peso corporal	403,34	34,85	383,59	44,47	362,91 ^a	30,68	332,55 ^{a,b}	24,04
PR Timo	0,31	0,09	0,38	0,16	0,36	0,07	0,35	0,08
PR Baço	0,96	0,21	0,93	0,21	0,89	0,08	0,82	0,21
PR Fígado	13,86	1,85	11,88 ^a	2,11	12,32	2,05	10,27 ^{a,c}	1,27

PR= Peso relativo. ^a p<0,05 vs NC, ^b p<0,05 vs NH, ^c p<0,05 vs DC. One way ANOVA, post hoc Holm-Sidak.

Os valores do hemograma estão apresentados na tabela 4. No eritrograma o valor de VCM foi maior no grupo DH em comparação aos grupos NC ($p<0,001$) e NH ($p=0,003$). O HCM foi maior no grupo DH em relação aos grupos NC ($p=0,02$) e NH ($p<0,001$). O CHCM foi maior no grupo DH em relação ao NH ($p=0,008$). O grupo NC não apresentou diferença para DH. O valor de leucócitos foi menor no grupo DC quando comparado com NH ($p=0,009$) e o valor de linfócitos foi maior em DH comparado à NH ($p=0,003$). Para os demais parâmetros, não foram encontradas diferenças nas médias entre os grupos.

TABELA 4. Hemograma de ratos nutridos e desnutridos, submetidos ou não ao consumo de dieta hiperlipídica, com 140-160 dias de vida.

Hemograma	Grupos							
	NC (N=13)		NH (N=12)		DC (N=13)		DH (N=13)	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
Eritrograma								
Hemácias	7,29	0,27	7,64	0,45	7,19	0,43	7,29	0,31
Hemoglobina	12,59	0,64	12,71	0,70	13,15	0,43	13,24	0,73
Hematócrito	36,89	2,00	38,75	2,21	36,99	1,98	38,58	1,79
VCM	50,61	2,07	50,78	1,61	51,50	1,31	52,96 ^{a,b}	1,17
HCM	17,29	0,96	16,69	1,12	18,33 ^{a,b}	0,77	18,19 ^{a,b}	0,61
CHCM	34,15	1,30	32,86 ^a	1,15	35,60 ^{a,b}	1,16	34,32 ^{b,c}	0,86
Leucograma								
Leucócitos totais	7892,31	1847,28	8709,09	2455,79	6553,85 ^b	1156,59	8107,69	1695,81
Monócitos	1,46	0,66	1,64	1,03	1,39	0,77	1,39	1,81
Linfócitos	48,08	10,39	44,82	11,03	55,08	14,30	58,70 ^b	5,33
Eosinófilos	2,31	4,01	2,82	3,28	1,39	1,45	1,39	1,94
Neutrófilos	48,08	2,72	50,73	3,12	42,15	3,90	38,54 ^b	1,57

VCM (Volume corpuscular médio), HCM (Hemoglobina corpuscular média), CHCM (Concentração de hemoglobina corpuscular média). ^a $p<0,05$ vs NC, ^b $p<0,05$ vs NH, ^c $p<0,05$ vs DC. One way ANOVA, post hoc Holm-Sidak.

Os valores bioquímicos de enzimas hepáticas e perfil lipídico estão dispostos na tabela 5. Dentre as enzimas, a ALT apresentou-se menor no grupo DH quando comparado ao DC (p=0,005), a AST não diferiu entre os grupos, assim como a razão AST:ALT, porém este último apresentou valores maiores do que 1 em todos os grupos. Quanto ao perfil lipídico, pode-se destacar para no grupo DH o aumento do colesterol total comparado a NC (p=0,001) e DC (p=0,004), aumento do LDL comparado a NC (p=0,004) e DC (p=0,007) e aumento do HDL comparado ao NC (p<0,001).

TABELA 5. Enzimas hepáticas e perfil lipídico de ratos nutridos e desnutridos, submetidos ou não ao consumo de dieta hiperlipídica, com 140-160 dias de vida.

	Grupos							
	NC (N=13)		NH (N=12)		DC (N=13)		DH (N=13)	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
Enzimas								
ALT	75,75	3,16	78,81	4,66	91,63	8,25	67,9 ^c	5,33
AST	210,03	15,88	255,60	24,06	235,18	14,66	222,17	16,72
R AST:AST	2,80	0,20	3,23	0,21	2,72	0,20	3,44	0,30
Perfil Lipídico								
TG	109,72	11,84	148,85	30,56	96,12	12,59	137,82	22,34
CT	57,36	1,81	70,75	2,91	59,47	2,84	77,53 ^{a,c}	7,08
LDL	22,49	2,16	29,56	4,01	30,80	2,96	38,53 ^{a,c}	3,29
HDL	9,66	1,66	15,19	2,29	10,49	1,66	23,29 ^a	5,53
VLDL	19,31	1,78	21,53	3,51	17,63	2,82	14,95	1,94

^a p<0,05 vs NC, ^b p<0,05 vs NH, ^c p<0,05 vs DC. One way ANOVA, post hoc Holm-Sidak.

