

ADRIANA MARIA DA SILVA TELLES



**RESPOSTA IMUNITÁRIA AO ESTRESSE EM RATOS
ADULTOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NEONATAL**

**RECIFE
2004**

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



ADRIANA MARIA DA SILVA TELLES

RESPOSTA IMUNITÁRIA AO ESTRESSE EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NEONATAL

Tese de Doutorado apresentada a Coordenação de Pós-graduação em Nutrição do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do grau de Doutor em Nutrição.

Orientador

Dr. Raul Manhães de Castro

Professor do Depto de Nutrição, CCS - UFPE

Coorientadora

Dra Célia Ma Machado B. de Castro

Professora do Depto de Medicina Tropical, CCS - UFPE

RECIFE
2004

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

S163d Telles, Adriana Maria da Silva
Resposta Imunitária ao estresse em ratos adultos submetidos à
desnutrição neonatal / Adriana Maria da Silva Telles. – 2004.
92 folhas : il., fig., graf., quadros.

Orientador: Raul Manhães de Castro
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCS. Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2004.
Inclui referências e anexos.

1. Desnutrição – Estresse. 2. Ratos adultos – Respostas
Imunológicas. 3. Sistemas nervoso, endócrino e imune –
Avaliação hematológica do corticosteróide. 4. Sistema imune –
Resposta humoral e celular. I. Castro, Raul Manhães (Orientador).
II. Título.

612.40

CDD (23. ed.)

UFPE (CCS 2004 -554

**“RESPOSTA IMUNITÁRIA AO ESTRESSE EM RATOS ADULTOS
SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NEONATAL”**

ADRIANA MARIA DA SILVA TELLES

Aprovada em: 12/11/2004

Orientador Interno: DR. RAUL MANHÃES DE CASTRO

COMISSÃO EXAMINADORA

PROF^a Dra. DEBORA CATARINE NEPOMUCENO DE PONTES PESSOA – CCS-UFPE

PROF^a Dra. FLORISBELA DE ARRUDA CÂMARA E SIQUEIRA CAMPOS – CCS-UFPE

PROF. Dr. NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO – CCS-UFPE

PROF^a Dra. ARMELE DE FÁTIMA DORNELLAS DE ANDRADE – CCS-UFPE

PROF^a Dra. CÉLIA MARIA MACHADO BARBOSA DE CASTRO – CCS-UFPE

A **Deus**, por sua presença certa
em meus momentos de incertezas.

Aos meus pais,
Everaldo e Glória,
por existir;
pelo amor e exemplo de vida,
me tornando uma pessoa simples,
porém mais sensível.

Aos meus filhos
Felipe e André,
pela alegria, pela pureza
no convívio que me tornou
mais orgulhosa em ser mãe.

A **Francisco Eduardo**, meu amigo e
companheiro, pelo amor, incentivo e paciência ,
em todas os momentos
que fazem os nossos dias melhores.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof^o **Raul Manhães de Castro**, que me proporcionou excelente orientação, apoio, confiança científica e amizade, além de aumentar os meus horizontes na pesquisa científica, na execução deste trabalho; com simplicidade e incontestável consciência científica e tranquilidade.

A Professora **Célia Manhães de Castro**, pela co-orientação, incentivando e transmitindo seus conhecimentos durante a execução do presente trabalho.

Aos Profs. Drs. **Raul Manhães de Castro** e **Mônica Ozório**, coordenadores do Doutorado em Nutrição, pela dedicação e entusiasmo na elaboração das teses.

Aos Profs integrantes do Doutorado em Nutrição, pelos ensinamentos e consideração.

Ao Professor **José Luiz Filho**, Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), por ceder as instalações para a realização dos protocolos experimentais.

Ao Prof. **Sergio Magalhães** pela utilização do seu Laboratório, para as dosagens iniciais dos corticosteróides.

Aos **colegas** do Departamento de Patologia da UFPE, do qual faço parte como integrante do corpo docente, pelo apoio, incentivo e companheirismo.

Ao Professor **Mario Ribeiro de Melo Jr** pelo exemplo no desempenho da atividade acadêmica, o que tem influenciado uma nova geração.

Ao Professor **Eduardo Beltrão**, pela amizade durante todo o nosso período de convivência e a elaboração do abstract.

Aos meus alunos, amigos e companheiros, **Maria da Conceição Duarte, Jorge Luiz Araújo, Adriana dos Santos Medeiros, Marcos Cezar Machado, Luciano Albuquerque e Yuri dos Santos**, pela colaboração constante, incentivo, apoio e amizade no decorrer do presente trabalho.

À Professora **Jairza Barreto de Medeiros**, pela amizade, respeito e consideração durante nossa convivência.

À **Sebastião Rogério**, pela orientação, apoio e paciência durante a realização do meu trabalho.

À **Lúcia Maria Pires Ferreira** pela fundamental orientação na análise estatística dos resultados, amizade e compreensão nas horas mais importante deste trabalho.

Aos funcionários **Fernanda Almeida, Edeones França e Hamílto Salviano**, agradeço a atenção e colaboração.

A **Neci do Nascimento**, secretaria da pós-graduação, os meus sinceros agradecimentos pelas valiosas colocações e pela amizade que consolidamos.

Aos estagiários **Claudionilo Mudo e Rosangela Rosendo**, no auxílio da execução dos experimentos.

Ao Departamento de Nutrição da UFPE, para a realização desta pesquisa.

A Todos, que de uma forma ou de outra, contribuíram para a concretização deste trabalho.

*É preciso reviver os sonhos e a certeza de que tudo vai mudar;
É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de
nós: onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão.
O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração; pois a vida está
nos olhos de quem sabe ver...
Se não houver frutos... valeu a beleza da flores.
Se não houver flores... valeu a sombra das folhas.
Se não houver folhas... valeu a força do tronco.
Se não houver tronco... valeu a intenção da semente.*

*"Dificuldades reais poder ser resolvidas; apenas as imaginárias são
insuperáveis". (Theodore N. Vail)*

RESUMO

No presente trabalho, foram investigados os efeitos do estresse orgânico ou psicológico e da adrenalectomia, sobre aspectos da resposta imunitária, em ratos adultos submetidos à desnutrição no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados. Sendo assim, foram utilizados ratos Wistar entre 90 e 120 dias. Foram assim obtidos os seguintes grupos experimentais: Nutrido (N), Nutrido Estressado (NE), Nutrido LPS (N-LPS), Nutrido Adrenalectomizado (NA), Desnutrido (D), Desnutrido Estressado (DE), Desnutrido LPS (D-LPS) e Desnutrido Adrenalectomizado (DA). Foram realizados os seguintes estudos: da evolução ponderal; de parâmetros hematológicos (séries vermelha e branca); da produção de anticorpos e dos níveis séricos de corticosteróides. Nos animais nutridos expostos ao estresse psicológico (NE) provocaram a diminuição do número de hemácias, valores de hematócrito e número de linfócitos também diminuídos, entretanto, apresentou aumento no número total de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos e aumento nos níveis de corticosteróides, contudo, já o estresse orgânico (N-LPS) causou diminuição no peso corporal e no número de linfócitos, entretanto, houve aumento nos valores de hematócrito, leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos; a adrenalectomia (NA) ocasionou uma diminuição no peso corporal, no número de hemácias, nos valores de hemoglobina, hematócrito, linfócitos e níveis de corticosteróides, entretanto acarretou um aumento no número total de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos. Nos animais desnutridos (D), o estresse psicológico (DE) provocou aumento do número de hemácias, no número dos neutrófilos, eosinófilos, monócitos e nos níveis de corticosteróides, contudo houve diminuição no número total de leucócitos; o estresse orgânico (D-LPS) ocasionou um aumento nos valores de hematócrito, no número total de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos, entretanto acarretou uma diminuição no número de linfócitos; a adrenalectomia (DA) acarretou uma diminuição no peso corporal, nos valores de hemácias, hemoglobina, hematócrito, no número de linfócitos e nos níveis de corticosteróides, entretanto houve um aumento no número de leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos e monócitos. Assim, conclui-se que a desnutrição durante o período de crescimento rápido do encéfalo (período neonatal) após longo período de recuperação, causa em ratos adultos alteração da resposta imune celular; redução da resposta imune humoral; alteração da imunidade celular e humoral em resposta aos diferentes tipos de estresse; alteração dos níveis de corticosteróides. A adrenalectomia causa alterações drásticas, em particular no desnutrido, no padrão leucocitário e na resposta imune que perturbam sobremaneira a homeostase.

Palavras-chave: Desnutrição. Organic stress. Ratos. Sistema nervoso. Resposta imune. Adrenalectomia.

ABSTRACT

In the present study it was investigated the effects of organic and psychological stress and of adrenalectomy in the immunology response in adult rats submitted to malnutrition during the development of the nervous system followed by nutritional recovering. Combination of the groups above raised the following experimental groups: nourished (N), nourished and stressed (NS), LPS nourished (LPS-N), nourished and adrenalectomized (NA), malnutrition (D), malnutrition and stressed (DS), LPS malnutrition (LPS-D) and malnutrition and adrenalectomized (DA). Each rat was submitted to ponderal evaluation, hemathological parameters (white and red cells counting), antibody production and serum corticosteroid levels measurement. In our study only rats submitted to neonatal malnutrition (D) presented a significant reduction in erythrocytes, hemathocrites, goat anti-erythrocyte antibody and corticosteroid levels. In the NS group was observed a decrease in erythrocytes, hemathocrites and lymphocytes and an increase in leukocyte, neutrophils, eosinophyl and corticosteroid levels. LPS-N group presented a decrease in body weight and lymphocyte level and an increasing in hemathocrite, total leucocytes, neutrophils and eosinophyl. Rats in NA group had a reduction of the body weight, decreasing in erythrocyte, hemoglobin, hemathocrite, lymphocyte and corticosteroid levels and increasing in total leukocyte, neutrophils, eosinophyl and monocytes levels. In malnutrition and stressed animals (DE), it was observed an increasing in erythrocytes, neutrophils, eosinophyl, monocytes, and corticosteroid levels and a decrease in total leucocytes; LPS-D presented an increasing in hemathocrite, total leukocyte, neutrophils, eosinophyl and monocytes levels with a decrease in lymphocytes. DA animals presented a decrease in body weight, erythrocytes, hemoglobin, hemathocrite, lymphocytes and corticosteroid levels while it was observed an increasing in the number of total leukocyte, neutrophils, eosinophyl and monocytes levels. Our results show that malnutrition during the neonatal period (period of fast and encephalic growth), after a long period of recovering, causes in adult rats alterations in cellular immune response, reduction of humoral immune response, alteration of immune response under organic or psychological stresses and alteration of corticosteroid level. Adrenolectomy causes severe changes, especially in malnutrition animals, in the leukocyte pattern and in the immune response leading to a perturbation the homeostasis.

Keywords: Malnutrition. Stress organic. Rats. Nervous system. Immune response. Adrenolectomy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Material para anestesia (Ketalar)	27
Figura 2	Instrumental cirúrgico	27
Figura 3	Assepsia	27
Figura 4	Adrenalectomia	27
Figura 5	Adrenal	27
Figura 6	Cilindro de PVC	28
Figura 7	Estrutura do LPS está ligado à membrana externa de bactérias Gram negativas através do lipídio A	28
Quadro 1	Composição da dieta “Labina”, usada na alimentação dos animais nutridos (N) e níveis de garantia	29
Quadro 2	Composição centesimal da “Dieta Básica Regional” (DBR) usada nos grupos desnutridos (D).	30
Figura 8	Micro-hematócrito	33
Figura 9	Campos utilizados para contagem de hemácias	33
Figura 10	Campos utilizados para contagem de leucócitos no sangue	34
Figura 11	Placa de hemoaglutinação	36
Gráfico 1	Peso dos ratos adultos nutridos	38
Gráfico 2	Peso dos ratos adultos desnutridos no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados.	39
Gráfico 3	Número de hemácias obtidas de ratos adultos nutridos (NC, n= 8) e desnutridos (DC, n=8), durante o período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso e nutricionalmente recuperado	40
Gráfico 4	Número de hemácias em ratos adultos nutridos	41
Gráfico 5	Número de hemácias em ratos adultos desnutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8) no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados	42
Gráfico 6	Os valores de hemoglobina em ratos adultos nutridos	43

Gráfico 7	Os valores de hemoglobina em ratos adultos desnutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8) no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados	44
Gráfico 8	Valores de hematócrito obtidos em ratos adultos nutridos (NC, n= 8) e desnutridos (DC, n=8), durante o período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso e nutricionalmente recuperado	45
Gráfico 9	Os valores de hematócrito em ratos adultos nutridos	46
Gráfico 10	Os valores de hematócrito em ratos adultos desnutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8)	47
Gráfico 11	O número total de leucócitos em ratos adultos nutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8)	48
Gráfico 12	O número total de leucócitos em ratos adultos nutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8)	49
Gráfico 13	O número de segmentados em ratos adultos nutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8)	50
Gráfico 14	O número de segmentados em ratos adultos desnutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8)	51
Gráfico 15	O número de linfócitos em ratos adultos nutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8)	52
Gráfico 16	O número de linfócitos em ratos adultos desnutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8)	53
Gráfico 17	O número de eosinófilos em ratos adultos nutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8)	54
Gráfico 18	O número de eosinófilos em ratos adultos desnutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8)	55
Gráfico 19	O número de monocitos em ratos adultos nutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8)	56
Gráfico 20	O número de monocitos em ratos adultos desnutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8)	57
Gráfico 21	Os níveis de corticosteróides obtidos de ratos adultos nutridos (NC, n= 8) e desnutridos (DC, n=8), durante o período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso e nutricionalmente recuperado	59

Gráfico 22	O nível de corticosteróides obtidos em ratos adultos nutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8)	60
Gráfico 23	O nível de corticosteróides obtidos em ratos adultos desnutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8)	61
Gráfico 24	Ratos adultos, entre 90 e 120 dias de idade, nutridos (NC) ou desnutridos (DC) no período crítico do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperado	62

LISTA DE ABREVIATURAS

α - MSH:	α -melanócito estimulante (α -MSH)
AB:	Aminas biogênicas
Ac:	Anticorpos
ACTH:	Hormônio adrenocortitrópico
Ag:	Antígeno
ANOVA:	Analysis of variance
CMH:	Complexo Maior de Histocompatibilidade
CRF:	Fator liberador de corticotropina
CRH:	Hormônio liberador de corticotropina
Cs:	Citocinas
D:	Desnutrido
DA:	Desnutrido Adrenalectomizado
DBR:	Dieta básica regional
DE:	Desnutrido estressado
DEP:	Desnutrição energético-protéica
DO:	Densidade óptica
DP:	Desnutrição protéica
E:	Estresse
EDTA:	Ácido etileno diamino tetra acético
FC:	Fator de calibração
GC:	Glicocorticóides
GH:	Hormônio do crescimento
GR:	Receptor para glicocorticóide
Hb:	Hemoglobina
HC:	Hemácias de carneiro
Hm:	Hemácias
HPA:	Hipotálamo-pituitária-adrenal
IFN γ:	Interferon gama
IL:	Interleucina
LB:	Linfócito B
LPS:	Lipopilisacarideo bacteriano gram negativo

LT:	Linfócito T
MAC:	Complexo de ataque à membrana
N:	Nutrido
NA:	Nutrido Adrenaectomizado
NE:	Nutrido estressado
NLPS:	Nutrido LPS
NK:	Linfócito citotóxico nulo
NO:	Óxido Nítrico
PBS:	Tampão fosfato de sódio
POMC:	Pro-opiomalanocortina
PVN:	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RIH:	Resposta imune humoral
RL:	Radicais livres
SE:	Sistema endócrino
SI:	Sistema imune
SN:	Sistema Nervoso
TNF:	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Apresentação do problema	17
1.2 Justificativa	24
1.3 Objetivos	25
1.3.1 Geral	25
1.3.2 Específicos	25
1.4 Hipóteses	25
2 METODOLOGIA	26
2.1 Animais	26
2.2 Grupos experimentais	26
2.2.1 Segundo a manipulação nutricional	26
2.2.2 Emprego da Dieta Básica Regional na obtenção de desnutridos	26
2.2.3 Segundo a presença ou não das adrenais	27
2.2.4 Segundo o estado fisiológico	28
2.2.5 Estresse psicológico (E)	28
2.2.6 Estresse orgânico (LPS)	28
2.2.6.1 <i>Ativação da resposta inflamatória por estímulo com LPS</i>	28
2.2.6.2 <i>Constituição final dos grupos</i>	29
2.3 Estudos	30
2.3.1 Da evolução ponderal	30
2.3.2 Da determinação dos níveis corticosterona séricos	30
2.3.3 Dos parâmetros hematológicos	31
2.3.4 Determinação de Hemoglobina	31
2.3.5 Determinação de Hematócrito	32
2.3.6 Contagem total de hemácias	33
2.3.7 Contagem total de leucócitos	34
2.3.8 Contagem diferencial de leucócitos	35
2.3.9 Da resposta imune humoral	35
2.4 Análise Estatística	37
3 RESULTADOS	38
3.1 Estudo da repercussão ponderal	38

3.2 Estudo da série vermelha	40
3.2.1 Hemácias	40
3.2.2 Hemoglobina (g/dl)	43
3.2.3 Hematócrito (%mm ³)	45
3.3 Estudo da série branca	48
3.3.1 Leucócitos totais	48
3.3.2 Leucócitos diferenciais	50
3.3.2.1. <i>Segmentados</i>	50
3.3.2.2 <i>Linfócitos</i>	52
3.3.2.3. <i>Eosinófilos</i>	54
3.3.2.4 <i>Monócitos</i>	56
3.3.2.5 <i>Basófilos</i>	58
3.3.3 Níveis de corticosteróide (mcg/dl)	59
3.3.4 Análise de títulos de Anticorpos específicos	62
4 DISCUSSÃO	63
5 CONCLUSÃO	71
6 PERSPECTIVA	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXOS	82
ANEXO 1. Resumos e trabalhos apresentados e publicados em congressos	82
ANEXO 2. Trabalhos publicados em Revistas Indexadas	84
ANEXO 3. Trabalho Aceito para Publicação em Revista Indexada	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação do problema

A imunidade é decorrente da resistência natural ou adquirida de um organismo vivo a um agente estranho. Quando os antígenos penetram no organismo os processos de defesa são iniciados de acordo com a complexidade do agente agressor, dessa forma são estimulados órgãos, células imunocompetentes, e as moléculas por elas produzidas, que são responsáveis pelo sistema imune (SI) (BELLONE & TRICHERI, 1994).

A imunidade denominada inata responde a maioria das agressões ao organismo, muitas vezes de forma tão fugaz que passa despercebida (DON MASON & POWRIE, 1998). Entretanto, alguns patógenos são resistentes a estes mecanismos naturais e para eliminá-los o SI denominado de adquirido é acionado.

As principais células da imunidade inata são os neutrófilos e os macrófagos. Quando da ocorrência de contato com o antígeno, estas células são acionadas e há liberação de seus produtos biológicos (BORELLI et al., 1998). Contudo, seguida à agressão, aquelas células se dispersam, sem originar memória imunológica. Tais células atuam na neutralização e eliminação do agente agressor através de fagocitose. Nesse processo fagocítico, ocorre à ativação de várias enzimas (BELLONE & TRICHERI, 1994) e geração de intermediários reativos do O₂ (DEL REY, KLUSMAN & BESEDOVSKY, 1998), os quais promovem a destruição do antígeno. Todavia, em situações em que a agressão persiste, são mobilizadas outras células de defesa que irão atuar especificamente.

Os linfócitos B e linfócitos T (CD₄ e CD₈) atuam respectivamente na imunidade adquirida humoral e celular (MURPHY, 1998). Assim, a Imunidade Humoral é mediada por anticorpos secretados por linfócitos B em resposta ao estímulo antigênico. A imunidade celular é mediada pelos linfócitos T e envolve o mecanismo de citotoxicidade (BORELLI et al., 1998). Estas células distinguem diferenças mínimas entre distintos antígenos, reconhecendo-os especificamente através de receptores expressos em suas superfícies (MURPHY, 1998). A interação receptor-antígeno pode promover a diferenciação dos linfócitos T (CD₄ e CD₈) e linfócitos B em células efetoras e de memória (MURPHY, 1998). A memória imunológica é a vantagem principal do SI, conferindo ao indivíduo imunidade ao antígeno em exposição posterior (WEIGENT & BLALOCK, 1987).

Os linfócitos B originam-se e amadurecem na medula óssea. Estas células reconhecem polissacarídeos, lipídeos, ácidos graxos e proteínas através do seu receptor para

antígeno exposto na superfície celular. Estes quando ativados pelo seu antígeno específico, proliferam e diferenciam em células secretoras de anticorpos, os plasmócitos (BOLAÑOS, MARIANO & BOROJEVIC, 1995). Os anticorpos secretados pelos plasmócitos possuem várias funções: neutralizam antígenos impedindo o estabelecimento destes nas células e mucosas; auxiliam na fagocitose; ativam o sistema complemento e medeiam a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (BOLAÑOS, MARIANO, BOROJEVIC, 1995).

A ação em conjunto dos linfócitos B, linfócitos TCD₄ e linfócitos TCD₈, permite a focalização da resposta imune (ZOU et al., 1997). Assim, a ação imunológica de eliminação do antígeno é dirigida para o local onde se encontra o agente agressor, havendo também uma amplificação dos mecanismos imunes inatos, tornando-os mais eficazes.

O SI é considerado um sistema biológico complexo e eficiente, contudo, atualmente está estabelecido que sua atuação plena é dependente de outros sistemas. Neste particular, diversos trabalhos científicos demonstraram a interação entre o SI, o Sistema Nervoso (SN) e o Sistema Endócrino (SE) (HOMO-DELARCHE & DARDENE, 1993). É interessante observar que o SI, visualizado em geral como um sistema essencialmente de defesa contra microrganismos e outros agressores, tem importante participação na função de outros sistemas, em todas as fases da vida do indivíduo, interferindo, por exemplo, em mecanismos neuroendócrinos, desde a embriogênese até a senescência (WEIGENT & BLALOCK, 1987).

As células do sistema imune são capazes de sintetizar e liberar substâncias que atuam de forma semelhante aos neurotransmissores e aos hormônios (OTTAVIANI, FRANCHINI & GENEDANI, 1999). Estas substâncias denominadas citocinas interferem nas funções do SN e do SE (OTTAVIANI, FRANCESCHI, 1997). Por outro lado, o SN e SE interferem de forma efetiva nos mecanismos imunológicos, seja favorecendo a estimulação ou o bloqueio desses mecanismos (VIZI, 1998). Devido a estas evidências, surgiu a concepção unitária de sistema neuroimunoendócrino. Neste particular, o estresse é um estado fisiológico que pode vir a ter conseqüências patológicas, onde se verifica a interação conjunta e efetiva dos três sistemas.

Situações de estresse estão associadas a diversas alterações na função imune (SANTOS, 2000). O eixo Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) tem participação efetiva nas respostas adaptativas do organismo às ações do meio ambiente (BOLAÑOS-JIMENEZ et al, 1995). É constituído por componentes neuroendócrinos centrais no encéfalo e hormonal periférico na adrenal (HERMAN et al., 1989). O eixo HPA pode ser assim regulado em diversos níveis do organismo. Alterações da atividade do eixo HPA têm sido descritas em diversas patologias como a Síndrome de Cushing, depressão melancólica, alcoolismo,

exercício físico excessivo, desnutrição, hipertireoidismo e anorexia nervosa (CHROUSOS & GOLD, 1992).

O estresse acarreta a ativação do hipotálamo, levando a liberação do hormônio Liberador de Corticotropina (CRH) que está presente em todo o cérebro, em maior concentração no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (CUMMINGS et al, 1983). O CRH é transportado através do sistema porta para a pituitária, onde estimula a produção dos produtos gênicos da pro-opimelanocortina como β -endorfina e hormônio adrenocorticotrópico (ACTH).

Outrossim, o CRH inibe funções vegetativas, como a alimentação e reprodução. Em animais, moderadas doses de CRH promovem efeitos comportamentais como redução da atenção e da vigília. Já as altas doses causam resposta exacerbada ao estímulo sensorial, adoção de postura estática, diminuição da exploração do ambiente extrafamiliar e aumento do medo durante o estímulo adverso (CHROUSOS & GOLD, 1992). O CRH causa a liberação pela pituitária do ACTH.

O ACTH circula sistemicamente e estimula a produção de corticóides pelo córtex adrenal. O ACTH é um pequeno peptídeo derivado da pro-opimelanocortina inicialmente encontrado na hipófise. Sabe-se hoje que o ACTH existe em áreas extrahipofisárias, inclusive em células associadas à resposta imune (OTTAVIANI, FRANCHINI & GENEDANI, 1999).

Os corticosteróides são os componentes periféricos do eixo HPA (CHROUSOS & GOLD, 1992). Assim, no homem, a estimulação do eixo HPA resulta no aumento da produção de cortisol e ativação do sistema simpático com aumento dos níveis de glicose no sangue; aumento da pressão sangüínea e dos batimentos cardíacos (CHROUSOS & GOLD, 1992). Os corticosteróides possuem efeitos sobre o metabolismo intermediário e sobre o metabolismo da água e dos eletrólitos (BONDY, 1985). Além disso, induz à promoção da gliconeogênese, aumento do catabolismo protéico, aumento dos níveis de glicose e insulina no plasma, aumento da gordura corporal e supressão da imunidade; contribui para a regulação da pressão sangüínea e do débito cardíaco (BONDY, 1985).

O cortisol, via receptores para glicorticóides (GR), inibe diretamente a produção de ACTH pela pituitária, e a produção hipotalâmica de CRH. Ademais, age sobre receptores de GR no hipocampo, resultando na inibição do sinal do hipocampo para o PVN, e diminui a produção de CRH por “feedback” negativo (HERMAN et al, 1989). Desta maneira, o cortisol promove “feedback” negativo do eixo HPA em três níveis, pituitário, hipotalâmico e hipocampal.

O sistema imune é considerado um alvo altamente sensível aos mediadores liberados pelo hipotálamo, hipófise e adrenais. Aliás, a idéia de uma relação entre os sistemas imune, nervoso e endócrino progrediu com os estudos experimentais sobre os efeitos imunológicos de uma variedade de estressores e da demonstração da presença de hormônios do eixo HPA, característicos da resposta ao estresse, em células do sistema imune (OTTAVIANI & FRANCESCHI, 1996).

O SI, o SN e o SE compartilham uma diversidade de mediadores endógenos e exógenos (BESEDOVSKY, et al, 1986; OTTAVIANI & FRANCESCHI, 1996) que têm por objetivo final a homeostase do organismo (BLALOCK, 1992). As citocinas podem agir nas células do sistema neuroendócrino modificando sua função. Em contrapartida, os hormônios agem nas células imunes induzindo-as a sintetizar neuropeptídeos ou neurotransmissores (BLALOCK, 1992; DE SIMONI, 1997).

Existem, segundo De Simoni (1997), três vias principais nas quais o sistema imune (SI), o sistema nervoso (SN) e o sistema Endócrino (SE) interagem: vias humoral, neural e endócrina.

Pela via humoral, aparecem as citocinas inflamatórias que são liberadas na circulação por monócitos e macrófagos ativados como parte da resposta do hospedeiro a agentes infecciosos (DE SIMONI, 1997). Assim, as citocinas, além de sua função clássica de comunicação dentro do SI (TAGA & KISHIMOTO, 1992), podem atuar no SN e no SE. As citocinas têm um forte efeito ativador sobre o eixo HPA induzindo a liberação do CRH (ANGIONI et al., 1993). Segundo Vizi (1998), as citocinas atuam no eixo HPA em todos os níveis.

Além das funções clássicas, as citocinas estão envolvidas em respostas biológicas fundamentais (por ex. resposta inflamatória, anafilaxia) e são potencialmente capazes de modular as interações entre o SI, SN e SE (IRWIN, 1999). Assim, a ativação de células imunes periféricas por uma variedade de agentes inflamatórios promove alteração neural com respostas fisiológicas e comportamentais conseqüentes, mediadas pelo SNC (MAIER et al, 1998).

Pela via neural, os nervos aferentes periféricos, estimulados por citocinas liberadas no local, podem servir como substrato anatômico na condução de mensagens do SI, da periferia para o SNC (WEIGENT & BLALOCK, 1987). A interação entre neurotransmissores e células imunes representa também outro mecanismo que media a comunicação bidirecional entre o SNC e o SI (WEIGENT & BLALOCK, 1987). A comunicação, dentro dos sistemas SNC e o SI e entre eles, é realizada através da interação de ligantes e seus receptores (DE

SIMONI, 1997). Diferentes tipos de células no SNC sintetizam e respondem as citocinas (DE SIMONI, 1997; IRWIN, 1999).

Pela via endócrina, a ação de vários hormônios pode alterar a resposta imune (BLALOCK, 1989, DUNN & WANG, 1995). A situação de estresse induz um desequilíbrio da neuroimunomodulação, ou seja, um fenômeno que envolve o sistema imune, nervoso central e endócrino (GALINOWSKI, 1993). Existem substâncias envolvidas nas reações de estresse e ansiedade, como adrenalina, acetilcolina, histamina, endorfina, ACTH, outros hormônios e neuropeptídeos que possuem receptores tanto em células do SI como no SE (BESEDOVSKY et al, 1986).

Dentre as células do sistema imune, os linfócitos são aquelas que mais se assemelham com uma célula neuroendócrina, apresentando em sua superfície receptores para peptídeos neuroendócrinos e hormônios hipotalâmicos, assim como também possuem a capacidade de produção de neuropeptídeos (BOCKMAN & KIRBY, 1984).

Os leucócitos humanos, durante a produção de interferon α (IFN- α), expressam em sua superfície peptídeos com particularidades antigênicas, características biológicas e estruturais relacionadas ao ACTH (BLALOCK, 1992). A ativação do eixo hipófise-adrenal pela IL-1 resulta em aumento na secreção de CRH (BESEDOVSKY et al, 1986). Já outros estudos revelaram que outras interleucinas (IL-2, IL-6 e TNF- α), também são capazes de elevar os níveis de ACTH no plasma e que também podem funcionar como neuromoduladores (KARANTH & McCANN, 1991; SCHÖBITZ et al, 1994). Vale a pena ressaltar que algumas citocinas parecem estimular a síntese e liberação de CRH por mecanismos ainda pouco conhecidos (SCHÖBITZ et al, 1994). Efeitos diretos e indiretos do CRH podem influenciar a susceptibilidade de um indivíduo a certas doenças auto-imunes, alérgicas, infecciosas ou neoplásicas (ELENKOV et al, 1999).

Influências do sistema nervoso regulam diretamente o sistema imune. Estudos clássicos, com lesões de hipotálamo e indução de imunossupressão, mostram redução importante das respostas celulares e humoral aos antígenos exógenos em animais (MULCHAHEY et al, 1999). Da mesma forma, a secreção de neurotransmissores modifica o processo inflamatório. Alterações induzidas experimentalmente no sistema nervoso alteram as funções imunes sistêmicas, sugerindo que a imunocompetência seja regulada centralmente através de uma série de mecanismos: cada hormônio secretado pela hipófise anterior está sob controle neuroendócrino do hipotálamo, sendo a secreção, alterada por diversos estímulos como sinais do ambiente externo, ritmo do sono e estresse físico e emocional (MULCHAHEY et al, 1999).

Pode-se verificar a presença e a atividade de peptídeos derivados da pro-opiomelanocortina (POMC), como o ACTH, β -endorfina e hormônio α -melanócito estimulante (α -MSH), bem como citocinas e óxido nítrico (NO) em diversas células imunológicas, entre elas, neutrófilos, monócitos e macrófagos. Além disto, a migração para os locais de inflamação e a ativação são processos celulares básicos destas células afetados e modulados por hormônios, opióides e citocinas (GAILLARD, 1994). Os próprios linfócitos podem responder ao fator liberador de corticotropina e gerar seu próprio ACTH que, por sua vez induz a liberação de corticosteróide (GAILLARD, 1994). Atualmente, se reconhece que além dos hormônios hipotalâmicos, hipofisários, adrenais, tireóideos e outros, interferem também no sistema imune (GAILLARD, 1994).

Assim, hormônios podem *a priori* ter ação direta ou indireta na resposta imune (GAILLARD, 1994). O exemplo mais convincente desta modulação é a ativação de secreção adrenocortical em resposta a estímulo inflamatório ou antigênico (GAILLARD, 1994). Ademais, a capacidade das células dos órgãos linfóides primários e secundários depende da ação do hormônio do crescimento (GC) e da prolactina (ANGIONI et al, 1993). O eixo HPA medeia a imunossupressão e serve como antagonista endócrino dos efeitos imunoestimulatórios do GC e da prolactina (ANGIONI et al, 1993). Outros hormônios, incluindo tiroxina e hormônios sexuais, têm efeitos imunorregulatórios (ANGIONI et al, 1993). Corticosteróides, endorfinas e encefalinas têm ações imunossupressivas e são liberados durante situações de estresse (ANGIONI et al, 1993).

Há muito se estabeleceu o papel imunossupressor dos corticosteróides (ANGIONI et al, 1993). Ignorava-se o fato de que, dependendo da concentração, eles podem estimular ou suprimir as funções imunológicas (BESEDOVSKY et al, 1986). Em situação de estresse físico ou emocional, os corticosteróides suprimem a produção de citocinas; contudo, em concentrações fisiológicas podem promover a produção e liberação de citocinas como IL-6 e TNF- α (BESEDOVSKY et al, 1986). Outro efeito dos corticosteróides é a indução do aumento de receptores para as citocinas (BESEDOVSKY et al, 1986; BOLAÑOS, MARIANO & BOROJEVIC, 1995).

Do exposto, depreende-se que o estresse causado por diversos fatores, na maioria das vezes de origem psicossocial, leva a sobrecarga da capacidade adaptativa humana e com isso causa efeitos imunossupressivos no organismo (CHROUSOS & GOLD, 1992; OTTAVIANI & FRANCESCHI, 1996). Esta afirmativa denota uma estreita relação entre os sistemas nervoso, imune e endócrino.

Além do estresse, outros fatores têm sido relacionados à alteração da resposta imune, entre estes, o estado nutricional. Sabe-se que a desnutrição proteico-calórica predispõe a infecções, principalmente por patógenos intracelulares, porém a base para esta predisposição ainda não está bem esclarecida (SACEDÓN, 1999). Além disso, a desnutrição proteico-calórica é um exemplo de deficiência nutricional que também acarreta prejuízo ao desenvolvimento do SN (CHANDRA, 1989; CHANDRA, 1997).

É imprescindível para a manutenção do crescimento de todos os sistemas orgânicos, um suprimento adequado de nutrientes assim como para o desenvolvimento de funções fisiológicas (BARONE, HARPER & WAPNIR 1998). Atuando sobre o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso, a deficiência nutricional é capaz de alterar o padrão dos eventos morfogenéticos que ocorrem nesta fase, com conseqüências deletérias para o desenvolvimento e aquisição de padrões fisiológicos maduros do organismo (PESSOA, 1997).

No SN, é bem estabelecido experimentalmente que a desnutrição provoca alterações estruturais, tais como: redução do número (CASTILHA, CRAVIOTO & CRAVIOTO, 1979) e alterações na forma dos neurônios (LEUBA e RABINOWICZ, 1979b); atraso no processo de mielinização (REDDY, DAS & SASTRY, 1979), e diminuição do peso cerebral (LEUBA e RABINOWICZ, 1979a; DOBBING, 1970). Alterações metabólicas são também referidas, a exemplo, dentre outras, da diminuição dos níveis séricos de glicose e corticosteróides, com redução da capacidade funcional da proteína ligante do colesterol (BOXWELL, AYSON & RAMENOFISKY, 1995).

Há várias evidências em relação à fisiologia do SN de ratos submetidos à desnutrição pré ou pós-natal, demonstrando retardo na ontogenia dos reflexos (SMART & DOBBING, 1971a, atraso na maturação de características físicas (SMART e DOBBING, 1971b; HISATOMI & NIYAMA, 1980) e na evolução de padrões locomotores (LYNCH, SMART & DOBBING, 1975). Os padrões de propagação do fenômeno da depressão alastrante cortical mostram-se alterados em ratos desnutridos durante o período de desenvolvimento do SN (GUEDES, ANDRADE & CABRAL-FILHO, 1987(a); ROCHA-DE-MELO & GUEDES, 1997). Em humanos, privações nutricionais, dependendo da fase em que ocorram, de sua duração e severidade, podem levar a graus variados de prejuízos no crescimento corporal, a disfunções comportamentais (DOBBING, 1985), e a deficiências na aquisição de habilidades, entre estas a de aprendizagem (BROWN e POLLIT, 1996; IVANOVIC et al, 1996). É digna de nota a escassez de estudos sobre as conseqüências da

desnutrição precoce sobre o desenvolvimento normal da resposta imune; sobretudo, as consequências das alterações do SN sobre a função do sistema imunológico.

Os nutrientes possuem um importante papel no desenvolvimento e na função das células que participam da resposta imunológica (MARCOS, 1997; KAWAKAMI et al., 1999). Logo, prejuízos na imunocompetência podem ser um importante fator causal no aumento da susceptibilidade de indivíduos desnutridos às doenças infecciosas (LEHMANN, 1991; TESHIMA et al., 1992).

Todavia, são poucos os estudos sobre os efeitos da desnutrição precoce e/ou do estresse agudo sobre aspectos da resposta imunitária em adultos.

1.2 Justificativa

Diversos estudos mostram que agressão nutricional altera a fisiologia normal de vários sistemas e órgãos (DOBBING, 1970; CHANDRA, 1997; BARRETO-MEDEIROS et al., 2003). O presente estudo tem em vista, avaliar aspectos da resposta imune em ratos submetidos à desnutrição neonatal, utilizando para isso um modelo de dieta empregado (que procura reproduzir a desnutrição observada em populações humanas) em diversos estudos realizados no Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, a Dieta Básica Regional (DBR). Além disso, este trabalho será a continuação dos estudos publicados (SANTOS, 2000) e desenvolvidos pelos Laboratórios de Fisiologia da Nutrição Naide Teodósio e de Imunopatologia Keiso Asami. Assim, serão estudados os efeitos do estresse psicológico ou orgânico em aspectos da resposta imune inespecífica e específica. Será estudado também o papel das adrenais nas repostas adaptativas ao estresse particularmente no animal desnutrido. Os resultados deste trabalho poderão auxiliar o estudo e compreensão de seqüelas, sobre o sistema imunológico, de desnutrição sofrida no período de crescimento rápido do encéfalo e das repostas adaptativas ao estresse agudo, envolvendo ou não hormônios adrenais. O conhecimento das repostas de adaptação e da resposta imune em organismos precocemente desnutridos (de grande prevalência em nossa região) poderá permitir a definição de estratégias mais adequadas para o tratamento das sobrecargas ocasionadas por estresse e por infecções nesses indivíduos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Geral

- ❖ Estudar a resposta imunitária em ratos adultos, nutridos e desnutridos durante o período neonatal, submetidos ou não a diferentes tipos de estresse.

1.3.2 Específicos

- ❖ Observar alterações qualitativas e quantitativas nas séries vermelha e branca do sangue;
- ❖ Avaliar a produção de anticorpos em resposta à imunização com hemácias de carneiro em animais nutridos e desnutridos;
- ❖ Estudar as possíveis alterações dos níveis de corticosteróides em animais nutridos e desnutridos submetidos a diferentes efeitos dos estresses.

1.4 Hipóteses

A desnutrição durante o período de crescimento rápido do encéfalo (período neonatal) após longo período de recuperação, causa em ratos adultos:

- ❖ Alteração da resposta imune celular;
- ❖ Redução da resposta imune humoral;
- ❖ Alteração da imunidade celular e humoral em resposta aos diferentes tipos de estresse;
- ❖ Alteração dos níveis de corticosteróides

O estresse psicológico, estresse biológico (LPS):

- ❖ Possíveis alterações qualitativas e quantitativas no leucograma.

A adrenalectomia:

- ❖ Alteração no padrão leucocitário;
- ❖ Alteração de aspectos da resposta imune.

2 METODOLOGIA

2.1 Animais

Foram utilizados ratos, albinos, machos da linhagem Wistar, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos no biotério sob temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas (claro - 6 às 18h; escuro - 18 às 6h), recebendo “*ad libitum*” as respectivas rações e a água.

2.2 Grupos experimentais

2.2.1 Segundo a manipulação nutricional

Para obtenção dos animais experimentais, após o nascimento, o número de filhotes por mãe foi padronizado em seis, reduzindo-se as proles ou acrescentando-lhes animais da mesma idade, provenientes de outras ninhadas. Em seguida, segundo o regime dietético empregado, foram obtidos grupos:

Nutrido (N): constituídos por mães e filhotes que receberam dieta padrão do biotério (LABINA - Purina do Brasil S.A.) durante toda a vida. Esta dieta apresenta os elementos necessários aos requerimentos nutricionais do rato (quadro 1).