O índice de aderência calculado (Gráfico 3) foi menor no grupo DH comparado aos grupos NC ($p=0,01$) e NH ($p=0,02$).

Índice de aderência de macrófagos em ratos nutridos e desnutridos, submetidos ao consumo de dieta hiperlipídica pós-desmame

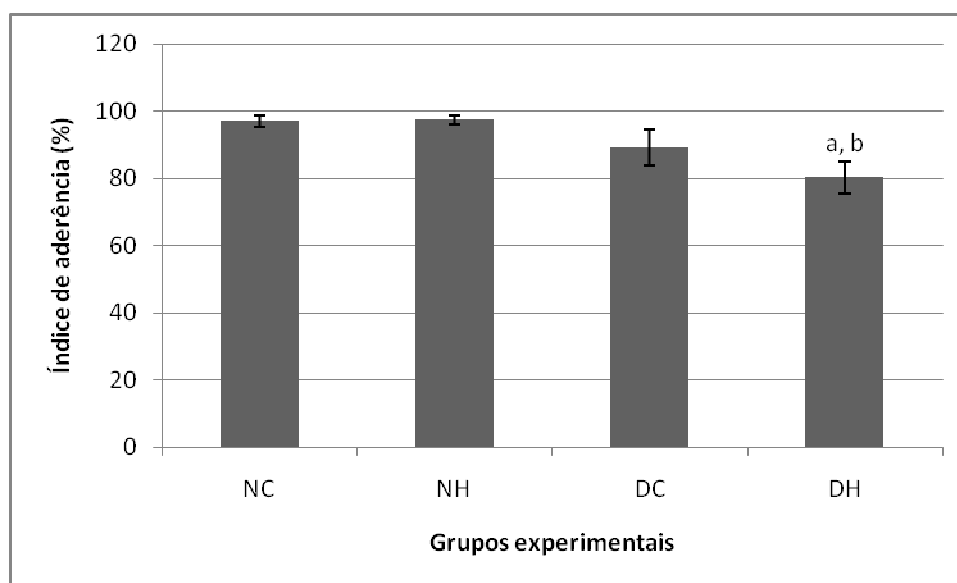


GRÁFICO 3. Função de macrófagos no lavado broncoalveolar (Índice de aderência) de ratos nutridos e desnutridos, submetidos ao consumo de dieta hiperlipídica, com 140-160 dias de vida. ^a $p<0,05$ vs NC, ^b $p<0,05$ vs NH. One way ANOVA, post hoc Holm-Sidak.

7. DISCUSSÃO

A desnutrição no período crítico do desenvolvimento afeta de forma negativa diversos aspectos do desenvolvimento e do funcionamento dos órgãos e sistemas (Pereira, 2009; Barker, 2007; Morgane et al, 2002, Lucas, 1998; Godfrey, 1998). Contudo, quando esse organismo é submetido ao excesso de nutrientes, a incompatibilidade entre a programação fisiológica e as novas condições nutricionais pode gerar doenças (Ozanne e Hales, 2002). No presente trabalho, foram investigados em ratos os efeitos da desnutrição pregressa e da oferta de dieta hiperlipídica pós-lactação, resultando em alterações na vida adulta, representadas pelo déficit ponderal, alterações bioquímicas, aumento dos linfócitos e redução de neutrófilos no sangue periférico e comprometimento na aderência de macrófagos alveolares.

Neste estudo, logo no início da vida, onde o organismo de mamíferos é mais vulnerável a agressões ambientais (Palmer, 2011; Pereira, 2009; Godfrey, 1998), observou-se que a restrição proteica materna durante a lactação propiciou a geração de uma prole com déficit ponderal ao final de 21 dias de vida. Esse quadro pode ser desencadeado pela desnutrição proteico-calórica, com a ocorrência de redução no volume de leite materno, afetando o desenvolvimento físico da prole (Pessoa et al, 2005; Cambraia et al, 2001). Esses achados corroboram com relatos de outros pesquisadores (Desai et al, 2005; Alippi et al, 2002).

Neste estudo o consumo da dieta hiperlipídica nos grupos submetidos à desnutrição na lactação, após o desmame, apresentou, ganho menor de peso corporal quando comparado ao grupo que recebeu dieta controle. Palou et al (2010) observaram que a prole proveniente de restrição calórica moderada (30%) durante o período de lactação apresentou menor peso corporal na idade adulta, em comparação com os controles, com proeminente diferença, quando esses animais foram expostos à dieta hiperlipídica. Souza-Mello et al (2007) verificaram nos animais desnutridos durante a lactação uma resposta atrasada ao estímulo de ganho de peso com a dieta hiperlipídica. No experimento de Sellayah et al (2014), foram verificados peso corporal maior para os grupos que receberam a dieta hiperlipídica, tanto nutridos quanto desnutridos.

(Lukaszewski et al, 2013) É importante ressaltar que, um conteúdo de 23% de lipídio na dieta, semelhante ao empregado no presente estudo, era considerado

moderadamente aumentado), sendo este um fator que pode ser influenciado no menor ganho de peso entre os hiperlipídicos. Ou ainda que o menor peso corporal possa ser explicado, em parte, pela menor ingestão de alimentos pelos animais desnutridos que receberam dieta hiperlipídica (Palou et al, 2011).