Desnutrido (D): formados por ratos aleitados por mães submetidas à dieta nutricionalmente deficiente (vide abaixo item sobre Dieta Básica Regional), durante o período de lactação, aproximadamente 24 dias pós-natais. Após o desmame, as mães foram sacrificadas e seus filhotes receberam a dieta padrão do biotério (LABINA) até o sacrifício.

2.2.2 Emprego da Dieta Básica Regional na obtenção de desnutridos

A Dieta Básica Regional (DBR) é uma dieta desenvolvida no Departamento de Nutrição da UFPE, baseada em dados de inquéritos nutricionais realizados em Pernambuco, a partir de amplo estudo realizado na década de 70 (COUTINHO, 1976).

Neste estudo, foram determinados e quantificados os alimentos mais consumidos pela população da região em foco. Esses alimentos foram então utilizados para confecção da DBR (quadro 2). Os efeitos da DBR em ratos refletem as alterações características da desnutrição (ANDRADE, 1998; TEODÓSIO, 1990), sinais e sintomas observados na década de setenta em crianças nas comunidades carentes da Zona da Mata de Pernambuco (COUTINHO, 1976).

2.2.3 Segundo a presença ou não das adrenais

Aos 90 dias de idade, animais nutridos ou desnutridos foram submetidos ou não a adrenalectomia. Para adrenalectomia, os animais foram anestesiados, sendo em seguida realizados os procedimentos necessários para retirada das duas adrenais. Após a cirurgia, os animais foram mantidos por 07 dias em gaiolas individuais no biotério sob temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas (claro - 6 às 18h; escuro - 18 às 6h), recebendo dieta controle e solução salina *ad libitum*.



Fig.1. Material para anestesia (Ketalar)



Fig. 2. Instrumental cirúrgico



Fig. 3. Assepsia



Fig. 4. Adrenalectomia



Fig. 5. Adrenal

2.2.4 Segundo o estado fisiológico

Entre 90 e 120 dias de idade, animais nutridos ou desnutridos foram submetidos ou não a mudanças do estado fisiológico.

2.2.5 Estresse psicológico (E)

Para obtenção dos subgrupos estressados por contenção, animais foram colocados em cilindros de plástico PVC, onde permaneceram imobilizados durante 40 minutos.

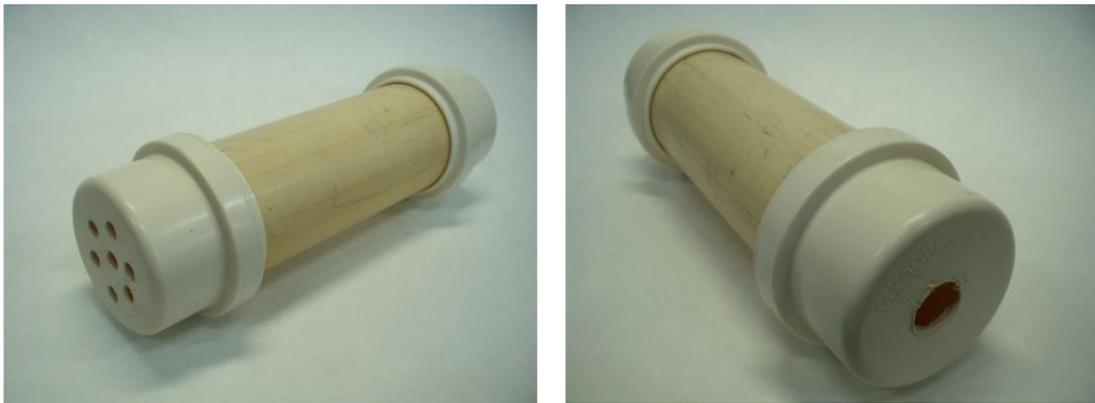


Fig. 6. Cilindro de PVC

2.2.6 Estresse orgânico (LPS)

2.2.6.1 Ativação da resposta inflamatória por estímulo com LPS

Para obtenção dos subgrupos cuja resposta imune foi ativada por Lipopolissacarídeo (LPS). Animais foram 24 horas antes dos estudos realizados, injetados com LPS, por via intraperitoneal, na dose de 1mg/ kg de peso corporal.

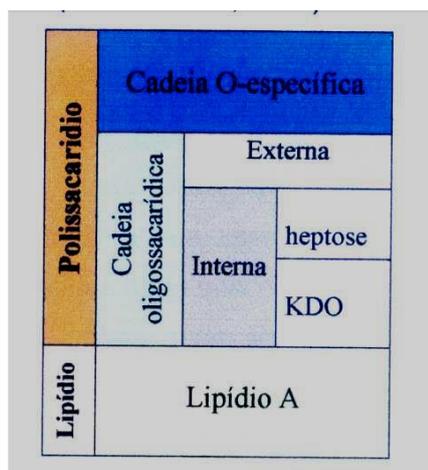


Fig. 7. Estrutura do LPS está ligado à membrana externa de bactérias Gram negativas através do lipídio A. Modificado de RIETSCHER, 1992

2.2.6.2 Constituição final dos grupos

Dessa forma, ao final dos procedimentos supracitados, obtiveram-se os seguintes grupos experimentais que foram utilizados nos diversos estudos abaixo descritos:

- ◆ Nutrido (N);
- ◆ Nutrido Estressado (NE);
- ◆ Nutrido LPS (N-LPS);
- ◆ Nutrido Adrenalectomizado (NA);
- ◆ Desnutrido (D);
- ◆ Desnutrido Estressado (DE);
- ◆ Desnutrido LPS (D-LPS);
- ◆ Desnutrido Adrenalectomizado (DA).

Quadro 1. Composição da dieta “Labina”, usada na alimentação dos animais nutridos (N) e níveis de garantia

Composição Básica: milho, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de carne, farelo de arroz cru, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, sal, pré-mix.	
Enriquecimento por Kg de ração	
Vitamina A	20.000 UI
Vitamina D3	6.000 UI
Vitamina E	30 UI
Vitamina K	6 mg
Vitamina B12	10 mcg
Vitamina B2	8 mg
Pantotenato de cálcio	24 mg
Niacina	95 mg
Tiamina	4 mg
Colina	2.000 mg
Piridoxina	6 mg
Biotina	0,1mg
Ácido Fólico	0,5 mg
Manganês	50 mg
Iodo	2 mg
Ferro	65 mg
Zinco	35 mg
Cobre	26 mg
Antioxidante	100 mg
Níveis de garantia	
Umidade (máx)	13,0 %
Proteína (mín)	23,0 %
Extrato Etéreo (mín)	2,5 %
Matéria Fibrosa (máx)	9,0 %
Matéria Mineral (máx)	8,0 %
Cálcio (máx)	1,8 %
Fósforo (mín)	0,0 %

Fonte: Purina do Brasil Ltda®

Quadro 2. Composição centesimal da “Dieta Básica Regional” (DBR) usada nos grupos desnutridos (D).

Composição Centesimal							
Ingredientes	g %	Proteínas	Carboidratos	Lipídios	Cinzas	Fibras	Kcal %
Feijão Mulatinho ^a	18,34	3,99	10,66	0,24	0,57	1,09	60,76
Farinha de Mandioca	4,81	0,84	48,59	0,12	0,43	5,64	198,80
Carne de Charque ^a	3,74	2,74	-	0,06	0,06	-	11,50
Gordura (da charque)	0,35	-	-	0,35	-	-	3,15
Batata Doce ^a	12,76	0,30	9,99	0,03	0,20	0,48	41,43
Total	00,00	7,87	69,24	0,80	1,26	7,21	315,64

a = cozido, seco e moído

Fonte: Teodósio et al., 1990

Kcal = Kilocalorias

2.3 Estudos

2.3.1 Da evolução ponderal

O peso corporal dos animais foi aferido diariamente do primeiro dia de vida até o final do período de aleitamento (24 dias). Após o desmame, os animais foram pesados nos dias de experimento. Para isso, foi utilizada balança eletrônica com capacidade para 4 Kg (Marte, modelo S-1000).

2.3.2 Da determinação dos níveis corticosterona séricos

Amostras de sangue dos animais nutridos e desnutridos foram coletadas em tubos. As amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 15 minutos, e os sobrenadantes foram removidos e estocados a -20°C até os ensaios para corticosterona. Os níveis séricos de corticosterona após sua extração com etil acetato foram quantificados usando o “the corticosterone kit, 1235 Auto DELFIA™ automatic immunoassay system (EG&G WALLAC)”.

2.3.3 Dos parâmetros hematológicos

Para coleta de sangue, animais dos diferentes grupos entre 90 e 120 dias de idade foram individualmente colocados em câmara de aquecimento a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 10 minutos. O aquecimento visou à obtenção de vasodilatação no animal, facilitando assim a coleta do sangue. O sangue foi obtido imediatamente depois de retirada do animal da câmara, realizando-se um pequeno corte com bisturi na extremidade de sua cauda, estando o mesmo sob contenção.

As amostras de sangue então coletadas, foram distribuídas em tubos. Para determinações de índices hematimétricos tais como: hemoglobina, hematócrito e número total de hemácias e do leucograma (contagens total e diferencial de leucócitos), foi extraído 0,5 ml de sangue e depositado em tubo de 5 ml que foi previamente acrescido de uma gota (20 μl) de anticoagulante (EDTA - ácido etileno diamino tetra acético a 3%). Para realização de teste de hemoaglutinação, foi coletado 1 ml de sangue. Abaixo serão descritos os procedimentos específicos para cada determinação e para o teste.

2.3.4 Determinação de Hemoglobina

Para a determinação dos valores de hemoglobina foi utilizado o método da cianometemoglobina. O princípio da técnica consiste em: 1) extrusão da hemoglobina através da lise dos eritrócitos com solução hipotônica; 2) formação do produto colorido cianometemoglobina, a partir da reação da hemoglobina com cianetos. A concentração da cianometemoglobina é proporcional a presença de hemoglobina e proporcional a intensidade de sua cor (alaranjado), esta podendo ser medida por espectrofotometria.

Assim, imediatamente após a coleta, foram retiradas amostras de 20 μl de sangue em duplicata para a dosagem de hemoglobina. Cada amostra de sangue foi colocada em tubo âmbar já contendo 5 ml da solução reagente (constituída de 9,43 mmoles de bicarbonato de sódio; 0,77 mmoles de cianureto de potássio; 0,61 mmoles de ferricianeto de potássio). O composto formado foi homogeneizado e, posteriormente, mantido em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos para permitir a formação de cianometemoglobina. Em seguida, foram realizadas as leituras de absorbância (DO) das amostras em espectrofotômetro Beckman DU-62, com filtro de 540 nm.

A curva de calibração foi obtida através de dosagens sangüíneas utilizando-se 04 diferentes concentrações (5; 10; 12.5; 25 %) do padrão de hemoglobina comercial (contendo 10 g/dl de HiCN, 500 mg/dl de cianeto de potássio e derivados de sangue humano). A análise

foi realizada em triplicata, colocando-se 5 ml de cianeto em todos os tubos e 10, 20, 25 e 50µl do padrão em cada três tubos âmbar, respectivamente, sendo um reservado para o branco (apenas solução de cianeto). Em seguida, fez-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540nm. Foi construído um gráfico com os valores obtidos por absorbância, e os previstos a partir dos resultados.

A partir dos resultados encontrados na curva de calibração, foi calculado o fator de calibração (FC) através da seguinte fórmula:

$$FC = \frac{\text{Concentração do padrão}}{\text{Densidade óptica do padrão}}$$

A concentração utilizada para o cálculo do FC dependia da alíquota escolhida para determinação dos valores de hemoglobina.

Assim, a concentração de hemoglobina (Hb) em g/100ml foi obtida aplicando-se a seguinte fórmula: Hb= DO da amostra x FC.

2.3.5 Determinação de Hematócrito

Os valores de hematócrito foram determinados pela técnica de microhematócrito. Esta consistiu em determinar, em percentagem, a concentração de eritrócitos em um determinado volume de sangue não coagulado, mediante centrifugação em tubo microcapilar *Terumo Corporation®*.

O tubo microcapilar consistia de um cilindro de vidro, contendo heparina, de 75 mm de comprimento e aproximadamente 1,65 mm de diâmetro, apresentando uma marca aos 55mm de uma das extremidades.

Procedeu-se desse modo: na amostra de sangue com anticoagulante foi introduzida uma das extremidades do tubo microcapilar, estando esse inclinado. O sangue então fluía por gravidade para dentro do referido tubo até atingir sua marca. Em seguida, com o dedo indicador, o microcapilar foi fechado para que o sangue não escoasse e, imediatamente após, a outra extremidade do tubo era selada com massa de modelar. O microcapilar contendo o sangue ficou em repouso por alguns minutos até que foi observada a separação do soro e das células vermelhas. Posteriormente, o microcapilar foi centrifugado em centrífuga para microhematócrito (Micro-capillary centrifuge, modelo MB - IEC) à velocidade de 3000 rpm durante 4 minutos.

O valor do hematócrito (porcentagem de células vermelhas no sangue) foi obtido em leitor de microcapilar (*International Microcapillary Reader - IEC*)

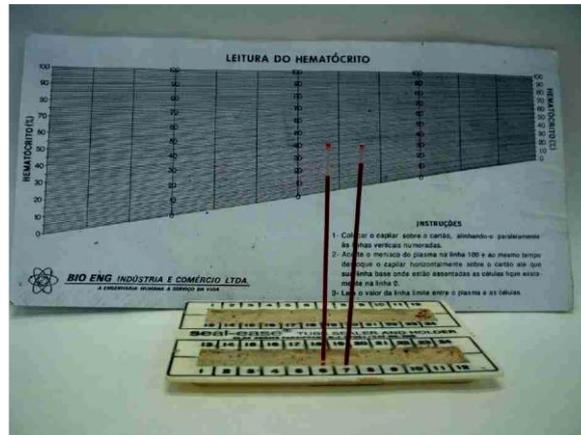


Fig. 8. *Micro-hematócrito*

2.3.6 Contagem total de hemácias

Consistiu na determinação do número de hemácias por 1mm^3 de sangue. Para isso, o sangue foi diluído com um líquido diluidor isotônico contendo um fixador para conservação da forma celular. A densidade apropriada impede a sedimentação rápida das hemácias.

Para a contagem de hemácias, foi usada uma solução de PBS (Tampão fosfato de sódio) a 0,1M com $\text{pH}=7.02$ para manter a integridade das hemácias e, ao mesmo tempo, possibilitar a diluição para quantificação das mesmas.

As hemácias foram contadas à microscopia (Microscópio óptico, utilizando-se uma lente de aumento de 40x) em amostra de sangue cuidadosamente diluída: sangue em PBS a 0,1M com $\text{pH}=7.02$, na proporção de 1:200 em uma câmara de volume conhecido (hemocitômetro ou Câmara de Neubauer).

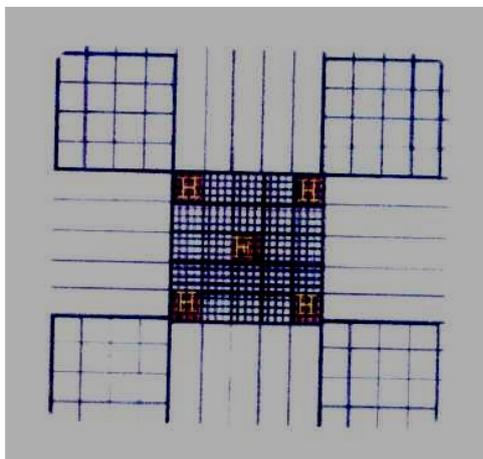


Fig. 9. *Campos utilizados para contagem de hemácias (H)*

Para o cálculo foi utilizada a seguinte fórmula: $hm \times 5 \times 200 \times 10$, onde:

Hm = número total de hemácias contadas (em $1/5$ de mm^2)

5 = fator de conversão para $1 mm^2$

200 = fator de conversão da diluição utilizada

10 = fator de conversão para $1mm^3$ (profundidade da lâmina)

O resultado foi obtido em número de células / ml de sangue.

2.3.7 Contagem total de leucócitos

Para contagem dos leucócitos, foi utilizada uma solução de ácido acético a 3% (solução de TURK), diluidora de leucócitos. A solução de TURK possui a propriedade de destruir os eritrócitos e corar ligeiramente o núcleo dos leucócitos.

Utilizando amostras de sangue cuidadosamente diluídas em solução de Turk (1:20), os leucócitos foram contados em uma câmara de volume conhecido (hemocítmetro ou Câmara de Neubauer) com auxílio do microscópio óptico (sob lente 40x de aumento). Em seguida, fez-se a contagem de todos os leucócitos encontrados nos quadros marcados pela letra "L" na figura relativa ao hemocítmetro.

O resultado foi obtido utilizando-se a seguinte fórmula:

Leucócitos / mm^3 de sangue =

$$\text{Onde: } \frac{Lc. \times 20 \times 10}{4}$$

Lc = número total de leucócitos contados em 4 de mm^2

4 = fator de conversão para $1 mm^3$

20 = fator de conversão da diluição utilizada

10 = fator de conversão para $1mm^3$ (profundidade da lâmina)

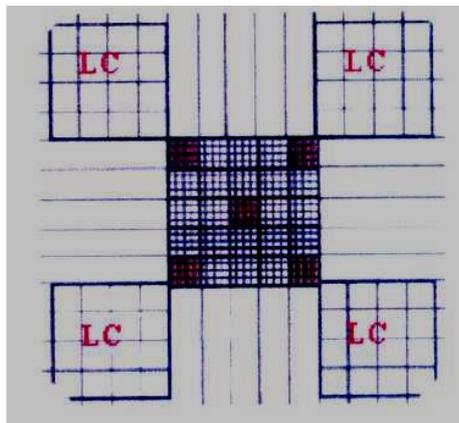


Fig. 10. Campos utilizados para contagem de leucócitos no sangue

2.3.8 Contagem diferencial de leucócitos

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada, utilizando-se a técnica do esfregaço sangüíneo. Esta técnica permite que os elementos celulares do sangue, espalhados em camada única sobre a superfície de uma lâmina, quando fixados e tratados por corantes especiais, adquiram morfologia e coloração adequadas para o estudo microscópico detalhado e preciso.

O esfregaço, uma película uniforme de sangue sobre a superfície da lâmina, foi obtida para estudo. Para isto, em um único movimento, espalhava-se uma pequena gota de sangue, colocada sobre a superfície de uma das extremidades de uma lâmina, com o auxílio de uma outra, inclinada 45⁰ em relação à primeira.

Para a coloração do esfregaço foi utilizado o kit Panótico Rápido LB – Laborclin Ltda. Este constitui um sistema de coloração diferencial dos elementos figurados do sangue, onde as estruturas celulares se coram nos mais diversos nuances entre o vermelho e o azul, permitindo a identificação e a diferenciação entre elas. O kit consiste de uma solução fixadora e duas soluções corantes.

Depois de seca, a lâmina foi examinada ao Microscópio óptico com objetiva de 100x por imersão.

A leitura fez-se com o esfregaço pela contagem de cem células, faziam-se movimentos de zigue-zague sobre a lâmina num único sentido. Os diferentes elementos foram contabilizados através da utilização de um contador eletrônico da marca Kacil com teclas correspondentes a cada tipo de célula. A partir dos dados obtidos foram calculados os valores absolutos e relativos para cada tipo de célula.

2.3.9 Da resposta imune humoral

Para indução da Resposta Imune Humoral (RIH), animais dos diferentes grupos entre 90 e 120 dias de idade foram individualmente inoculados com hemácias de carneiro (HC). Foram estudados os títulos de anticorpos por avaliação da hemoaglutinação.

Para obtenção das HC, o sangue extraído de carneiro foi misturado com solução de Alsever na proporção de 1:1. Conservado em temperatura variando entre 4⁰C e 8⁰C, esta mistura pode ser usada uma semana após preparo. Este período foi necessário para a estabilização das hemácias. No dia da inoculação, as HC foram lavadas com PBS 0,1M e centrifugadas (3000rpm por 10 minutos). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuscitado. Esse processo foi repetido três vezes. Ao final,

o precipitado (as hemácias) foi ressuspenso com 1 ml de PBS. Em seguida, essa suspensão de hemácias foi diluída com a finalidade de se obter 10^8 células/ ml.

Antes de inocular o preparado de HC, foi retirada do animal uma amostra de sangue para o controle negativo na verificação dos títulos de anticorpos produzidos. Em seguida, 0.5 ml do preparado de HC foi inoculado no animal por via intraperitoneal. Após três e sete dias da imunização com HC, foi coletada nova amostra de 1 ml de sangue do animal. Este sangue ficou em repouso até formação de coágulo, sendo então centrifugado (3000 rpm por 10 minutos) para obtenção do soro. Esse ficou 30 minutos à 56°C para inativação do complemento. Imediatamente após esse processo, o soro foi armazenado a -20°C .

Para avaliação da hemoaglutinação, os soros foram descongelados e imediatamente utilizados. Foram usadas placas contendo fileiras de oito poços. Nas fileiras, com exceção da primeira utilizada para controle negativo, foram colocados soros dos animais dos grupos estudados. O soro de cada animal foi colocado em 8 diferentes diluições (títulos) em PBS + gelatina, de 1:8 até 1:1124. Cada animal apresentou na placa três fileiras de diluições contendo respectivamente o soro antes, 3 e 7 dias depois da inoculação de HC. Em seguida, foram colocados em todos os poços $25\mu\text{l}$ da suspensão de hemácias de carneiro preparadas com uma contagem de 10^8 células/ ml, obtinha-se um volume final de $50\mu\text{l}$ por poço.

Após cerca de 03 horas em temperatura ambiente, foi observado o resultado da hemoaglutinação que representava os títulos de anticorpos anti-HC, formados a partir da estimulação antigênica sofrida pelos ratos dos diferentes grupos. Na interpretação dos resultados a hemoaglutinação foi caracterizada pelo aspecto uniformemente turvo do líquido, enquanto que a sua ausência foi evidenciada pela sedimentação dos glóbulos sob a forma de um ponto, no fundo de cada poço da placa.

O resultado foi obtido por títulos, sendo este dado pela maior diluição do soro onde houve hemoaglutinação. Para isso, na leitura das reações foi registrado o título máximo do soro que apresentou aglutinação nítida.

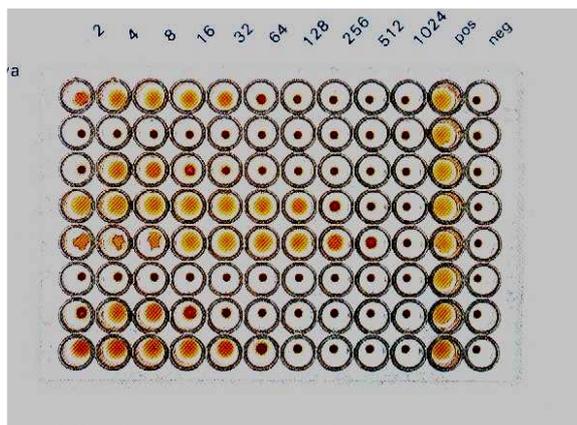


Fig. 11. Placa de hemoaglutinação

2.4 Análise Estatística

Para os dados paramétricos, na comparação entre dois grupos foi empregado o teste t de Student, na comparação entre mais de dois grupos, foi empregado à análise de variância (ANOVA). Quando a ANOVA revelou diferença significativa, foi utilizado o teste de Tukey para identificar as diferenças entre os grupos. Para os dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunnett. A significância estatística foi considerada, admitindo-se um nível crítico de 5%, em todos os casos.

3 RESULTADOS

3.1 Estudo da repercussão ponderal

- ◆ *Efeito da desnutrição no período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados.*

Os valores do peso corporal (Kg) quando comparado entre os grupos Nutrido Controle (NC; $244,4 \pm 7,291$) e Desnutrido Controle (DC; $229,16 \pm 5,408$) no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida recuperado não apresentaram diferenças.

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais nutridos.*

Os valores do peso corporal (Kg) quando comparado ao grupo nutrido controle (NC; $244,4 \pm 7,291$) foram menores no grupo nutrido LPS (N-LPS; $212,0 \pm 2,946$) e no grupo nutrido adrenalectomizado (NA; $187,7 \pm 3,211$), entretanto não houve diferença no grupo nutrido estresse (NE; $249,8 \pm 8,293$) (Gráfico 1).

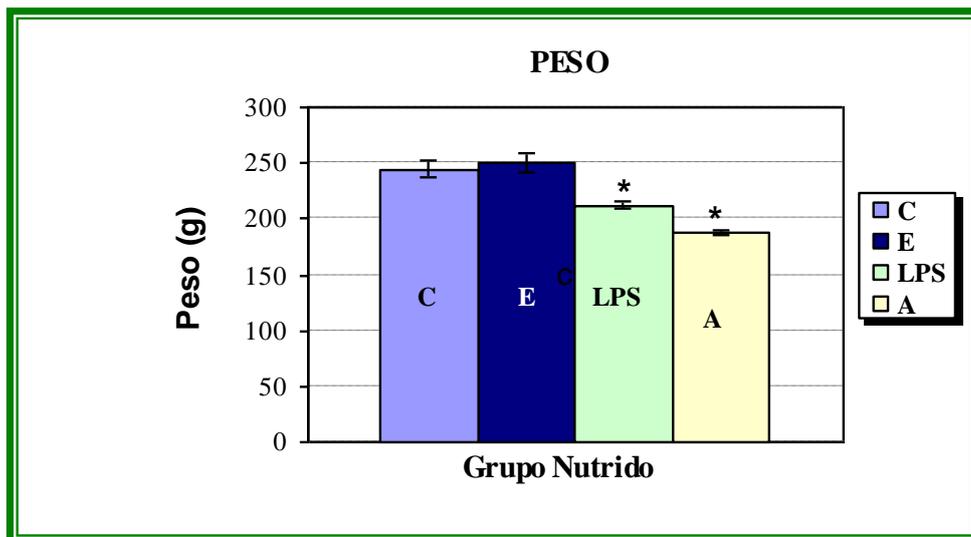


Gráfico 1 – Peso dos ratos adultos nutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8). O peso foi aferido entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxLPS e * = CxA.

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais desnutridos no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados.*

Os valores do peso corporal (Kg) quando comparados aos do grupo desnutrido controle (DC; $229,1 \pm 5,408$) foi menor no grupo desnutrido adrenalectomizado (DA; $171,4 \pm 5,628$), porém não houve diferenças em relação aos grupos desnutridos estresse (DE; $244,9 \pm 5,69$) e desnutrido LPS (D-LPS; $245,3 \pm 4,198$) (Gráfico 2).

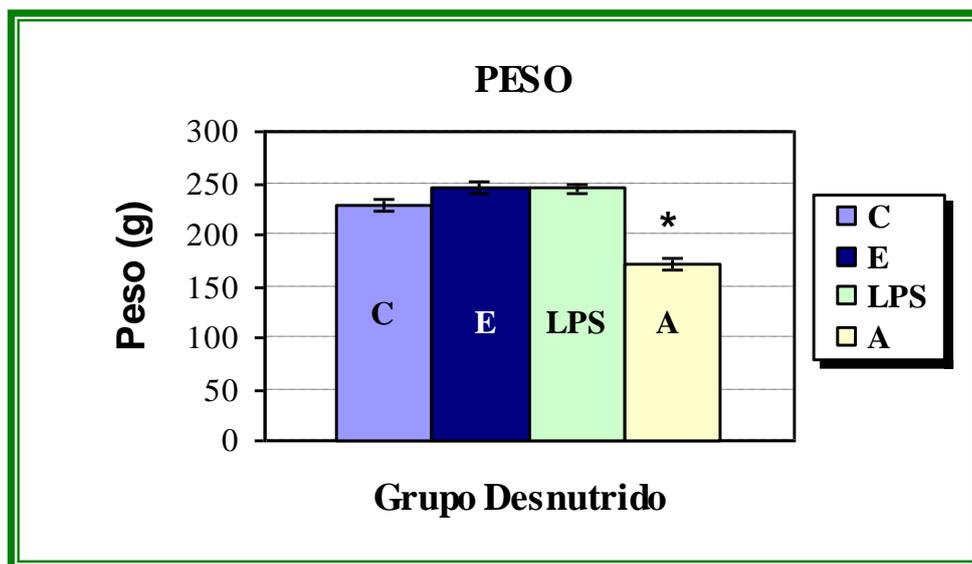


Gráfico 2. *Peso dos ratos adultos desnutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8) no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados. O peso foi aferido entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxA.*

3.2 Estudo da série vermelha

Os resultados do número total de hemácias (n° de células $\times 10^6/\text{mm}^3$), valor de hemoglobina (g/dl) e hematócrito ($\%/\text{mm}^3$) foram expressos em média \pm EP.

3.2.1 Hemácias

- ◆ *Efeito da desnutrição no período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre o número de Hemácias (n° de células $\times 10^6/\text{mm}^3$)*

Os valores do número de hemácias foram menores no grupo desnutrido (DC; $6,998 \pm 0,287$) em comparação com o nutrido (NC; $8,110 \pm 0,141$).

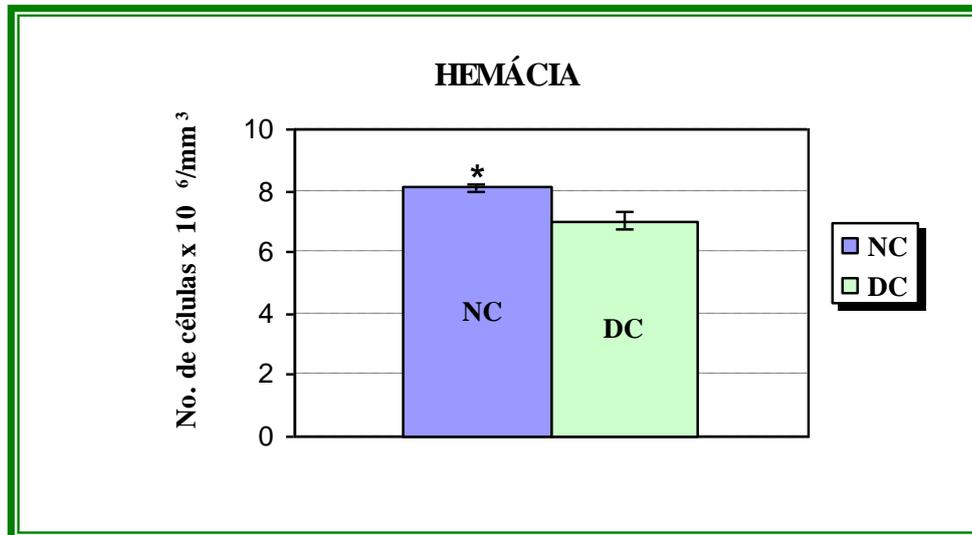


Gráfico 3. Número de hemácias obtidas de ratos adultos nutridos (NC, $n=8$) e desnutridos (DC, $n=8$), durante o período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso e nutricionalmente recuperado. Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Nas comparações entre os grupos foi utilizado Teste *t* de student, * $p < 0,005$.

- ♦ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais nutridos sobre o número de Hemácias (n° de células $\times 10^6/\text{mm}^3$)*

Em relação ao número de hemácias, quando comparados ao grupo nutrido controle (NC; $8,110 \pm 0,141$), foi menor no grupo nutrido foi menor estresse (NE; $7,485 \pm 0,177$), no grupo nutrido adrenalectomizado (NA; $5,590 \pm 0,0992$), entretanto não apresentou diferença no grupo nutrido LPS (N-LPS; $7,704 \pm 0,121$) (Gráfico 4).

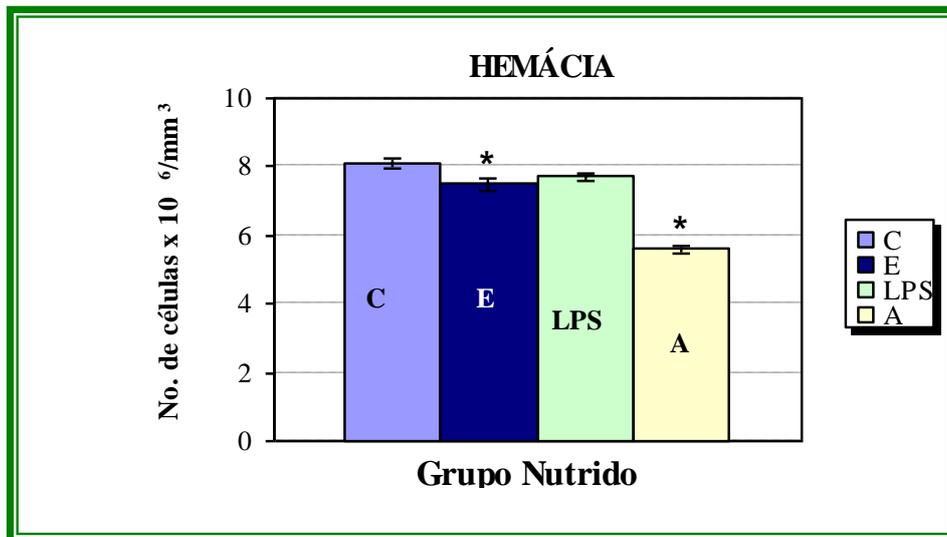


Gráfico 4. Número de hemácias em ratos adultos nutridos (C, $n=8$; E, $n=8$; LPS, $n=8$; A, $n=8$). Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxLPS, * = CxA.

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais desnutridos no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre o número de Hemácias (n° de células $\times 10^6/\text{mm}^3$).*

Quanto ao número de hemácias, quando comparados ao grupo desnutrido controle (DC; $6,998 \pm 0,287$), houve maior número nos grupos desnutrido estresse (DE; $7,384 \pm 0,128$), menor numero no grupo desnutrido adrenalectomizado (DA; $5,932 \pm 0,143$), entretanto não apresentou diferença no desnutrido LPS (D-LPS; $6,904 \pm 0,173$) (Gráfico 5).

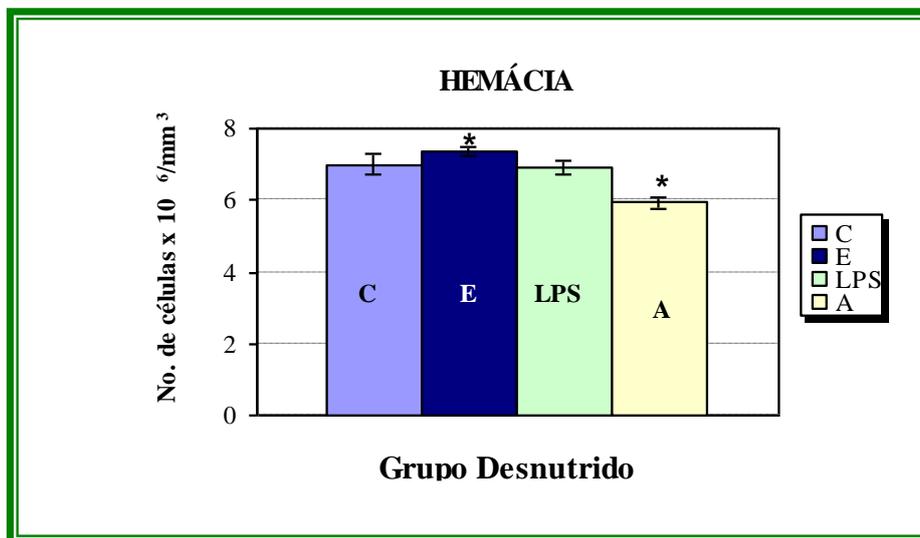


Gráfico 5 - Número de hemácias em ratos adultos desnutridos (C, $n=8$; E, $n=8$; LPS, $n=8$; A, $n=8$) no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados. Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxLPS, * = CxA.

3.2.2. Hemoglobina (g /dl)

- ◆ *Efeito da desnutrição no período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre os valores de Hemoglobina (g /dl).*

Os valores de hemoglobina, quando comparados entre os grupos nutridos (NC; $13,285 \pm 0,122$) e (DC; $13,216 \pm 0,295$) não apresentaram diferença.

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais nutridos sobre os valores de Hemoglobina (g /dl).*

Em relação aos valores da hemoglobina, quando comparados ao grupo nutrido controle (NC; $13,285 \pm 0,122$), não houve diferença com os grupos nutrido estresse (NE; $13,728 \pm 0,330$) e nutrido LPS (N-LPS; $14,104 \pm 0,265$), entretanto foram menores no grupo nutrido adrenalectomizado (NA; $7,389 \pm 0,403$), (Gráfico 6).

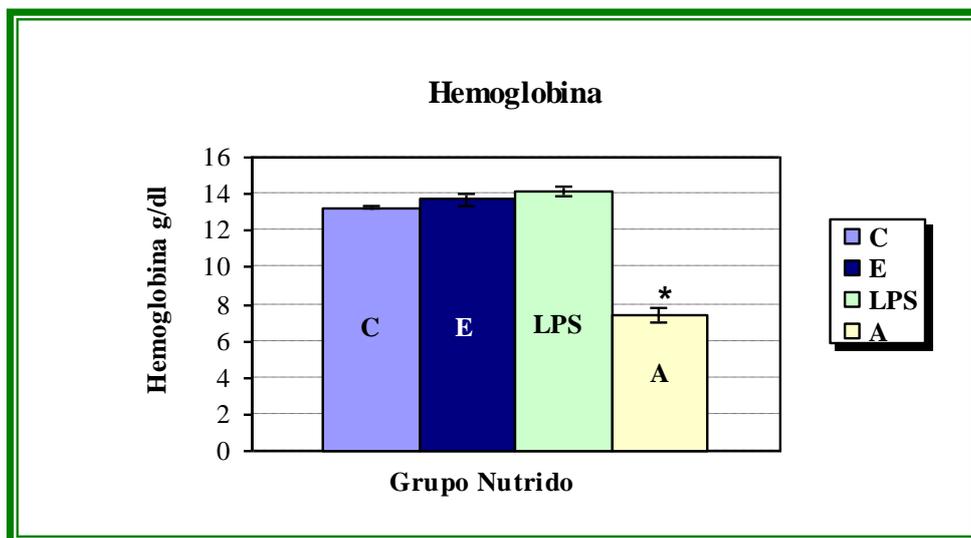


Gráfico 6 – Os valores de hemoglobina em ratos adultos nutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8). Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de 7Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxA.

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais desnutridos no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre os valores de Hemoglobina (g/dl)*

Os valores de hemoglobina, quando comparados ao do grupo desnutrido controle (DC; $13,216 \pm 0,295$), não apresentaram diferenças em relação aos grupos desnutrido estresse (DE; $13,216 \pm 0,295$) e desnutrido LPS (D-LPS; $13,223 \pm 0,257$), entretanto foram menores quando comparados aos do grupo desnutrido adrenalectomizado (DA; $7,470 \pm 1,124$) (Gráfico 7).

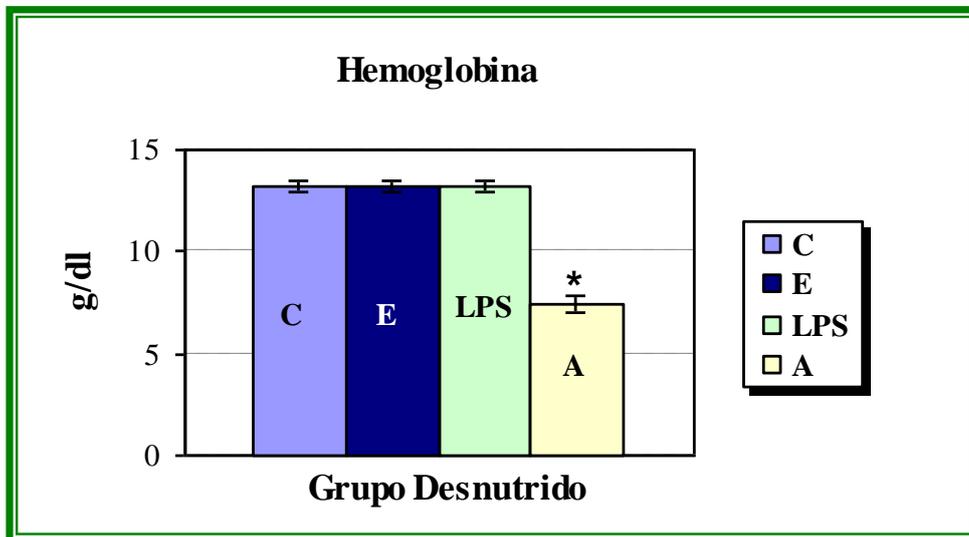


Gráfico 7 - Os valores de hemoglobina em ratos adultos desnutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8) no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados. Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxA.

3.2.3 Hematócrito (%mm³)

- ◆ *Efeito da desnutrição no período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre os valores de Hematócrito (g/dl)*

Os valores de hematócrito, quando comparados o grupo nutrido (NC; 47,800 ± 0,826) foi maior do que grupo desnutrido (DC; 43,275 ± 0,397).