Observa-se no presente estudo, a manutenção das massas relativas do baço e do timo, contrapondo a associação da desnutrição precoce ao déficit em diversos aspectos da imunidade mediada por células, incluindo a atrofia de tecidos linfoides (Ortiz, 2009). Ademais, a desnutrição em períodos críticos da vida pode modificar estruturas de órgãos, alterando a vascularização e inervação, além de mudanças na justaposição, número e tamanho das células (Ortiz, 2009; Savino, 2002; Waterland e Garza, 1999). Os achados da investigação de Desai et al (1996) acerca do crescimento seletivo dos órgãos de filhotes desnutridos durante a lactação, demonstraram um retardo permanente no crescimento dos órgãos, com redução do peso relativo do baço e do fígado porém sem alteração no timo.

Relata-se em ratos desnutridos a atrofia do timo (Savino, 2002) e do baço (Ortiz, 2009), com conseqüente redução das células T e alterações nas células sanguíneas (de Paulo et al, 2010). Ratos com quatro a seis semanas de idade alimentados com dieta hipoproteica no período crítico de desenvolvimento apresentaram um decréscimo no número de células T (Savino, 2002). Ainda que no presente estudo não tenham sido avaliadas as células T, os grupos não apresentaram alterações no peso do timo e do baço. Essas discordâncias do peso dos órgãos podem dever-se às diferenças metodológicas, pois no presente estudo os animais desnutridos passaram a receber uma maior oferta calórica após a lactação.

Importante destaque deve-se dar ao fígado, pois é um dos órgãos mais prejudicados pela programação fetal (Desai et al, 1996). No presente estudo, encontrou-se um menor peso relativo do fígado no grupo que recebeu a dieta hiperlipídica quando comparado aos controles. Erhuma et al (2007) observou que a dieta com elevado teor de gordura havia reduzido o tamanho relativo do fígado em 10-22%. O estudo de Souza-Mello et al (2007) demonstrou uma grande redução do número de hepatócitos em animais desnutridos com 6 meses de idade, e a dieta hiperlipídica maximizou a perda de hepatócitos nos machos.

Importante achado de Souza-Mello et al (2007) foi uma massa maior no fígado nos animais desnutridos hiperlipídicos devido a esteatose mais pronunciada, embora com menor número de hepatócitos. Como o teor de gordura na dieta, independente da ingestão calórica, é um fator crucial no desenvolvimento de esteatose hepática (Meijer et al, 2010), possivelmente no presente estudo, possa ter ocorrido uma redução no número de hepatócitos, embora a dieta hiperlipídica não tenha sido capaz de causar esteatose acentuada a ponto de elevar sua massa. Para melhor esclarecer esses achados, estão em curso análises histológicas e morfométricas do fígado.

A desnutrição afeta a hematopoiese, causando anemia, leucopenia, e uma redução grave no desenvolvimento de órgãos linfóides periféricos (Savino, 2002). No presente trabalho, os grupos desnutridos apresentaram valores superiores de VCM e HCM quando comparados aos animais nutridos, sendo estas alterações em resposta apenas a desnutrição precoce. O grupo DH apresentou CHCM maior comparado ao NH e menor comparado ao DC, sugerindo uma redução desses valores durante a desnutrição, porém com elevação quando associado à dieta hiperlipídica. Estes achados podem ser justificados pela desnutrição protéica precoce, resultando em alterações da eritropoiese (Borelli et al, 2007), que elevam o número de células vermelhas anormais, podendo modificar parâmetros hematológicos (de Paulo et al, 2010). No entanto, não se sabe o mecanismo pelo qual a programação precoce somada ao excesso de lipídio da dieta possa ter interferido nos resultados hematimétricos, pois não foram encontrados relatos na literatura.

A migração de leucócitos é uma condição essencial para o desenvolvimento da resposta imune inata e adaptativa eficiente (Landgraf et al, 2005; Getz, 2005). Resultados diferentes para o leucograma são encontrados na literatura, não observando alterações na contagem de leucócitos no sangue periférico entre grupo nutrido e desnutrido (Barreto-Medeiros et al, 2007) ou encontrando redução nos valores de leucócitos, em consequência da alta demanda hematopoiética por nutrientes, em especial de proteínas (Borelli et al, 2007). Por outro lado, dietas hiperlipídicas podem alterar o recrutamento e a resposta de leucócitos, o que afeta o desenvolvimento de uma resposta imune local eficaz (Laflamme et al, 2014; Landgraf et al, 2005). Neste estudo, a desnutrição e o consumo de dieta hiperlipídica de forma isolada não repercutiram na contagem de leucócitos totais, entretanto tem-se uma menor proporção de leucócitos no

sangue do grupo DC quando comparado com o NH, representando menor distribuição de leucócitos no organismo.

No presente estudo, observou-se um aumento na contagem de linfócitos e redução nos neutrófilos no grupo desnutrido hiperlipídico. Estudos com animais desnutridos indicam redução na contagem e migração de linfócitos e neutrófilos (Landgraf et al, 2005), mesmo após o fornecimento de dieta padrão (Melo, 2008). Barreto-Medeiros et al (2007), observaram que animais desnutridos submetidos à estresse, apresentaram aumento imediato de linfócitos e aumento tardio no número de neutrófilos. No presente trabalho a desnutrição durante o período crítico da lactação associada ao consumo de dieta hiperlipídica parece afetar o número de leucócitos totais e diferenciais no sangue periférico, que alguns autores sugerem serem devidos a alterações na produção, desenvolvimento, migração ou diferenciação celular (Zadik, 2003; Grenger et al, 2000). São necessários estudos para compreender melhor os mecanismos que justifiquem estas alterações.

Ressalta-se que a ingestão da dieta hiperlipídica pode estar reduzida, como evidenciado no trabalho de Palou et al (2011), resultando em menor aporte proteico ao longo do dia para os animais. Esta redução no consumo proteico via dieta hiperlipídica teria relação com o peso reduzido do fígado e as alterações nas células sanguíneas. O estudo do comportamento alimentar pode vir a esclarecer esta relação e quantificar a real ingestão proteica diária dos animais.

O aumento do consumo de lipídios na dieta pode afetar diversos parâmetros imunológicos, como a proliferação de linfócitos, a síntese de citocinas (Stokes e Granger, 2005), a atividade das células natural killer (NK) (Ji et al, 2012) e a fagocitose (Stokes e Granger, 2005; Libby, 2002). No entanto, a modulação dessa resposta depende da composição de lipídios. A dieta utilizada no presente estudo é rica em ácidos graxos saturados e possui quantidade significativa de ácidos graxos insaturados. Ratos alimentados com uma dieta contendo óleo de oliva mostraram uma redução significativa na proliferação de linfócitos, em comparação com ratos alimentados com óleo de coco hidrogenado (de Pablo et al, 1998). Dietas que contêm ácidos graxos poliinsaturados provocam supressão da resposta mitogênica dos linfócitos a um maior grau do que as dietas ricas em ácidos graxos saturados, sendo que os ácidos graxos

poliinsaturados ômega-3 possuem efeito regulador sobre as funções imunológicas (Calder et al, 1995).

Por outro lado, valores elevados das transaminases na corrente sanguínea indicam lesão hepatocelular (Oh e Hustead, 2011). As elevações nos níveis de alanina aminotransferase (ALT) geralmente são mais específicas para lesões hepáticas do que a aspartato aminotransferase (AST), por ser encontrada principalmente no fígado enquanto a AST também é encontrado nos músculos esqueléticos e eritrócitos hepatocelular (Oh e Hustead, 2011). No presente estudo o valor da ALT entre os grupos desnutridos, foi menor para os que receberam a dieta hiperlipídica. Os valores de AST não se alteraram entre os grupos, corroborando com os achados de Souza-Mello (2007).

É bem documentada na literatura a relação da exposição à dieta hiperlipídica e o aumento de transaminases e doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) em ratos adultos (Castro et al, 2013; Dhibi et al, 2011; Manting et al, 2011; Sundaresan et al, 2011). Na DHGNA muitas vezes as únicas anormalidades encontradas são as elevações leves a moderadas nos níveis séricos de AST, de ALT ou ambos (Castro et al, 2013). A proporção de AST e ALT pode sugerir o padrão da doença, sendo doença alcoólica do fígado para os valores maiores do que dois e DHGNA para os valores inferiores a um (Oh e Hustead, 2011). No presente trabalho, a proporção entre as transaminases foi maior do que dois para os grupos nutrido e desnutrido controles e maior do que três para os grupos nutrido e desnutrido hiperlipídicos, indicando o efeito do excesso de lipídio no aumento destes valores. Como nenhum dos grupos experimentais recebeu cota alcoólica, estes resultados maiores do que um, poderiam indicar DHGNA avançada (Ângulo, 1999; 2002). Faz-se necessário, estudos histológicos do fígado para elucidar os presentes achados.

A origem de alguns distúrbios metabólicos manifestados na vida adulta podem ter suas raízes na agressão causada ao organismo durante o desenvolvimento (Martinez, 2012; Warner, 2010; Orozco-Solis et al, 2009; Barker, 2004). Neste contexto, diversos estudos relacionam a programação metabólica com a desnutrição no período pré e pós-natal (Martinez, 2012; Warner, 2010; Godfrey e Barker, 2000; Godfrey, 1998) e com o consumo da dieta hiperlipídica (Oliveira et al, 2011; Sahnkar et al, 2008; Buckley et al, 2005).

As alterações das transaminases normalmente são observadas em conjunto com as alterações dos lipídios no sangue (Dhibi et al, 2011). Verificou-se que o grupo DH apresentou aumento no CT e no LDL, corroborando com os achados de outros autores (Dhibi et al, 2011; Manting et al, 2011; Sundaresan et al, 2011). No entanto, neste grupo houve ainda o aumento do HDL, sem alterar os triglicérides, opondo-se aos resultados de Desai et al (2007). Pode-se atribuir estes achados ao perfil de lipídio da dieta ofertada, composta por 57,27% de ácidos graxos insaturados, responsáveis por alterar o perfil de lipoproteínas, em especial o aumento do HDL (Seo et al, 2005, Yo-Poth et al, 2000; Mustad et al, 1997; Nicolosi et al, 1997) e por 41,71% de ácidos graxos saturados, que são associados ao aumento do CT e do LDL (Ordovas et al, 2002; Mensink e Katan, 1989; Joensen et al, 2010). Mais uma vez a dieta hiperlipídica parece não ter sido capaz de recuperar o padrão de lipoproteínas do grupo desnutrido, o que a dieta equilibrada conseguiu fazer.