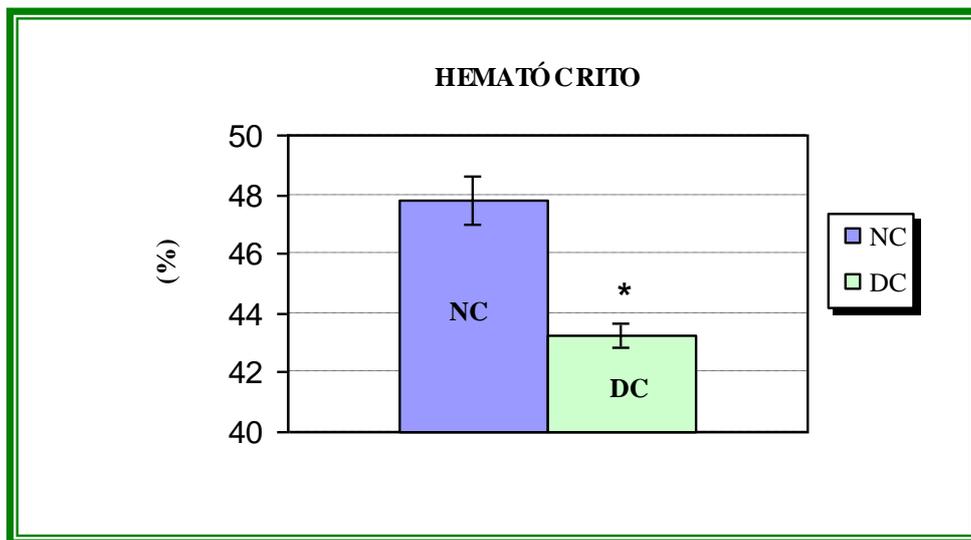


Gráfico 8 – Valores de hematócrito obtidos em ratos adultos nutridos (NC, n= 8) e desnutridos (DC, n=8), durante o período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso e nutricionalmente recuperado. Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Nas comparações entre os grupos foi utilizado Teste t de student, * $p < 0,005$.

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico ou da adrenalectomia em animais nutridos sobre os valores de Hematócrito ($\%/mm^3$)*

Os valores de hematócrito quando comparados ao do grupo nutrido controle (NC; $47,800 \pm 0,826$), foi maior no grupo nutrido LPS (N-LPS; $49,238 \pm 0,768$), menores nos grupos nutrido estresse (NE; $43,850 \pm 0,484$) e nutrido adrenalectomizado (NA; $35,087 \pm 1,318$). (Gráfico 9).

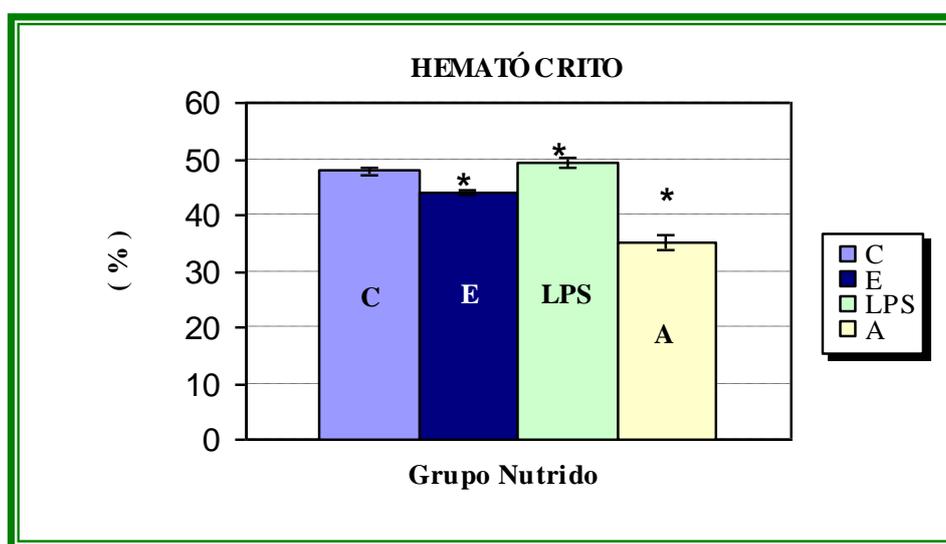


Gráfico 9 - Os valores de hematócrito em ratos adultos nutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8). Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxLPS, * = CxA.

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais desnutridos no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre os valores de Hematócrito ($\%/mm^3$)*

Os valores de hematócrito, quando comparados aos do grupo desnutrido controle (DC; $43,275 \pm 0,397$), foi menor no grupo desnutrido adrenalectomizado (DA; $36,837 \pm 0,885$), maior no grupo desnutrido LPS (D-LPS; $46,825 \pm 0,830$), entretanto, no grupo desnutrido estresse (DE; $44,550 \pm 0,746$) não apresentaram diferenças (Gráfico 10).

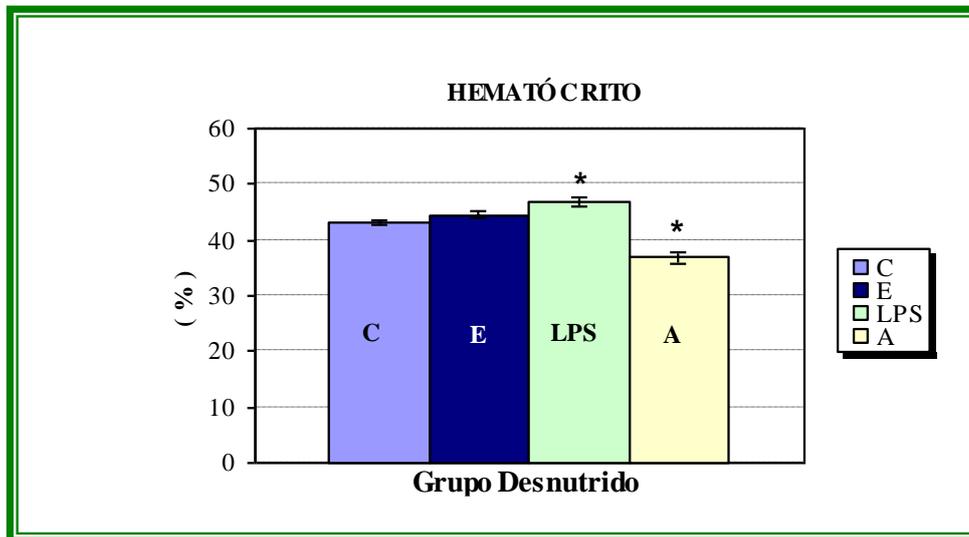


Gráfico 10 - Os valores de hematócrito em ratos adultos desnutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8). Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxE, * = CxA.

3.3 Estudo da série branca

O número total de leucócitos no sangue foi expresso em mediana (n° de células $\times 10^3/\text{mm}^3$), valores máximo e mínimo. Os resultados da contagem diferencial de leucócitos (%) foram expressos em média \pm EP.

3.3.1 Leucócitos totais

- ◆ *Efeito da desnutrição no período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre o número total de leucócitos (n° de células $\times 10^3/\text{mm}^3$)*

O número de leucócitos totais não diferiu entre os grupos nutrido (NC; $13,414 \pm 0,266$) e desnutrido (DC; $15,219 \pm 0,680$).

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais nutridos sobre o número total de leucócitos (n° de células $\times 10^3/\text{mm}^3$)*

O número total de leucócitos, quando comparados ao do grupo nutrido controle (NC; $13,414 \pm 0,266$), foi menor no grupo nutrido estresse (NE; $10,850 \pm 0,442$), já nos grupos nutrido LPS (N-LPS; $15,814 \pm 0,479$) e nutrido adrenalectomizado (NA; $17,544 \pm 0,649$) foram maiores (Gráfico 11).

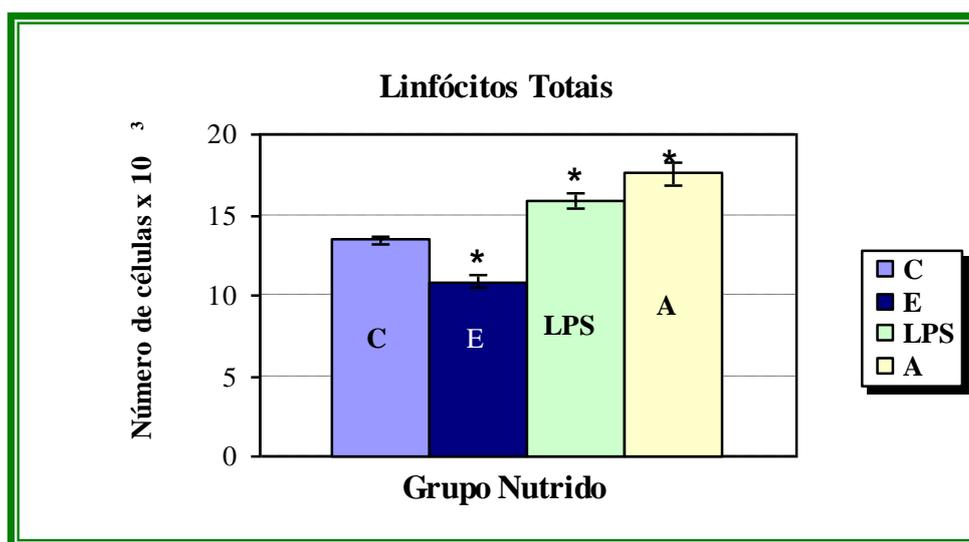


Gráfico 11 – O número total de leucócitos em ratos adultos nutridos (C, $n=8$; E, $n=8$; LPS, $n=8$; A, $n=8$). Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxE, * = CxLPS, * = CxA.

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais desnutridos no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre o número total de leucócitos (n° de células $\times 10^3/\text{mm}^3$)*

Em relação ao número total de leucócitos, quando comparado ao do grupo desnutrido controle (DC; $15,219 \pm 0,680$), foi menor no grupo desnutrido estresse (DE; $10,778 \pm 0,260$) e no grupo desnutrido LPS (D-LPS; $12,844 \pm 0,458$), entretanto no grupo desnutrido adrenalectomizado (DA; $20,569 \pm 1,148$) foi maior (Gráfico 12).

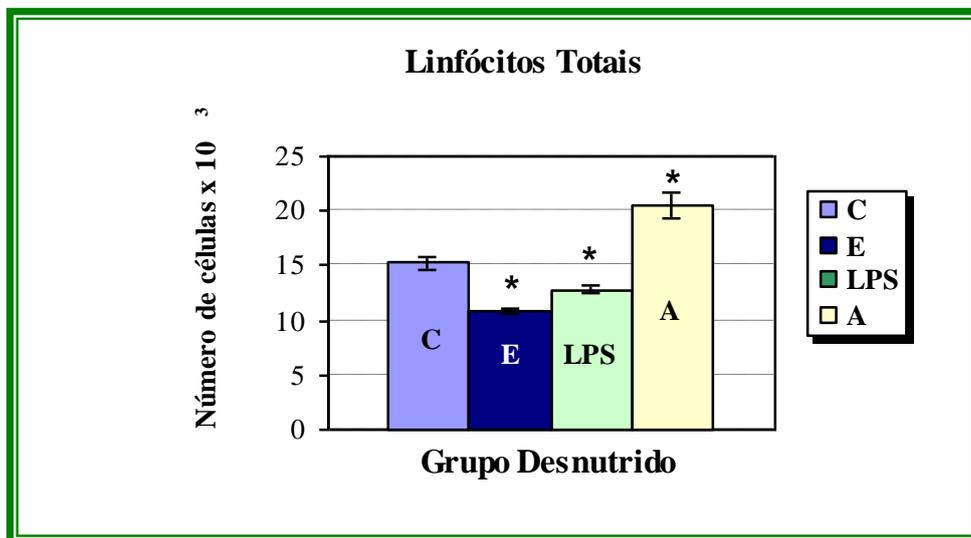


Gráfico 12 - O número total de leucócitos em ratos adultos nutridos (C, $n=8$; E, $n=8$; LPS, $n=8$; A, $n=8$). Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxE, * = CxLPS, * = CxA.

3.3.2 Leucócitos diferenciais

3.3.2.1. Segmentados

- ◆ *Efeito da desnutrição no período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre o número de segmentados (%)*

Quanto ao número de segmentados, quando comparado entre os grupos nutridos (NC; $16,750 \pm 0,750$) e desnutridos (DC; $17,375 \pm 0,498$) não houve diferença.

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais nutridos sobre o número de segmentados (%)*.

Em relação ao número de segmentados, quando comparado ao do grupo nutrido controle (NC; $16,750 \pm 0,750$), foi maior nos grupos nutrido LPS (N-LPS; $37,875 \pm 1,025$), nutrido estresse (NE; $23,375 \pm 1,463$) e nutrido adrenalectomizado (NA; $39,000 \pm 3,751$) (Gráfico 13).

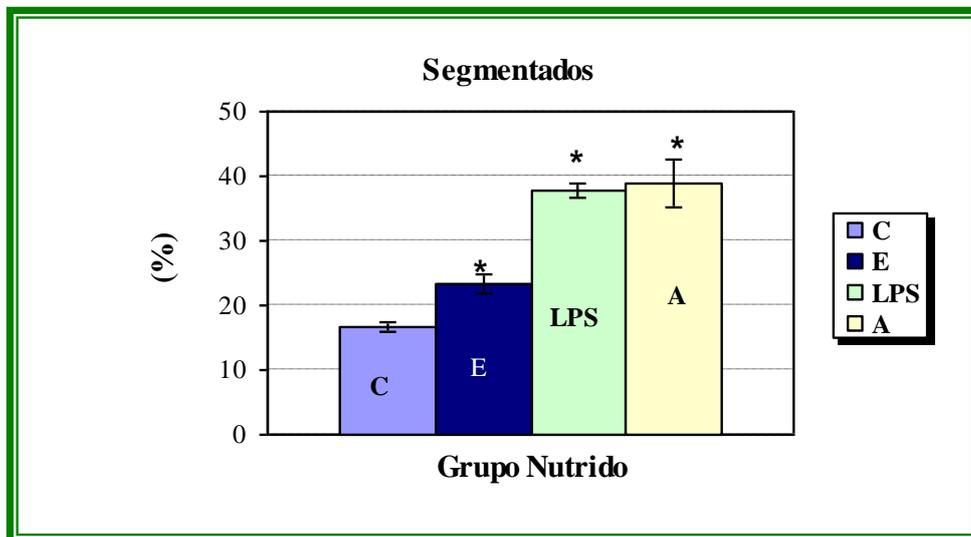


Gráfico 13 - O número de segmentados em ratos adultos nutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8). Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnett. = $p < 0,005$ para * = CxE, * = CxLPS, * = CxA.

- ◆ Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais desnutridos no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre o número de segmentados (%)

O número de segmentados foi maior nos grupos desnutrido LPS (D-LPS; $36,375 \pm 3,262$), desnutrido estresse (DE; $27,000 \pm 2,928$) e desnutrido adrenalectomizado (DA; $42,125 \pm 1,231$) quando comparados ao do grupo desnutrido controle (DC; $17,375 \pm 0,498$), (Gráfico 14).

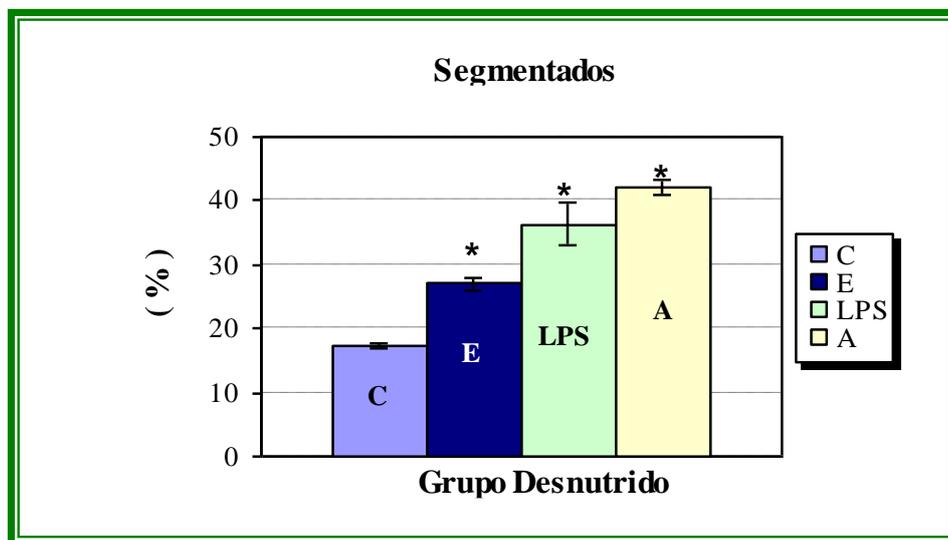


Gráfico 14 - O número de segmentados em ratos adultos desnutridos (C, $n=8$; E, $n=8$; LPS, $n=8$; A, $n=8$). Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxE, * = CxLPS, * = CxA.

3.3.2.2 Linfócitos

- ◆ *Efeito da desnutrição no período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre o número de linfócitos (%)*

Em relação ao número de linfócitos, não houve diferença quando compararam-se os grupos nutrido (NC; $81,375 \pm 0,532$) e desnutrido (DC; $81,375 \pm 0,532$).

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais nutridos sobre o número de linfócitos (%)*

Em relação ao número de linfócitos, o valor do grupo nutrido controle (NC; $81,375 \pm 0,532$) foi maior que o dos grupos nutrido LPS (N-LPS; $71,250 \pm 1,790$), nutrido estresse (NE; $74,625 \pm 1,558$) e nutrido adrenalectomizado (NA; $69,500 \pm 2,612$) (Gráfico 15).

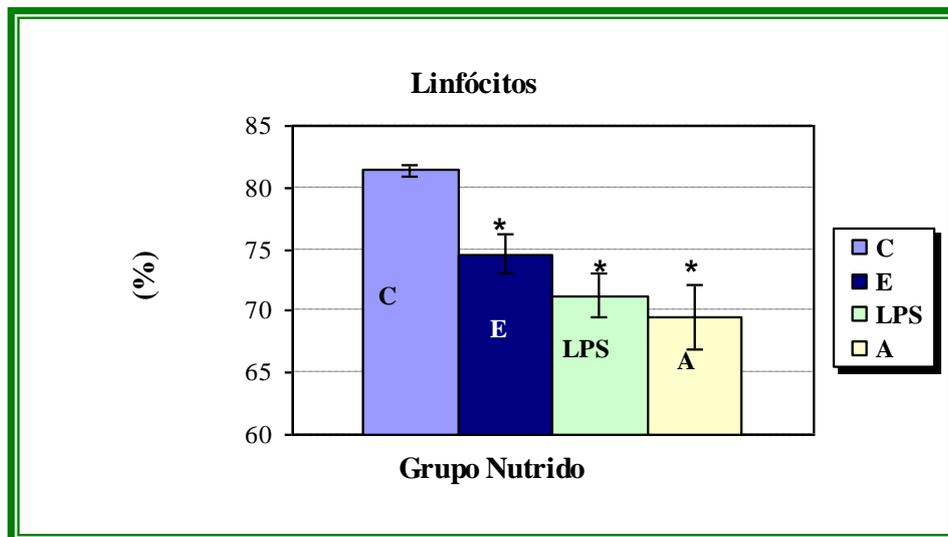


Gráfico 15 - O número de linfócitos em ratos adultos nutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8). Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxE, * = CxLPS, * = CxA.

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais desnutridos no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre o número de linfócitos (%)*

O número de linfócitos, quando comparado ao do grupo desnutrido controle (DC; $78,250 \pm 1,532$), foi menor nos grupo desnutrido LPS (D-LPS; $49,875 \pm 2,349$) e desnutrido adrenalectomizado (DA; $44,750 \pm 3,337$), entretanto não houve diferença em relação ao grupo desnutrido estresse (DE; $71,250 \pm 1,780$) (Gráfico 16).

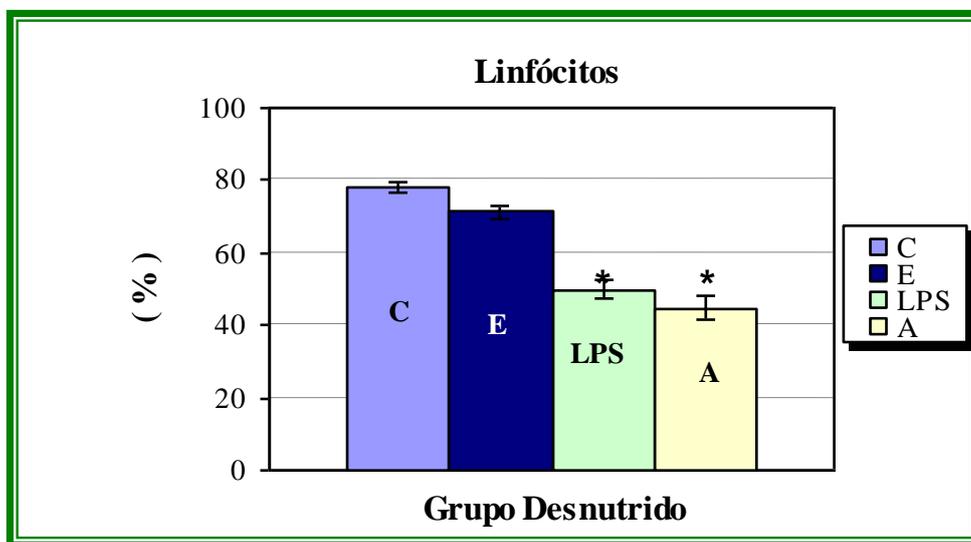


Gráfico 16 - - O número de linfócitos em ratos adultos desnutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8). Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxLPS, * = CxA.