No presente estudo, a programação pela desnutrição ocasionou redução na função de aderência dos macrófagos alveolares no grupo hiperlipídico em relação aos grupos nutridos. Estes achados justificam-se na desnutrição como comprometedora da função dos macrófagos alveolares (Melo et al, 2013; Ferreira-e-Silva, 2009; Melo et al, 2008; Desai et al, 1996) e na oferta de lipídios da dieta como modificadora da fluidez da membrana celular, afetando funções específicas dos macrófagos (Enos et al, 2012).

Esta capacidade do lipídio de afetar funções dos macrófagos, depende da fonte de ácidos graxos para a formação de suas membranas (Enos et al, 2012), sendo que os ácidos graxos monoinsaturados reduzem a adesão de monócitos periféricos (Yaqoob, 2002) e os ácidos graxos saturados aumentam a adesão de macrófagos quando comparados aos ácidos graxos poliinsaturados (Calder, 1998). No entanto, a resposta dos ácidos graxos saturados no aumento do LDL e no aumento da adesão de macrófagos, são fatores essenciais no desenvolvimento da aterosclerose (Paks e Lusic, 2013; Moore e Tabas, 2011). Sendo assim, o fato do grupo DC não apresentar diferença em relação aos demais grupos, levanta a possibilidade interessante de que a dieta controle tenha sido capaz de recuperar a função de aderência no grupo em questão, o que não ocorreu com a dieta hiperlipídica.

É importante destacar que a possível redução no consumo da dieta hiperlipídica já comentada e consequente redução do aporte proteico tenham repercussão negativa em diversos parâmetros avaliados no presente estudo, como o ganho de peso, massa hepática, resultados bioquímicos, pois todos estes sistemas são dependentes da proteína para formação e função.

As consequências tardias da programação pela desnutrição precoce são diversas, bem como as consequências do consumo de uma dieta hiperlipídica. No entanto, a junção destes fatores claramente necessita de mais estudos. Este trabalho apresenta consideráveis evidências das alterações presentes quando as agressões são combinadas. A manipulação com a dieta hiperlipídica em um organismo programado pela desnutrição precoce permitiu perceber sua interação com aspectos importantes na vida adulta. Pôde ser observado, o menor ganho ponderal, a redução no peso do fígado, as alterações hematimétricas e do leucograma, além de piora no perfil de transaminases e de lipídios, somada a redução na função de aderência dos macrófagos alveolares. No entanto, para melhor entender os mecanismos de influência do excesso de lipídio sob os ratos desnutridos precocemente, faz-se necessário o desenvolvimento de novas investigações.

8. CONCLUSÕES

Em conclusão, neste trabalho a desnutrição precoce causou déficit ponderal não totalmente recuperado no adulto, e, em menor percentual no hiperlipídico. A desnutrição precoce associada ao uso de dieta hiperlipídica após a lactação causou redução no peso do fígado bem como alterações nos índices hematimétricos, indicando possível seqüela na eritropoiese no fígado e/ou no baço. A quantidade total de leucócitos no sangue não sofreu alteração. No entanto, como houve repercussão de forma isolada, esta pode ter sido revertida quando somadas às agressões nutricionais. A redução dos neutrófilos e aumento dos linfócitos no sangue associado às alterações sobre os valores de transaminases podem indicar possível lesão hepática mais acentuada nos grupos hiperlipídicos. A dieta hiperlipídica causou aumento do LDL e do HDL nos adultos programados pela desnutrição, podendo ser explicada possivelmente pelo perfil de ácidos graxos da dieta. Por fim, a redução no índice de aderência dos macrófagos demonstrou uma função prejudicada dessas células de defesa.

9. PERSPECTIVAS

Partindo dos resultados obtidos neste trabalho, algumas perspectivas podem aqui ser traçadas:

- Análise histológica e morfométrica do timo, baço e fígado.
- Quantificar o acúmulo de tecido adiposo visceral.
- Avaliar o comportamento alimentar em ratos jovens e adultos.
- Avaliar a fagocitose dos macrófagos.
- Avaliar a produção de citocinas próinflamatórias.
- Avaliar provável estado inflamatório através da dosagem de proteína C reativa e outros parâmetros

10. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia Básica*. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

ALIPPI, R.M. et al. Effect of protein-energy malnutrition in early life on the dimensions and bone quality of the adult rat mandible. *Archives of Oral Biology*, 47: 47–53, 2002.

ANGULO, P. et al. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999;30:1356-62.

ANGULO, P.; LINDOR, K.D. Non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2002; 17 (Suppl.) S186–S190.

BARKER, D.J.P. The development origins of adult disease. *J Am Coll Nutr*. 2004; 23(06):588S-595S.