3.3.2.3. Eosinófilos

- ◆ *Efeito da desnutrição no período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre o número de eosinófilos (%)*

Quanto ao número de eosinófilos, não houve diferença entre os grupos nutridos (NC; $1,750 \pm 0,250$) e desnutridos (DC; $1,875 \pm 0,835$).

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais nutridos sobre o número de eosinófilos (%)*

Em relação ao número de eosinófilos, quando comparados ao grupo nutrido controle (NC; $1,750 \pm 0,250$), foi um maior nos grupos nutrido LPS (N-LPS; $3,375 \pm 0,420$), nutrido estresse (NE; $3,125 \pm 0,350$) e nutrido adrenalectomizado (NA; $7,500 \pm 0,627$) (Gráfico 17).

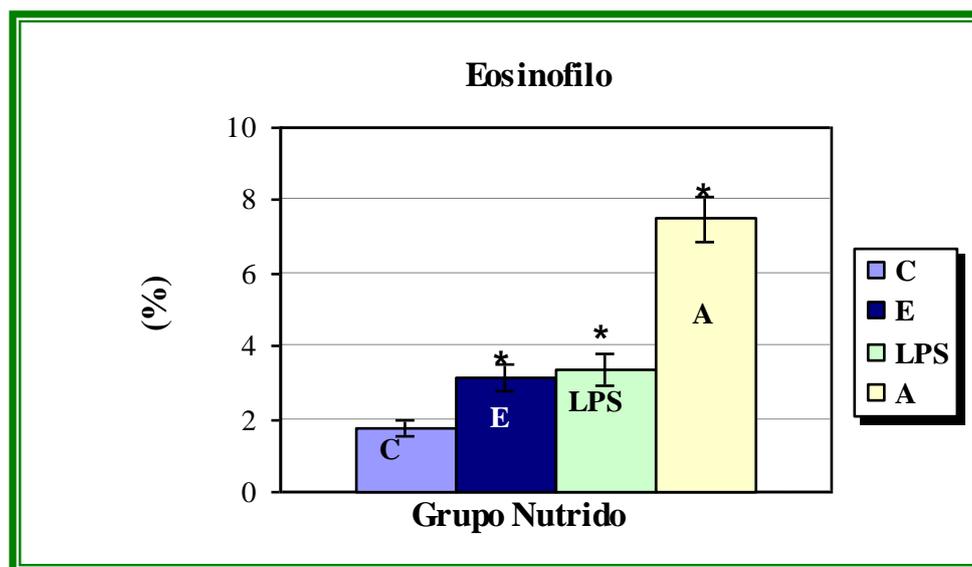


Gráfico 17 - O número de eosinófilos em ratos adultos nutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8). Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxE, CxLPS * = CxA.

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais desnutridos no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre o número de eosinófilos (%).*

O número de eosinófilos, quando comparado ao do grupo desnutrido controle (DC; $1,875 \pm 0,295$), foi um maior nos grupos desnutrido LPS (D-LPS; $7,000 \pm 0,567$), desnutrido estresse (DE; $5,375 \pm 0,565$) e desnutrido adrenalectomizado (DA; $5,250 \pm 0,648$) (Gráfico 18).

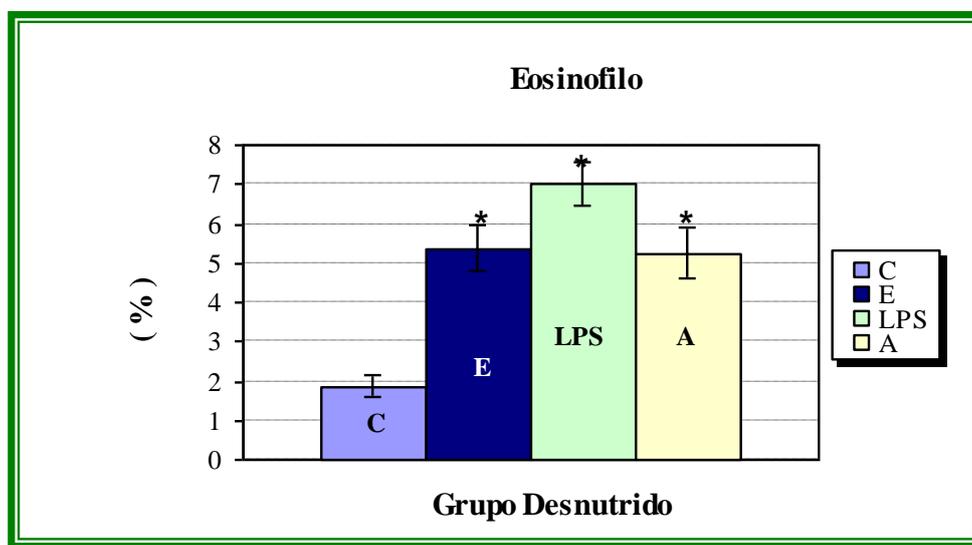


Gráfico 18 - O número de eosinófilos em ratos adultos desnutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8). Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxE, CxLPS * = CxA.

3.3.2.4 Monócitos

- ◆ *Efeito da desnutrição no período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre o número de monócitos (%)*

Não houve diferenças no número de monócitos quando se compararam os grupos nutrido (NC; $1,625 \pm 0,375$) e desnutrido (DC; $1,375 \pm 0,375$).

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais nutridos sobre o número de monócitos (%)*

O número de monócitos, quando comparado ao do grupo nutrido controle (NC; $1,625 \pm 0,375$), foi maior no grupo nutrido adrenalectomizado (NA; $15,500 \pm 0,732$), entretanto não foi diferente nos grupos nutrido LPS (N-LPS; $2,625 \pm 0,532$) e no nutrido estresse (NE; $2,750 \pm 0,559$) (Gráfico 19).

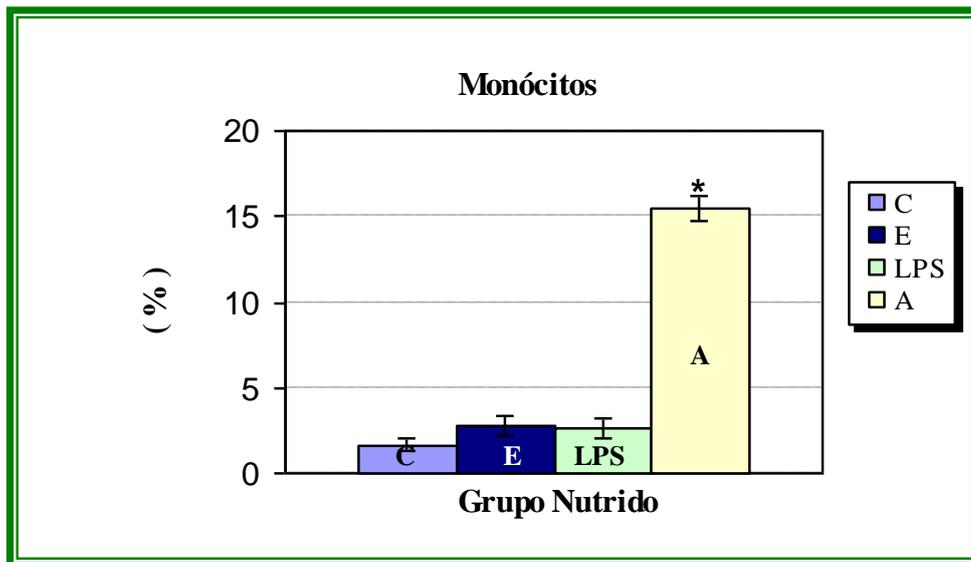


Gráfico 19 - O número de monócitos em ratos adultos nutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8). Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxA.

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais desnutridos no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre o número de monocitos (%)*

O número de monócitos, quando comparado ao do grupo desnutrido controle (DC; $1,375 \pm 0,375$), foi maior nos grupos desnutrido LPS (D-LPS; $15,750 \pm 1,306$), desnutrido estresse (DE, $7,250 \pm 0,861$) e desnutrido adrenalectomizado (DA; $13,875 \pm 2,401$) (Gráfico 20).

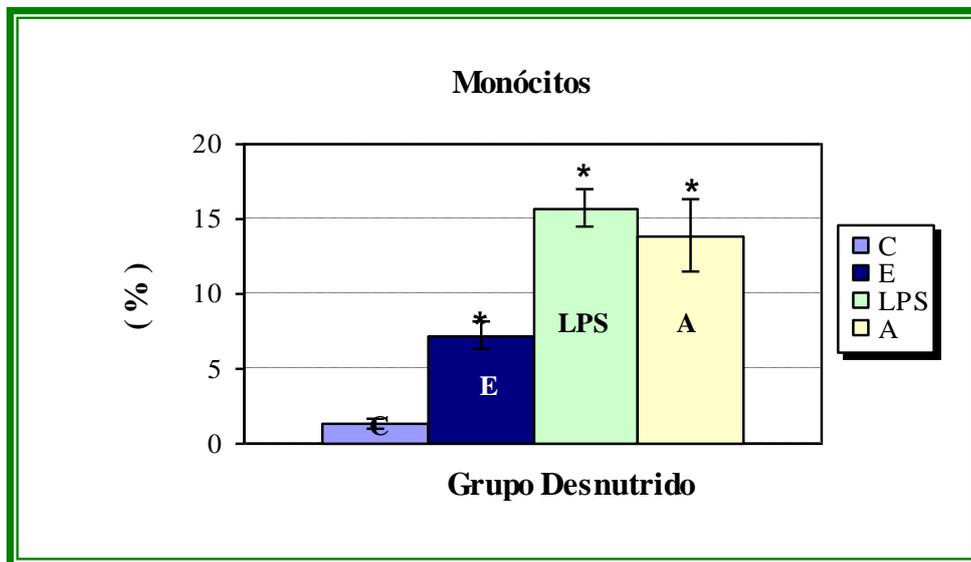


Gráfico 20 - O número de monócitos em ratos adultos desnutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8). Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxE, * = CxLPS, * = CxA.

3.3.2.5 Basófilos

- ◆ *Efeito da desnutrição no período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre o número de basófilos (%)*

Quanto ao número de basófilos, não houve diferença entre os grupos nutrido (NC; $0,00 \pm 0,0$) e desnutrido (DC; $0,00 \pm 0,0$)

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais nutridos sobre o número de basófilos (%)*

Não houve diferença no número de basófilos quando foram comparados o grupos nutrido LPS (N-LPS; $0,000 \pm 0,0$), nutrido estresse (NE; $0,000 \pm 0,0$) e nutrido adrenalectomizado (NA; $0,000 \pm 0,0$) com o grupo nutrido controle (NC; $0,000 \pm 0,0$).

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais desnutridos no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre o número de basófilos (%)*

O número de basófilos, quando comparado ao do grupo desnutrido controle (DC; $0,000 \pm 0,0$), foi semelhante aos dos grupos desnutrido LPS (D-LPS; $0,000 \pm 0,0$), desnutrido estresse (DE; $0,000 \pm 0,0$) e desnutrido adrenalectomizado (DA; $0,000 \pm 0,0$).

3.3.3 Níveis de corticosteróide (mcg/dl)

- ◆ *Efeito da desnutrição no período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre os níveis de corticosteróide (mcg/dl)*

Quanto aos níveis de corticosteróides o grupo nutrido (**NC**; $6,05 \pm 0,21$) apresentou níveis mais elevados em relação ao grupo desnutrido (**DC**; $4,1 \pm 0,14$) (Gráfico 21).

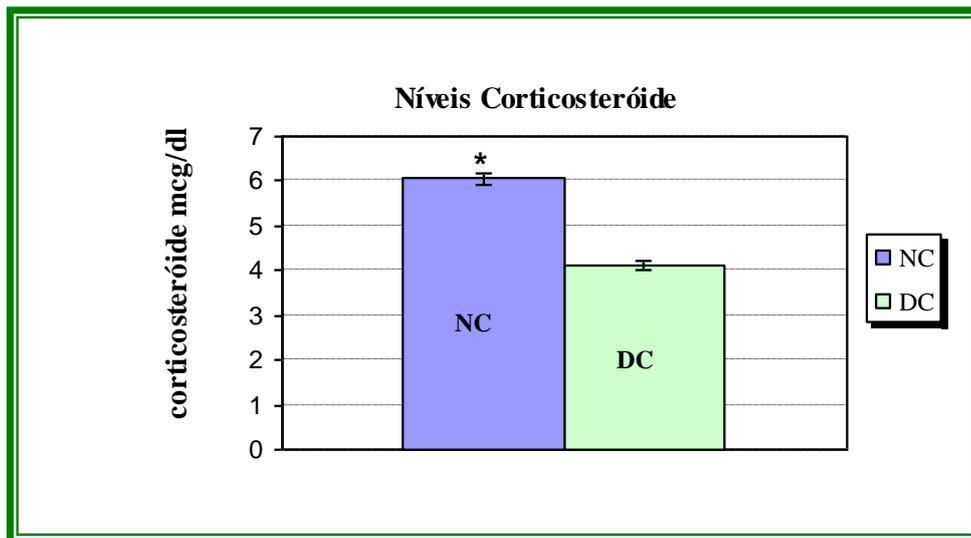


Gráfico 21 – Os níveis de corticosteróides obtidos de ratos adultos nutridos (NC, $n= 8$) e desnutridos (DC, $n=8$), durante o período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso e nutricionalmente recuperado. Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Nas comparações entre os grupos foi utilizado Teste t de student, $*p < 0,005$.

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais nutridos sobre os níveis de corticosteróide (mcg/dl).*

Em relação ao nível de corticosteróide, quando comparado ao do grupo nutrido controle (NC; $4,1 \pm 0,14$), foi maior no grupo nutrido estresse (NE; $6,8 \pm 0,14$), menor no grupo nutrido adrenalectomizado (NA; $0,75 \pm 0,07$) e semelhante ao do grupo nutrido LPS (N-LPS; $4,0 \pm 0,14$) (Gráfico 22).

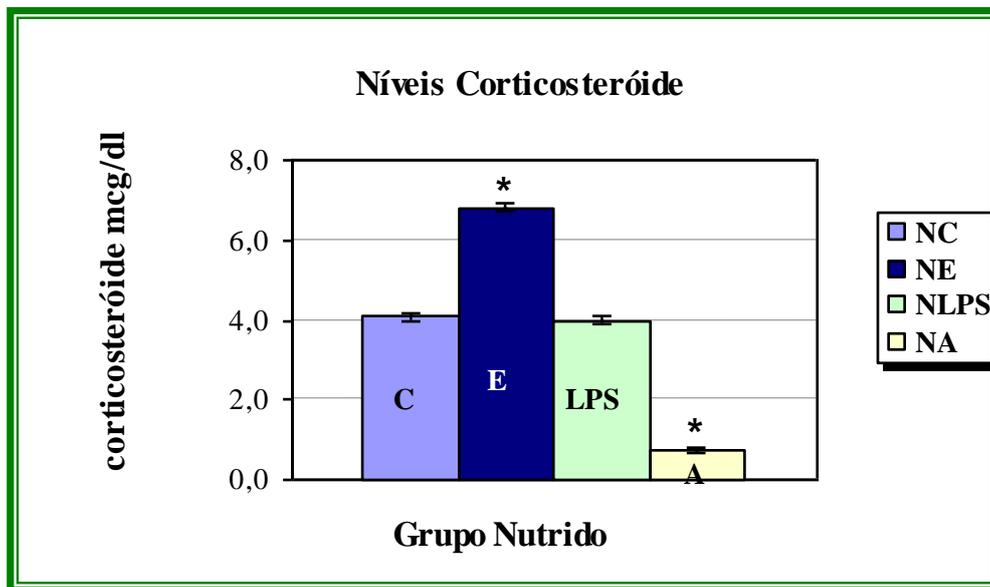


Gráfico 22 – O nível de corticosteróides obtidos em ratos adultos nutridos (C, $n=8$; E, $n=8$; LPS, $n=8$; A, $n=8$). Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em $\text{media} \pm \text{EP}$. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxE, * = CxA.

- ◆ *Efeito do estresse psicológico, estresse orgânico (LPS) ou da adrenalectomia em animais desnutridos no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre os níveis de corticosteróide (mcg/dl).*

Quanto ao nível de corticosteróide, quando comparado ao do grupo desnutrido controle (DC; $4,1 \pm 0,14$), foi maior no grupo desnutrido estresse (DE; $6,8 \pm 0,14$), menor no grupo desnutrido adrenalectomizado (DA; $0,75 \pm 0,07$) e semelhante ao do grupo desnutrido LPS (D-LPS; $4,0 \pm 0,14$) (Gráfico 23).

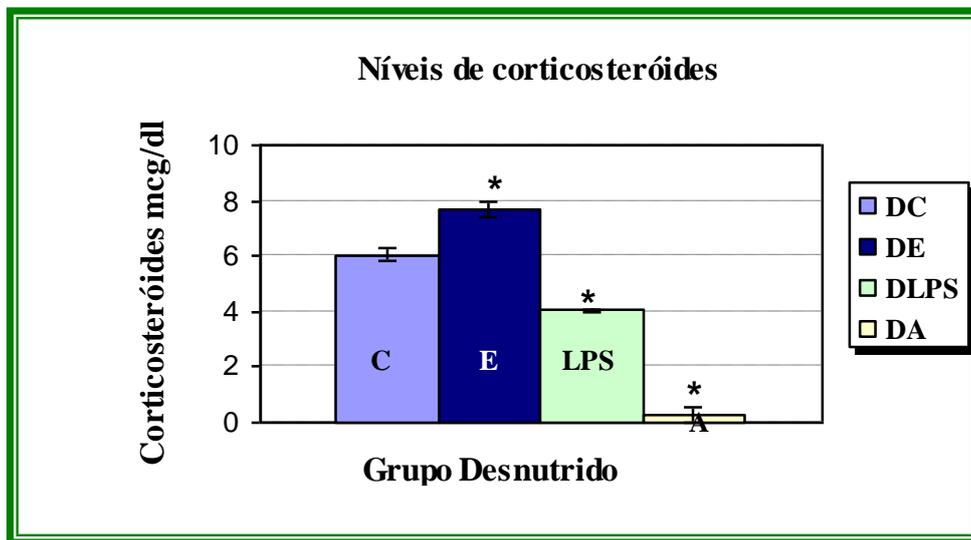


Gráfico 23 - O nível de corticosteróides obtidos em ratos adultos desnutridos (C, n=8; E, n=8; LPS, n=8; A, n=8). Os valores foram obtidos entre 90 e 120 dias de idade. Os ratos foram submetidos à aplicação de estresse de contenção (E), estresse biológico (LPS) e adrenalectomia (A). Os valores estão expressos em média \pm EP. Nas comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet. = $p < 0,005$ para * = CxE, * = CxLPS * = CxA.

3.3.4 Análise de títulos de Anticorpos específicos

- ◆ *Efeito da desnutrição no período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperados sobre os títulos de Ac anti-HC.*

Os títulos de anticorpos anti-HC foi maior no grupo nutrido controle (NC; 80 ± 55) do que no grupo desnutrido controle (DC; 34 ± 43) (Gráfico 24).