BARKER, D.J.P. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med*. 2007; 261: 412-417.

BARRETO-MEDEIROS, J. et al. Stress/Aggressiveness-Induced Immune Changes Are Altered in Adult Rats Submitted to Neonatal Malnutrition. *Neuroimmunomodulation* 2007;14:229–334.

BORELLI, P. Reduction of erythroid progenitors in protein-energy malnutrition. *British Journal of Nutrition*. 2007; 97, 307–314.

BORELLI, P.; MARIANO, M.; BOROJEVIC, R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. *Nutr. Res.*, v. 15, n. 10, p. 1477-1485, 1995.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Política Nacional de Alimentação e Nutrição – PNAN*. 2012.

Brasil. Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome. *Panorama Municipal Segundo Censo Demográfico 2010 (IBGE)*. Disponível em: <<http://aplicacoes.mds.gov.br/sagi/RIV3/geral/index.php>>. Acesso em: 06 de outubro de 2012.

BUCKLEY, A.J. et al. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. *Metabolism*. 2005; 54:500–507.

BUETTNER, R. et al. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. *Obesity*. 2007 Apr;15(4):798-808.

CALDER, P.C. Fatty acids, dietary lipids and lymphocyte functions. *Biochem. Soc. Trans.* 1995; 23: 302–9.

CALDER, P.C. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Braz J Med Biol Res*. 1998; 31: 467-490

CAMBRAIA, R.P.B. et al. Effects of malnutrition during early lactation on development and feeding behavior under the self selection paradigm. *Nutrition*, 17:455-461, 2001.

CARVALHO-SANTOS, J. et al. Efeito do tratamento com triptofano sobre parâmetros do comportamento alimentar em ratos adultos submetidos à desnutrição neonatal. *Rev. Nutr.*, Campinas, 23(4):503-511, jul./ago., 2010.

CESTA, M.F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Toxicol Pathol*. 2006 34: 455.

COUTO, R. D. et al. Polyunsaturated fatty acids modulate the effects of the APOA1 G-A polymorphism on HDL-cholesterol concentrations in a sex-specific manner: the Framingham Study. *Am J Clin Nutr*. 2002;75(1):38-46.

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

DE CASTRO, C.M.M.B. et al. Effect of stress on the production of O₂⁻ in alveolar macrophages. *J Neuroimmunol*. 2000; 108(1/2):68-72.

DE CASTRO, U.G.M. et al. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. *Lipids in Health and Disease*. 2013, 12:136

DE PABLO, M.A. et al. Influence of diets containing olive oil, sunflower oil or hydrogenated coconut oil on the immune response of mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 1998; 25: 11–23.

DELVES, P.J.; ROITT, I.M. The immune system: First of two parts. *N Engl J Med.* 2000 Jul 6;343(1):37-49.

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

DESAI, M. Programmed obesity in intrauterine growth restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288: 91–96, 2005.

DESAI, M.; BABU, J.; ROSS, M.G. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293: R2306–R2314.

DHABHAR, F.S. et al. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *J Immunol* 1996; 157: 1638–1644.

DHIBI, M. et al. The intake of high fat diet with different *trans* fatty acid levels differentially induces oxidative stress and non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. *Nutrition Metabolism.* 2011, 8:65.

ENOS, R.T. et al. Influence of dietary saturated fat content on adiposity, macrophage behavior, inflammation, and metabolism: composition matters. *J. Lipid Res.* 2013. 54: 152–163.

ERHUMA, A.L. et al. Prenatal exposure to undernutrition and programming of responses to high-fat feeding in the rat. *British Journal of Nutrition* (2007), 98, 517–524.

FERREIRA-E-SILVA, W.T. et al. Perinatal Malnutrition Programs Sustained Alterations in Nitric Oxide Released by Activated Macrophages in Response to Fluoxetine in Adult Rats. *Neuroimmunomodulation.* 2009;16(4):219-27.

Food and Agriculture Organization (FAO). The State of Food Insecurity in the World 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/014/i2330e/i2330e00.htm>>. Acesso em: 05 de outubro de 2012.

Food and Agriculture Organization (FAO). The State of Food Insecurity in the World 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/013/i1683e/i1683e.pdf>>. Acesso em: 05 de outubro de 2012.

GETZ, G.S. Bridging the Innate and Adaptive Immune Systems. *J Lipid Res.* 2005; 46, 619–622.

GLEESON, M.; CRIPPS, A.W. Development of mucosal immunity in the first year of life and relationship to sudden infant death syndrome. *Immunology and Medical Microbiology.* 2004; 42, p:21–33.

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A.; PINAL, C. The developmental origins of adult disease. *Matern Child Nutr.* 2005; 1(3):130-41.

GODFREY, K.M. Maternal regulation of fetal development and health in adult life. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1998; 78:141-150.

GODFREY, K.M.; BARKER, D.J.P. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr* 2000;71(suppl):1344S–52S.

GORDON, S. The macrophage: Past, present and future. *Eur. J. Immunol.* 2007. 37: S9–17.

GORONZY, J.; WEYAND, C.M. Sistemas imunológicos inato e adaptativo. In: Goldman L, Ausiello D. *Cecil Medicina.* 23 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, p.299-312.

HUGHES, D.A. The influence of the diet on the maturation of the immune system. *Allergy.* 1998; 53(Suppl 46): 26-28.

JI, Y. et al. Short Term High Fat Diet Challenge Promotes Alternative Macrophage Polarization in Adipose Tissue via Natural Killer T Cells and Interleukin-4. *The journal of biological chemistry.* 2012; v.287, n.29, pp: 24378–24386.

JOENSEN, A.M. Dietary intake of total marine n-3 polyunsaturated fatty acids, eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid and the risk of acute coronary syndrome - a cohort study. *Br J Nutr.* 2010;103(4):602-7.

LAFLAMME, C. et al. Evidence of impairment of normal inflammatory reaction by a high-fat diet. *Genes Immun.* 2014, Feb.

LANANGLEY- EVANS, S. Fetal programming of immune function and respiratory disease. *Clin Exp Allergy.* 1997; 27:1377-1379.

LANDGRAF, M.A.V. et al. Intrauterine Undernutrition in Rats Interferes with Leukocyte Migration, Decreasing Adhesion Molecule Expression in Leukocytes and Endothelial Cells. *J. Nutr.* 135: 1480–1485, 2005.

LATHAM, M.C. Human nutrition in the developing world, 1997. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/W0073e/w0073e00.htm>>. Acesso em: 08 de outubro de 2012.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002; 420, 868–874.

LUCAS, A. Programming by Early Nutrition: An Experimental Approach. *J Nutr.* 1998; 128: 401S–406S.

LUKASZEWSKI, M.A. et al. Nutritional manipulations in the perinatal period program adipose tissue in offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;v.15;305(10):E1195-207.

LUMENG, C.N.; BODZIN, J.L.; SALTIEL, A.R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* Jan 2, 2007; 117(1): 175–184.

MANTING, L. et al. The model of rat lipid metabolism disorder induced by chronic stress accompanying high-fat-diet. *Lipids Health Dis.* 2011; 10: 153.

MARTINEZ, A.C.; ALVAREZ-MON, M. O sistema imunológico (I): Conceitos gerais, adaptação ao exercício físico e implicações clínicas. *Ver Bras Med Esporte.* 1999; 05(03).

MARTINEZ, J.A. et al. Interplay of earlylife nutritional programming on obesity, inflammation and epigenetic outcomes. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2002 ;v.71, n.02, p:276-283.

MATTHEW, J. et al. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem. J.* (2010) 427, 333–347.

MEIJERA, V.E. et al. Dietary fat intake promotes the development of hepatic steatosis independently from excess caloric consumption in a murine model *Metabolism Clinical and Experimental*. 2010; 59:1092–1105.

MELO, J.F. et al. Efeito da desnutrição neonatal sobre o recrutamento celular e a atividade oxidante-antioxidante de macrófagos em ratos adultos endotoxêmicos. *Rev Nutr*. 2008; 21(6):683-694.

MELO, J.F. et al. Long-term effects of a neonatal low-protein diet in rats on the number of macrophages in culture and the expression/ production of fusion proteins. *Eur J Nutr*. 2013; 52:1475–1482.

MENSINK, R.P.; KATAN, M.B. Effect of a diet enriched with monounsaturated or polyunsaturated fatty acids on levels of low-density and high-density lipoprotein cholesterol in healthy women and men. . *N Engl J Med*. 1989 Aug 17;321(7):436.

MOLD, J.E. et al. Fetal and adult hematopoietic stem cells give rise to distinct T cell lineages in humans. *Science*. 2010; 330: 1695-1699.

MOORE, K.J.; TABAS, I. The Cellular Biology of Macrophages in Atherosclerosis. *Cell*. 2011; 145(3): p. 341-355.

MOORE, S.E. Nutrition, immunity and the fetal and infant origins of disease hypothesis in developing countries. *Proc Nutr Soc*. 1998; 57:241-247.

MORGANE, P.J.; MOKIER, D.J.; GALLER, J.R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002; 26(04):471-83.

MOSSER, D.M; EDWARDS, J.D. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature*. v.8, 2008.

MUSSTAD, V.A. et al. Reducing saturated fat intake is associated with increased levels of LDL receptors on mononuclear cells in healthy men and women. *J Lipid Res.* 1997 Mar;38(3):459-68.

NGOM, P.T. et al. Improved thymic function in exclusively breastfed infants is associated with higher interleukin 7 concentrations in their mothers' breast milk. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80:722-8.

NICOLOSI, R.J.; ROGERS, E.J. Regulation of plasma lipoprotein levels by dietary triglycerides enriched with different fatty acids. *Med Sci Sports Exerc.* 1997;29(11):1422-8.

NOVELLI, E.L.B, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animal.* 2007; 41:111-119.

OH, R.C.; HUSTEAD, T.R. Causes and Evaluation of Mildly Elevated Liver Transaminase Levels. *Am Fam Physician.* 2011 Nov 1;84(9):1003-1008.

OLIVEIRA, T.W.S. et al. A Perinatal Palatable High-Fat Diet Increases Food Intake and Promotes Hypercholesterolemia in Adult Rats. *Lipids* (2011) 46:1071–1074.