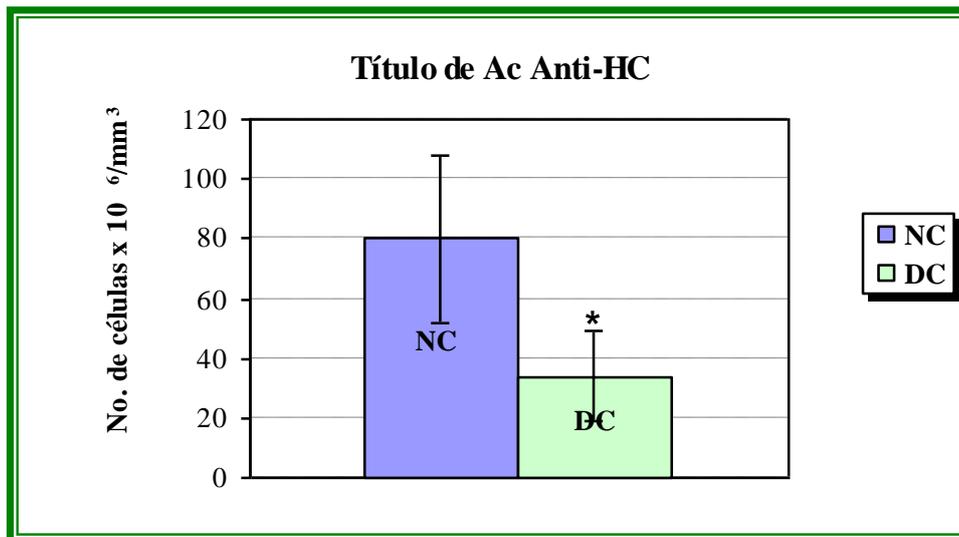


Gráfico 24 – Ratos adultos, entre 90 e 120 dias de idade, nutridos (NC) ou desnutridos (DC) no período crítico do sistema nervoso e em seguida nutricionalmente recuperado. Os animais foram inoculados via i.p. de 0,5ml de HC (diluição 1:20 em BPS a 0,01M). Os soros obtidos após a imunização (3 e 7 dias), os títulos anticorpos anti-HC foram detectados pelo método de hemoaglutinação. Nas comparações entre os grupos foi utilizado Teste t de student, * $p < 0,005$.

4 DISCUSSÃO

O eixo Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) tem participação efetiva nas respostas adaptativas do organismo às ações do meio ambiente. É constituído por componentes neuroendócrinos centrais no encéfalo e hormonal periférico na adrenal. O eixo HPA pode ser assim regulado em diversos níveis do organismo. Alterações da atividade do eixo HPA têm sido descritas em diversas patologias como a Síndrome de Cushing, depressão melancólica, alcoolismo, exercício físico excessivo, hipertireoidismo, anorexia nervosa e desnutrição (CHROUSOS & GOLD, 1992).

O estado nutricional é um dos principais fatores que pode afetar o funcionamento do sistema imune e conseqüentemente alterar a capacidade do organismo em vencer as agressões ambientais (BARRETO-MEDEIROS et al., 2003). Demonstrando que o estudo dos efeitos tardios da agressão nutricional no período neonatal sobre a imunidade é de grande importância por se tratar de uma problemática bastante freqüente em nossa região (SANTOS, 2000).

Existem fortes evidências de que reações emocionais e de estresse estimulam a interação entre sistemas fisiológicos em especial o SNC, SE e SI, produzindo desta forma alterações na resposta imune (BRUCE & ELOIT, 1994; De SIMONI e IMERI, 1998). No presente trabalho foram investigados, em ratos adultos adrenalectomizados ou não, os efeitos da desnutrição precoce, estresse psicológico ou orgânico sobre aspectos da resposta imunológica específica e inespecífica.

Neste estudo, os animais submetidos à desnutrição neonatal apresentaram uma redução do número de hemácias, hematócrito, produção de anticorpos anti-hemácia de carneiro e dos níveis de corticosteróide.

Os resultados corroboram com aqueles obtidos em trabalhos anteriores (BARONE, HARPER & WAPNIR, 1998; SANTOS, 2000) onde a desnutrição no período de desenvolvimento crítico do sistema nervoso mesmo seguida de recuperação nutricional acarretou a diminuição do número de hemácias, estes autores justificam que os baixos valores biológicos das proteínas e a insuficiência de ferro na dieta promovem alterações hematimétricas.

Quanto aos títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro, a desnutrição neonatal causou uma redução. Confirmando dados da literatura em que o déficit nutricional promove danos na resposta imune e são responsáveis pelas infecções freqüentes resultados de um número elevado de mortalidade, principalmente em crianças (CHANDRA, 1997). Neste

estudo, também nos indivíduos submetidos a adrenalectomia houve reduções concomitantes no número médio de linfócitos e nível de corticosteróide no sangue. Estes dados estão de acordo com estudo de Padgett, Sibley & Jerrells (2000) que submeteram ratos a adrenalectomia e a tratamento com álcool e encontraram diminuição no número de células linfocitárias em diversos órgãos.

Nos animais nutridos expostos ao estresse psicológico, ocorreu uma diminuição do número de hemácias, valores de hematócrito, número total de leucócitos e de linfócitos. Entretanto, estes animais apresentaram aumento no número dos segmentados, eosinófilos e nos níveis de corticosteróide. Já nos animais nutridos expostos ao estresse orgânico, houve diminuição no peso corporal e no número de linfócitos; por outro lado, houve aumentos nos valores de hematócrito, de leucócitos totais, de segmentados e de eosinófilos.

A adrenalectomia nos animais nutridos induziu diminuição no peso corporal, no número de hemácias, nos valores de hemoglobina, hematócrito, linfócitos e níveis de corticosteróide; além disso, provocou aumento no número total de leucócitos, de segmentados, de eosinófilos e de monócitos.

Nos animais desnutridos, o estresse psicológico provocou aumento do número de hemácias, de segmentados, de eosinófilos, de monócitos e nos níveis de corticosteróide; contudo, houve diminuição no número total de leucócitos. O estresse orgânico nos desnutridos ocasionou aumento nos valores de hematócrito, no número total de leucócitos, segmentados, de eosinófilos e de monócitos; entretanto, acarretou diminuição no número de linfócitos. Já em animais desnutridos submetidos a adrenalectomia, houve uma diminuição no peso corporal, nos valores de hemácias, de hemoglobina, de hematócrito, de linfócitos e nos níveis de corticosteróide. Por outro lado, também ocorreu, aumento no número de leucócitos totais, de segmentados, de eosinófilos e de monócitos.

Os estresses psicológico ou orgânico utilizado neste trabalho, junto com os efeitos tardios da desnutrição, acarretaram resposta alterada do organismo. Admite-se que o estresse diminui a habilidade do sistema imunológico para responder a agentes estranhos ao organismo e desta maneira aumentar a susceptibilidade a doenças infecciosas e neoplásicas (DHAINAUT & FAND MIRA, 1993). Estas modificações têm sido consideradas como conseqüências da resposta endócrina ao estresse e dos mecanismos mediados pelo sistema nervoso autônomo (BOLAÑOS-JIMENEZ et al., 1995).

O fator estresse ativa o eixo HPA e este têm participação efetiva nas respostas adaptativas do organismo às ações do meio ambiente. O eixo endócrino HPA é constituído por componentes neuroendócrinos centrais no encéfalo e hormonal periférico na adrenal.

Situações específicas sofridas pelo organismo levam a secreção principalmente hipotalâmica do hormônio liberador de corticotropina (CRH). Este por sua vez está presente em todo o cérebro, estando em maior concentração no núcleo paraventricular do hipotálamo (CASTRO & MOREIRA, 1996). O CRH é transportado através do sistema porta à pituitária (VIZI, 1998), induzindo a síntese de produtos gênicos da pro-opiomelanocortina como β -endorfina e ACTH este por sua vez induz a liberação de glicocorticóides pela glândula supra-renal (VIZI, 1998).

A desnutrição imposta no período crítico de desenvolvimento do SN observada neste trabalho diminui os níveis de corticosteróides. O sistema nervoso controla direta ou indiretamente, a liberação de vários hormônios particularmente, corticosteróide, hormônio de crescimento, tiroxina e adrenalina. Estas substâncias alteram componentes do sistema imune como linfócitos, os quais expressam receptores para muitos hormônios neurotransmissores e neuropeptídeos (ROITT, 1997).

Pode-se verificar a presença e a atividade de peptídios derivados da pro-opiomelanocortina (POMC), como o ACTH, β -endorfina e hormônio α -melanócito estimulante (α -MSH), bem como citocinas e óxido nítrico (NO) em diversas células imunológicas, entre elas, neutrófilos, monócitos e macrófagos. Além disto, a migração destas células para os locais de inflamação, como a sua ativação, são processos básicos afetados e modulados por hormônios, opióides e citocinas. Os próprios linfócitos podem responder ao fator liberador de corticotropina e gerar seu próprio ACTH que, por sua vez induz a liberação de corticosteróide. Atualmente, se reconhece que os hormônios hipotalâmicos, hipofisários, adrenais, tireóides e outros interferem também no sistema imune (GAILLARD, 1994).

Assim, hormônios podem *a priori* ter ação direta ou indireta na resposta imune (GAILLARD, 1994). O exemplo mais convincente desta modulação é a ativação de secreção adrenocortical em resposta a estímulo inflamatório ou antigênico (GAILLARD, 1994). Ademais, a capacidade das células dos órgãos linfóides primários e secundários depende da ação do hormônio do crescimento (GC) e da prolactina. O eixo HPA medeia a imunossupressão e serve como antagonista endócrino dos efeitos imunoestimulatórios do GC e da prolactina. Outros hormônios, incluindo tiroxina e hormônios sexuais, têm efeitos imunorregulatórios. Um controle particularmente importante é mediado pelos corticosteróides, endofinas e encefalinas. Estas substâncias, com ações imunossupressivas são liberados durante situações de estresse (ANGIONI et al., 1993).

Há muito se estabeleceu o papel imunossupressor dos corticosteróides (ANGIONI et al., 1993). Ignorava-se o fato de que, dependendo da concentração, eles podem estimular ou suprimir as funções imunológicas (BESEDOVSKY et al., 1986). Em situação de estresse físico ou emocional, os corticosteróides suprimem a produção de citocinas; contudo, em concentrações fisiológicas podem promover a produção e liberação de citocinas como IL-6 e TNF- α (BESEDOVSKY et al., 1986). Outro efeito dos corticosteróides é a indução do aumento de receptores para as citocinas (BESEDOVSKY et al., 1986). Na resposta de fase aguda da inflamação (reação sistêmica, lesão tecidual e/ou infecção), ocorre produção e liberação de citocinas e corticosteróides (WILSON, CARMODY & WALKER, 2000). Neste caso, a interação entre IL-6 e corticosteróide (endógenos), induzindo a produção de proteínas de fase aguda, teria a função de proteger o indivíduo das conseqüências potencialmente letais do processo de septicemia. Contrariamente, a administração exógena de corticosteróides durante a sepsi tem efeito supressor (BOLAÑOS, MARIANO & BOROJEVIC, 1995).

Acredita-se que os corticosteróides tenham também outras funções: seleção das células T durante seu desenvolvimento, influência na apresentação de antígeno, modulação da expressão de moléculas do MHC e na produção de citocinas (DESAI et al., 1992) Estas alterações induziriam modificações no balanço Th₁/Th₂, favorecendo respostas baseadas na função Th₂.

O ACTH circula sistemicamente e estimula a produção de cortisol pelo córtex adrenal, ele é um pequeno peptídeo derivado da pro-opiomelanocortina inicialmente encontrado na hipófise. Sabe-se hoje que o ACTH existe em áreas extrahipofisárias, inclusive em células com função imune (OTTAVIANI, FRACHINI & GENEDANI, 1999). Desta forma, durante o estresse, os glicorticóides estão em níveis elevados no soro (BOLAÑOS, MARIANO & BOROJEVIC, 1995), os quais tem o poder de inativar macrófago, principal célula da imunidade inata, e outras células do sistema imune (GERMANN et al., 1993). Os glicorticóides inibem a produção e, às vezes, a ação de uma variedade de mediadores como metabólitos do ácido aracdônico e linfocina (DINARELLO, 1989; De CASTRO et al., 1995). Aliás, a idéia de uma relação entre os sistemas imune, nervoso e endócrino progrediu com os estudos experimentais sobre os efeitos imunológicos de uma variedade de estressores e da demonstração da presença de hormônios do eixo HPA, característicos da resposta ao estresse, em células do sistema imune (OTTAVIANI & FRANCESCHI, 1996).

Estudos anteriores permitiram a hipótese de que linfócitos, monócitos e outras células imunes possuem receptores para neuropeptídeos e hormônios, além de poderem produzir uma grande variedade dessas moléculas (WEIGENT & BLALOCK, 1987). Dentre

as células do sistema imune, os linfócitos são aquelas que mais se assemelham com uma célula neuroendócrina, apresentando em sua superfície receptores para peptídeos neuroendócrinos e hormônios hipotalâmicos, assim como também possuem a capacidade de produção de neuropeptídeos (KATSUURA et al., 1990).

Os leucócitos humanos, durante a produção de Interferon α (IFN- α), expressam em sua superfície peptídeos com particularidades antigênicas, características biológicas e estruturais relacionadas ao ACTH (BLALOCK, 1992). A ativação do eixo hipófise-adrenal pela IL-1 resulta em aumento na secreção de CRH (BESEDOVSKY et al., 1986). Já outros estudos revelaram que outras interleucinas (IL-2, IL-6 e α -TNF), também são capazes de elevar os níveis de ACTH no plasma e que também podem funcionar como neuromoduladores (KARANTH E McCANN, 1991; SCHÖBITZ, De KLOET & HOLSBOER, 1994). Vale a pena ressaltar que algumas citocinas parecem estimular a síntese e liberação de CRH por mecanismos ainda pouco conhecidos (SCHÖBITZ, De KLOET & HOLSBOER, 1994). Efeitos diretos e indiretos do CRH podem influenciar a susceptibilidade de um indivíduo a certas doenças auto-imunes, alérgicas, infecciosas ou neoplásicas (ELENKOV et al., 1999).

Por outro lado, tem-se demonstrado que neurotransmissores, como catecolaminas e histamina, inibem potencialmente IL-12 e estimula IL-10, enquanto os glicorticóides suprimem IL-12, mas não afeta a produção de IL-10 (SCHÖBITZ, De KLOET, HOLSBOER, 1992). Portanto, pode-se dizer que glicorticóides, catecolaminas e histamina podem seletivamente alterar a imunidade celular e a resposta imune humoral (CHOUAIB et al., 1994). Estes achados tomados juntos podem explicar porque o estado emocional ou a resposta ao estresse modificam a capacidade individual de lidar com doenças (GRUNDY et al., 2001).

Influências do sistema nervoso regulam diretamente o sistema imune (WEIGENT, & BLALOCK, 1987). Estudos clássicos com lesões de hipotálamo e indução de imunossupressão em animais mostram redução importante das respostas celulares e humoral a antígenos exógenos (MULCHAHEY et al., 1999; LOPES, 2001). Da mesma forma, a secreção de neurotransmissores modifica o processo inflamatório (GUALILLO et al., 2000). Alterações induzidas experimentalmente no sistema nervoso alteram as funções imunes sistêmica, sugerindo que a imunocompetência seja regulada centralmente através de uma série de mecanismos (BAI & CASTONGUAY, 2001): cada hormônio secretado pela hipófise anterior está sob controle neuroendócrino do hipotálamo, sendo a secreção, alterada por diversos estímulos como sinais do ambiente externo, ritmo do sono e estresse físico e emocional (SPINEDI & GAILLARD, 1998).

É interessante ressaltar que, sob condições adversas, citocinas e mediadores inflamatórios podem provocar desde leves alterações de comportamento até coma e destruição neural permanente (MULCHAHEY et al., 1999). Entre os mediadores mais potentes de neurotoxicidade liberados por monócitos/macrófagos o óxido nítrico pode agir como uma exotoxina (MULCHAHEY et al., 1999). Por outro lado, um número grande de citocinas também é sintetizado por células gliais (MATERA, 1997). Neste caso, IL-1, IL-2, IL-4 e α -TNF, além das funções de defesa, também agem como fatores neurotrópicos. Ademais, sabe-se que IL-1 inibe a secreção neuronal de acetilcolina, interferindo diretamente no processo de memória, enquanto que IL-6 pode estimular a expressão de vírus em monócitos infectados.

Dhabhar et al., 1995, afirmam que o número e a proporção de leucócitos no sangue fornece uma importante representação do estado e distribuição de leucócitos no organismo e do estado de ativação do sistema imune. Neste estudo, o estresse psicológico induziu a redução no número total de leucócitos com diminuição de linfócitos, e aumento na média de neutrófilos, resultados semelhantes encontrados por Santos, 2000 e Dhabhar et al., 1995.

Vários estudos vêm demonstrando que os nutrientes têm papel geral e específico no desenvolvimento e na função imune humoral e celular (SALAMITA et al., 1983). Portanto, a desnutrição acarreta prejuízo na imunocompetência do organismo sendo um fator causal de grande importância na susceptibilidade às doenças infecciosas por obrigatoriedade patógenos intracelulares.

Pessoa (1997), estudando ratas, demonstrou que a capacidade de manter a lactação com dietas como a DBR, depende do grau de reserva corporal materno e da capacidade de mobilização dos tecido, pela fêmea. O organismo materno necessita de nutrientes em quantidades suficientes para a síntese de composto do leite, estes derivam da dieta ou da reserva corporal acumulada durante a gravidez.

Neste estudo, foi utilizada uma dieta hipoprotéica, 96% de origem vegetal, pobre em proteínas tanto em termos quantitativos quanto qualitativos, entretanto a desnutrição induzida foi seguida de recuperação nutricional. O impacto da desnutrição precoce se deu sobre o ganho de peso corporal apresentando alterações nos parâmetros hematológicos.

As bactérias Gram-negativas apresentam membrana externa composta de LPS, principal responsável pela cascata imuno-inflamatória no organismo (DHAINAUT & MIRA, 1993), daí o LPS ser usado como uma importante ferramenta para o estudo da fase aguda da inflamação (ALTENBURG et al., 2000). A septicemia por Gram negativas resulta na reação da endotoxina com os macrófagos, leucócitos, plaquetas, complemento e outras proteínas séricas para aumentar os níveis sanguíneos de enzimas proteolíticas e substâncias vasoativas

(HENRY, 1999). As endotoxinas interagem com vários sistemas celulares e humorais, após penetrar na circulação, ligando-se a lipoproteínas plasmáticas sendo capazes de induzir os macrófagos a produzirem uma variedade de citocinas integrantes da resposta imune (DINARELLO, 1989) originando resposta fisiológicas direcionadas à eliminação das endotoxinas, de seus fragmentos ou até mesmo bactérias gram-negativas.

Neste estudo o estresse orgânico, aumentou o percentual de neutrófilos nos animais nutridos. Este resultado indica que diante de uma infecção provocada por bactérias gram-negativas, o organismo inicialmente responde com aumento dos neutrófilos no local da infecção pela ação de mediadores liberados que irão estimular o recrutamento de células durante o processo inflamatório.

A desnutrição pode causar modificações nas diferentes etapas do processo fagocítico (migração e aderência celular) principalmente em neutrófilos e macrófagos (CHANDRA, 1997). Neste estudo, observou-se que a desnutrição, ainda que seguida de uma recuperação nutricional, pode afetar o recrutamento de neutrófilos. Os resultados mostram que o valor absoluto de neutrófilos foi menor nos animais desnutridos. Confirmando desta forma que a desnutrição neonatal provoca redução na capacidade de luta do organismo para a manutenção da homeostase.

Santos, 2000, afirma que a desnutrição neonatal não altera o número total de leucócitos, este parâmetro foi avaliado após longo período de recuperação nutricional. Contudo, animais desnutridos precocemente, submetidos ao estresse orgânico, apresentam a leucopenia. Reforçando ainda mais o fato de que a desnutrição pode provocar um desequilíbrio na resposta do organismo frente a infecções, tornando-o mais susceptíveis a doenças. Após a inoculação do LPS, ocorreu aumento do percentual de neutrófilos em ambos independente do estado nutricional. A neutrofilia é geralmente provocada pela resposta aos mediadores derivados dos macrófagos (De-CASTRO, 1997) e esta associada a infecções bacterianas agudas locais e generalizadas (WEISS, 1989). Apesar dos animais desnutridos apresentarem o valor da contagem relativa de neutrófilos no sangue periférico semelhante aos animais nutridos, o valor absoluto destas células nos desnutridos encontra-se inferior.

Os valores totais de hemácia foram menores no grupo desnutrido. Não houve alteração na dosagem de hemoglobina entre os grupos. O estresse orgânico elevou os valores de micro hematócrito. Este dado sugere hemoconcentração conseqüente da perda de volume plasmático devido ao seu extravasamento (SERUFO et al., 2000).

A formação do sistema imunológico da prole pode ser afetada gravemente diante de quadros de desnutrição materna durante o período de aleitamento (PESSOA, 1997). As

seqüelas desta desnutrição, observadas neste trabalho, indicam deficiência de resposta celular e humoral, alterações hematológicas, importantes para a manutenção da homeostase. Mostrando que a deficiência de nutrientes no período neonatal pode deixar o organismo adulto, mesmo recuperado, mais susceptível às infecções.