Organização das Nações Unidas – ONU. Comitê Permanente da ONU sobre Nutrição, 2009. Disponível em: <http://www.unscn.org/en/home/why-nutrition-is-important.php>>. Acesso em: 06 de outubro de 2012.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1977; 56:247-53.

OROZCO-SOLIS, et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav.* 2009, 96:481–492.

ORTIZ, R. et al. Medina. Malnutrition alters the rates of apoptosis in splenocytes and thymocyte subpopulations of rats. *Clinical and Experimental Immunology*, 155: 96–106, 2009.

OZANNE, S.E.; HALES, C.N. Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2002; 13(09):368-73.

PALMER, A.M. Nutritionally mediated programming of the developing immune system. *Adv. Nutr.* 2011; 2: 377-398.

PALOU, M. et al. Moderate caloric restriction in lactating rats programs their offspring for a better response to HF diet feeding in a sex-dependent manner. *Journal of Nutritional Biochemistry* 22 (2011) 574–584.

PARKS, B.W.; LUSIS, A.J. Macrophage Accumulation in Atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2013; 369:2352-2353.

PEAKMAN, M.; VERGANI, D. *Imunologia: Básica e Clínica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

PEREIRA, KNF. Repercussões da Desnutrição e/ou da Inibição Neonatal da Recaptação de Serotonina no Desenvolvimento Neuromuscular do Trato Gastrointestinal: Revisão da Literatura. *Nurobiologia.* 2009; 72(2).

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

PESSOA, D.C.N.P. et al. Influence of content and quality of diet protein in body growing and organ development in three successive rat generations. *J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP, v. 30, p. 31-52, dez. 2005.*

ROBERTS, S.B.; COLE, T.J.; COWARD, W.A. Lactational performance in relation to energy intake in the baboon. *American Journal of Clinical Nutrition,* 41:1270-1276, 1985.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia.* 6 ed. São Paulo: Manole, 2003.

SAVINO, W. The thymus gland is a target in malnutrition. *Eur J Clin Nutr.* 2002; 56(Suppl 3):S46-S49.

SAVINO, W.; DARDENNE, M. Nutritional imbalances and infections affect the thymus: consequences on T cell mediated immune responses. *Proc Nutr Soc.* 2010; 69:636-643.

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

Segura, JJ; Llamas, R; Rubio-Manzanares, AJ; Jimenez-Planas, A; Guerrero, JM; Calvo, JR. Calcium Hydroxide Inhibits Substrate Adherence Capacity of Macrophages. *Journal of Endodontics*, 23(7): 444-447, 1997.

SELLAYAH, D. et al. Effect of maternal protein restriction during pregnancy and postweaning high-fat feeding on diet-induced thermogenesis in adult mouse offspring. *Eur J Nutr*, 2014.

SEO, T.; BLANER, W.S.; DECKELBAUM, R.J. Omega-3 fatty acids: molecular approaches to optimal biological outcomes. *Curr Opin Lipidol*. 2005 Feb;16(1):11-8.

SHANKAR, K. et al. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008. 294:R528–R538.

SILVA, S.V. et al. Maternal protein restriction during early lactation induces changes on neutrophil activation and TNF- α production of adult offspring. *Inflammation*, 2010; 33(2).

SOUZA-MELLO, V. et al. Hepatic structural alteration in adult programmed offspring (severe maternal protein restriction) is aggravated by post-weaning high-fat diet. *British Journal of Nutrition* (2007), 98, 1159–1169.

STOKES, K.Y. et al. Role of interleukin 12 in hypercholesterolemia-induced inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285:H2623–H2629.

STOKES, K.Y.; COOPER, D.; GRANDER, D.N. Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. *Free Radic Biol Med*. 2002; 33(8):1026–1036.

STOKES, K.Y.; GRANGER, D.N. The microcirculation: a motor for the systemic inflammatory response and large vessel disease induced by hypercholesterolaemia? *J Physiol*. 2005; 562(3):647-653.

SUNDARESAN, S. et al. A mouse model for nonalcoholic steatohepatitis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. v.22, n.10, 2011, p:979–984.

United Nations Children's Fund - UNICEF. Relatório sobre Nutrição Infantil, 2006. Disponível em: <http://www.unicef.org/nutrition/index_33721.html>. Acesso em: 05 de outubro de 2012.

United Nations Children's Fund – UNICEF. Um Mundo para as Crianças, 2007. Disponível em: <http://www.unicef.org/progressforchildren/2007n6/files/Progress_for_Children_-_No._6.pdf>. Acesso em: 06 de outubro de 2012.

WATERLAND, R.A.; GARZA, C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69:179-197, 1999.

WOODS, J.A.; VIEIRA, V.J.; KEYLOCK, T.K. Exercise, Inflammation, and Innate Immunity. *Neurol Clin* 24 (2006) 585–599.

YAQOOB, P. Monounsaturated fats and immune function. *Eur J Clin Nutr*. 2002 Aug;56 Suppl 3:S9-S13.

YU-POTH, S. et al. Lowering dietary saturated fat and total fat reduces the oxidative susceptibility of LDL in healthy men and women. *J Nutr*. 2000. 130(9):2228-37.