5 CONCLUSÃO

A desnutrição durante o período de crescimento rápido do encéfalo (período neonatal) após longo período de recuperação, causa em ratos adultos:

- ❖ Redução do número de hemácias e hematócritos;
- ❖ Diminuição dos títulos de anticorpos;
- ❖ Diminuição dos níveis de corticosteróide.

Os diferentes tipos de estresse em animais adultos nutridos causam:

Estresse Psicológico:

- ❖ Diminuição do número de hemácias e valores de hematócrito;
- ❖ Redução do número total de leucócitos e linfócitos;
- ❖ Elevação no número de neutrófilos e eosinófilos;
- ❖ Aumento dos níveis de corticosteróides.

Estresse biológico:

- ❖ Redução do peso corporal;
- ❖ Aumento dos valores de hematócrito;
- ❖ Diminuição do número de linfócitos;
- ❖ Elevação do número total de leucócitos, neutrófilos e eosinófilos.

Adrenalectomia:

- ❖ Redução do peso corporal;
- ❖ Diminuição do número de hemácias, hemoglobina e hematócrito;
- ❖ Redução dos linfócitos;
- ❖ Diminuição dos níveis de corticosteróides;
- ❖ Aumento do número total de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos;

Os diferentes tipos de estresse em animais adultos submetidos a desnutrição durante o período de crescimento rápido do encéfalo (período neonatal) após longo período de recuperação, causam:

Estresse psicológico:

- ❖ Aumento do número de hemácias;
- ❖ Redução do número total de leucócitos;
- ❖ Aumento de neutrófilos, eosinófilos e monócitos;

- ❖ Aumento dos níveis de corticosteróides.

Estresse biológico:

- ❖ Aumentou os valores de hematócrito;
- ❖ Redução do número total de leucócitos e de linfócitos;
- ❖ Aumentou o número de neutrófilos, eosinófilos e monócitos.

Adrenalectomia:

- ❖ Reduziu o peso corporal;
- ❖ Diminuiu número de hemácias, hemoglobina, os valores de hematócrito;
- ❖ Reduziu o número de linfócitos;
- ❖ Reduziu os níveis de corticosteróides;
- ❖ Aumentou o número total de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos,

Impossibilitando desta forma uma resposta normal do organismo, em particular no desnutrido, alterando de sobremaneira a homeostase, favorecendo maior susceptibilidade às infecções.

6 PERSPECTIVAS

- ❖ Avaliar o efeito da utilização de corticóides nos animais adrenalectomizados, com diferentes doses, em ratos adultos submetidos ou não a desnutrição durante o período de aleitamento;
- ❖ Analisar a produção de anticorpos nos animais adrenalectomizados e tratados com corticóides submetidos ou não a desnutridos;
- ❖ Estudar a resposta imune e celular entre grupos nutridos e desnutridos submetidos aos diferentes tipos de estresse.

REFERÊNCIAS

ALTENBURG, S.P. et al. A role adrenoceptors in the regulation of pleural neutrophilia induced by LPS. **Journal of Neuroimmunology**, v.111, p. 15-22, 2000.

ANDRADE, A.F.D. Depressão alastrante no córtex cerebral de ratos submetidos a “Dieta Básica Regional” suplementada. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 62p. [Tese Mestrado), 1998.

ANGIONI, S. et al. Corticotrophin-releasing hormone modulates cytokine release in cultured human peripheral blood mononuclear cells. **Life Science**. v.53, p.735-742, 1993.

BAI, H.; CASTONGUAY, T.W. Effects of adrenalectomy and hormone replacement on B6C3F1 mice fed a high-fat diet. **Physiol Behav**. v.72, n.4:493-8, 2001.

BARONE, A. HARPER, R.G.; WAPNIR, R.A. Placental copper transport in the rat. III: Interaction between copper and iron in materanal protein deficiency. **Placenta**. v.19, n.1;133-188, 1998.

BARRETO-MEDEIROS, J. M. et al. How does the malnutrition alter the imune system? **An.Fac.Med.Univ.Fed.Pernamb**. Recife, v.48, n.1, p.69-71, 2003.

BELLONE, G.; TRICHIERI, G. Dual stimulatory and inhibitory effect of NK cell stimulatory facotr/IL-12 on human hematopoiesis. **J. Immunol**. v.153, n.930-937, 1994.

BESEDOVSKY, H. O. et al. Immunoregulatory feed-back between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**, v.233, p.652-654, 1986.

BLALOCK, J. E. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrinology systems. **Physiol Rev**. v.69, p.1-32, 1989.

BLALOCK, J.E. Neuroimmunoendocrinology. **Chem. Immunology**. v.52, p.1-190, 1992.

BOCKMAN, D. E.; KIRBY, M. L. Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. **Science**, v.233, p.:498, 1984.

BOXWELL, J.; AYSON, P.; RAMENOFKY, M. Growth and metabolic parameters in pups of undernourished lactating rats. **Physiology and Behavior**, v.57, n.3, p.469-475, 1995.

BONDY, P. K. Disorders of the adrenal cortex. In: WILSON, J. D.; FOSTER, D. W. (Eds.) **Williams' Textbook of Endocrinology**. W. B. Saunders, Philadelphia, p. 816-890. 1985.

BOLAÑOS, F.; MARIANO, M.; BOROJEVIC, R. Protein malnutrition: Effect on myeloid cell production and cell mobilization into inflammatory reactions in mice. **Nutr Res.**, v.15, p.1477-1485, 1995.

BOLANOS-JIMENEZ, F. et al. Effects of Stress On Functional Properties Of Pre- And Postsynaptic 5-Ht1b Receptors In The Rat Brain. **European Journal of Pharmacology**. Holanda , v.294, n.2, p.531 - 540, 1995.

BORELLI, P. et al. Protein Malnutrition: Some Aspects of the in vitro adhesion of peritoneal mouse macrophages. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.42, p.367-373, 1998.

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

BRUCE, S.M.; ELIOT, S. Stress et processus pathogènes chez l'individu. **JAMA**. v.19, p.35-44,1994.

CASTILHA, L.; CRAVIOTO, A.; CRAVIOTO, J. Efectos a corto plazo de la interacción estimulación-desnutrición proteico calórica sobre el desarrollo bioquímico del sistema nervioso central. **Gaceta Medica de México**. v.155, p. 225-233, 1979.

CASTRO, M.; MOREIRA, A.C. Regulation of corticotropin-releasing hormone secretion by ACTH at different times after adrenalectomia. **Braz J Med Biol Res**. v. 29, n.11, 1573-8, 1996.

CHANDRA, R.K. Nutrition and Immunology. New York, Liss, 1989.

CHANDRA, R.K. Nutrition and the immune system: an introduction. **Am J Clin Nutr**. v.66, n.2. p.:460S-463S, 1997.

COUTINHO, E.M. Relações hospedeiro-parasito na esquistossomose mansônica em função da Dieta Básica regional: Estudo epidemiológico e anatomo-patológico. Recife, 100p. [Tese de Livre Docência], 1976.

HOUAIB, S. et al. Interleukin 12 induces the differentiation of major histocompatibility complex class I-primed cytotoxic T-lymphocyte precursors into allospecific cytotoxic effectors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.91, p. 12659-12663, 1994.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concept of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. **J. Am. Med. Assoc.** v.267, p.1244-1252, 1992.

CUMMINGS, S. et al. Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study. **J. Neurosci.**, v.3: p.1355-1368, 1983.

De CASTRO, C. M. M. B. et al. Fenspiride: An anti-inflammatory drug with potential benefits in the treatment of endotoxemia. **European Journal of Pharmacology**. França: v.94, p.669 - 676, 1995.

DE CASTRO, C.M.M.B. Eficácia de antiinflamatórios esteróides (dexametosona) e não esteróides (fenspiride e inibidor de 5-lipoxigenase) em um modelo de cobaia endotoxêmica. Fortaleza, 1997. 148p. [Dissertação Doutorado]. Universidade Federal do Ceará, 1997.

DE SIMONI, M. G. Two-way communication pathways between the brain and the immune system. **Neuroscience Research Communications**., v.21, n.3,163-172, 1997.

DE SIMONI, M.G.; IMERI, L. Cytokine – neurotransmitter interactions in the brain. **Biological Signals and Receptors**, v.7, p.33-44, 1998.

DEL REY, A., KLUSMAN, I., BESEDOVSKY, I. Cytokines mediate protective stimulation of glucocorticoid output during autoimmunity: involvement of IL-1. **Am J Physiol** v.275(4 Pt 2), p1146-51, 1998.

DESAI, B. B. et al. The IL-2 receptor II. Distribution and regulation of receptor expression. **J Immunol.** v.148, p.3125-3132, 1992.

DHABHAR, F.S. et al. Effects of stress of immune cell distribution – dynamics and hormonal mechanism. **Journal of immunology**, v.154, p.5511-5527, 1995.

DHAINAUT, J.; FAND MIRA, J.P. Étas septiques et choc infectieux. **Rev.Prat. (Paris)**. v.43, p. 7-12, 1993.

DINARELLO, C.A. Interleken-1 and its biologically related cytokines. **Adv. Immunol.** v. 44: p. 153-205, 1989.

DOBBING, J. Undernutrition and the developing brain. **American Journal of Diseases in Children**, v.120, n.1, 411-415, 1970.

DOBBING, J. Infant nutrition and later achievement. **American journal of Clinical Nutrition**, v.41, p. 477-484, 1985.

DON MASON; POWRIE, F. Control of immune pathology by regulatory T cell. **Current Opinion in Immunology**, v.10, p.649-655, 1998.

DUNN, A.; WANG, J. Cytokine effects on CNS biogenic amines. **Neuroimmunomodulation**. v.2, p.319-322, 1995.

ELENKOV, I. J. et al. Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids, and the immune/inflammatory response: acute and chronic effects. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.876, p.1-11, 1999.

GAILLARD, R. C. Neuroendocrine-immune system interactions: The immune-hipothalamo-pituitary-adrenal axis. **Trends in endocrinology and metabolism**, v. 5, n.7, p.303, 1994.

GALINOWSKI, A. Immune aspects of stress and panic. **L' Encephale**. v.29, p.147-151, 1993.

GERMANN, T. et al. Interleukin-12/ T cell stimulating factor, a cytokine with multiple effects on T helper type 1 (Th₁) but not on Th₂ cells. **Eur. J. Immunol**, v.23, p.1762-1770, 1993.

GRUNDY, P.L. et al. Glucocorticoids modulate the NGF mRNA response in the rat hippocampus after traumatic brain injury. **Brain Res.** v.892, n. 2, p.386-90 2001.

GUALILLO, O. et al. Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation. **Life Sci.** v.67, n.20, p.2433-41, 2000.

GUEDES, R.C.A.; ANDRADE, A.F.D.; CABRAL-FILHO, J.E. propagation of cortical spreading depression in malnourished rats: facilitatory effects of dietary protein deficiency. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.20. p.639-642, 1987.

HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por Métodos Laboratoriais**. 19ª.Edição, Editora Manole LTDA, 1999.

HERMAN, J. P. et al. Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **J. Neurosci.**, v.9, p.3072-3082, 1989.

HISATOMI, K.; NIYAMA, Y. Effects of postnatal, undernutrition on the catecholamine and serotonin contents of suckling rat brain. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.26, p.279-292, 1980.

HOMO-DELARCHE, F; DARDENE, M. The neuroendocrine-immune axis. **Springer Seminary Immunopathology**, v.14, p.221-238, 1993.

IVARNOVIC, D.M.; OLIVARES, M.G.; CASTRO, C.G. et al Nutrition and learning in Chilean School Children; **Chile's Metropolitan Region Survey. Nutrition.** v.12, p.5, 1996.

IRWIN, M. **Immune correlates of depression**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999.

KARANTH, S.; McCANN, S. M. Anterior pituitary hormone control by interleukin-2. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.88, p.2961-2965, 1991.

KATSUURA, G. et al. Involvement of organum vasculosum of laminae terminalis and preoptic area in interleukin-1 beta induced ACTH release. **Am. J. Physiol.** v. 258, p.163 - 171, 1990.

KAWAKAMI, K. et al. Reduced immune function and malnutrition in the elderly. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v.187, n.2, p.157-171, 1999.

LEHMANN, S. Immune function and nutrition. The clinical role of the intravenous nurse. **Journal of intravenous Nursing**, v.14, n.6, p. 406-420, 1991.

LEUBA, G.; RABINOWICZ, T. Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. I. Cellular densities, cortical volume and total number of cells. **Exp. Brain Res.**v. 37, p. 283-298, 1979a.

LEUBA, G.; RABINOWICZ, T. Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. II. Evaluation of dendritic branching and spines in the visual region. **Exp. Brain Res.** v.37, p. 299-308, 1979b.

LYNCH, G.; SMART, J.L.; DOBBING, J. Motor coordination and cerebellar size in adult rats undernourished in early life. **Brain Research**, v.83, p.249-259, 1975.

LOPES, C.; MARIANO, M.; MARKUS, R.P. Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice **Inflamm Res**. v.50, n.1, p.6-11, 2001.

MARCOS, A. The immune system in eating disorders an overview. **Nutrition**, v.13, n.10, p. 853-862, 1997.

MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Cytokines for Psychologists: Implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. **Psychological Review**, v.105, n.1, p.83-107, 1998.

MATERA, L. Action of Pituitary and Lymphocyte Prolactin. **Neuroimmunomodulation Review**. v.4 p.171-180, 1997.

MULCHAHEY, J. J. et al. Coordinate and Divergent Regulation of Corticotropin-releasing Factor (CRF) and CRF-Binding protein expression in an immortalized amygdalar neuronal cell line. **The Endocrinology Society**. v.140, n.1, p. 251-259, 1999.

MURPHY, K. M. T lymphocyte differentiation in the periphery. **Current Opinion in Immunology** v.10, p. 226-232, 1998.

OTTAVIANI, E.; FRANCESCHI, C. The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. *Progress in Neurobiology*. v.48: p.421-440, 1996.

OTTAVIANI, E; FRANCESCHI, C. The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems. **Immunol. Today**. v.18, n.4, p. 169-174, 1997.

OTTAVIANI, E; FRANCHINI, A.; GENEDANI, S. ACTH and its role in immune-neuroendocrine functions. A comparative study **Current Pharmaceutical Design** v.5, p.673-681, 1999.

PADGETT, E.L.; SIBLEY, D.A.; JERRELLS, T.R. Effects of adrenalectomy on ethano-associated changes in lymphocyte cell number and subpopulations in thymus, spleen and gut-associated lymphoid tissues. **Int J Immunopharmacol**. v.22, n.4, p. 285-98, 2000.

PESSOA, D.C.N.C. Efeitos da desnutrição pela Dieta Básica Regional (DBR), em três gerações de ratos, sobre a reprodução, crescimento corporal e desenvolvimento de órgãos. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. [Tese Mestrado], 118p 1997.

REDDY, P.V.; DAS, A.; SASTRY, P.S. Quantitative and compositional changes in myelin of undernourished and protein malnourished rat brains. **Brain Res.** v.161, p.227-235, 1979.

ROCHA-DE-MELO, A.P.; GUEDES, R.C.A. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, p. 663-669, 1997.

ROITT, IM. Imunologia/Ivan Roitt, Jonathan Brostoff, David K. Male. 3.ed São paulo; Manole, 1997.

SACEDÓN, R.; VICENTE, A.; VARAS, A.; JIMÉNEZ, E.; MUÑOZ, J.J.; ZAPATA, A.G. Early maturation of T-cell progenitors in the absence of glucocorticoids. **Blood.** v.94, n.8, p. 2819-26, 1999.

SALAMITA, W. et al. Early Nutricional Experiments: effects on the Humoral and celular Immune responses in Mice. **J Nutr.** v.113, p.1131-1139, 1983.

SMART, J.L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. **Brain. Research.** v.28, n.1, 1971a.

SMART, J.L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. VI. Relative effects of foetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. **Brain. Res.**, v.33, p. 303 – 314, 1971b.

SANTOS, A.Q. Desnutrição precoce e estresse agudo: aspectos da resposta Imunitária em ratos adultos, Recife: Universidade Federal de Pernambuco. [Tese Mestrado], 2000.

SCHÖBITZ, B.; De KLOET, E. R.; HOLSBOER, F. Gene expression and function and interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor in the brain. **Progress in Neurobiology.** v.44, p.397, 1994.

SERUFO, J.C. et al. Dengue: uma nova abordagem. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.33, n.5, p. 65-476, set-out, 2000.

SPINEDI, E.; GAILLARD, R.C. A regulatory loop between the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis and circulating leptin: a physiological role of ACTH. **Endocrinology**. v.139, n.9, p. 4916-20, 1998.

TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Cytokine receptors and signal transduction. **FASEB Journal**, v.6, p.3387-3396, 1992.

TEODÓSIO, N.R. et al. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Arch. Latinoam. Nutr.** v.40, n.4, p. 533-547, 1990.

TESHIMA, S. et al. Alteration of the respiratory burst and phagocytosis of macrophages under protein malnutrition. **Cellular Immunology**, v.139, n.2, p. 493-504, 1992.

VIZI, E. S. Receptor-mediated local fine-tuning by noradrenergic innervation of neuroendocrine and immune systems. **Annals of the New York Academy of sciences**, v.851, p.388-396, 1998.

WEIGENT, D.A; BLALOCK, J.E. Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors. **Immunological Review**, v.100, p.79-108, 1987.

WEISS, S.T. Tissue destruction by neutrophils. **N Engl J Med** v.300, p.365-76, 1989.

WILSON, J.L.; CARMODY, J.J.; WALKER, J.S. The importance of the hypothalamo-hypophyseal-adrenal axis to the anti-inflammatory actions of the kappa-opioid agonist PNU-50, 488H in rats with adjuvant arthritis. **J Pharmacol Exp Ther.** v.294, n.3, p. 1131-6, 2000.

ZOU, J. et al. Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta 1 and beta 2 JAK. **J. Biol. Chem.** v.272, p.6073-6077, 1997.

1. O formato das referências bibliográficas desta dissertação, seguiu as normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Origem: NRB 6023:2002.

2. A estrutura dos elementos textuais desta dissertação, seguiu as normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Origem: NRB 14724:2002.

ANEXOS

ANEXO 1 - Resumos e trabalhos apresentados e publicados em congressos

1 – página 458

25.027

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ESTRESSORES SOBRE O PADRÃO LEUCOCITÁRIO (PL) E A TEMPERATURA RETAL (TR) EM RATOS ADULTOS. Ferreira E Silva, W. T.; Maria do Silvatelles, A.ª; da Silva, R. R.ª; Ferreira, F.da M.ª; Castro, C. M. M. B. D.ª; Manhães de Castro, R.ª, Ciências Biológicas, UFPE - PE, Medicina Tropical, UFPE - PE, Nutrição, UFPE - PE.

Objetivo: No presente estudo, nós avaliamos o PL e a TR de ratos submetidos a diferentes estressores.

Métodos e Resultados: Ratos Wistar, entre 90-120 dias, foram submetidos aos estresses: orgânico (administração i.p. de LPS 1mg/Kg, GLPS, n=6) e psicológico (contenção em cilindro de PVC/40min, GEC, n=8) ou não (GC, n=10). Após 24 horas, foi medida a TR de cada rato, em seguida, foram coletadas amostras do sangue periférico para determinação da contagem total (CTL, x10³) e diferencial (CDL, %) de leucócitos. Dados foram representados em medianas (valor máx.-min.) Para análise estatística, foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis (p<0,05). Na CTL, o GLPS 12 (13-7) foi maior do que GC 6(8-4) e GEC 6(14-5). Na CDL, houve diferença apenas para linfócitos (L) e neutrófilos (N). L: GLPS 60(77- 27) foi < GC 79(88-68); e N: GLPS 37,5(69-22) aumentou em relação a GC 17,5(31-10) e GEC 27,5(42-11). TR: GLPS 37(37-36,5) foi > GC 35,5 (36-32) e GEC 36(36,7-35,2).

Conclusões: Os processos infecciosos, assim como o LPS, induzem hipertermia, leucocitose e neutrofilia, fundamentais na resposta do hospedeiro à infecção. Neste trabalho, os resultados parciais mostraram que o estresse pelo LPS parece propiciar maior alteração leucocitária e de temperatura que o estresse de contenção.

Apoio financeiro: PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, CNPq

2 – página 263

01.327

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ESTRESSORES SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS (PH) EM RATOS ADULTOS. Maria do Silvatelles, A.; Ferreira E Silva, W. T.; Mudo, C. E. G.; Soares, T. M.; Castro, C. M. M. B. D.; Manhães de Castro, R., Ciências Biológicas, UFPE - PE, Medicina Tropical, UFPE - PE, Nutrição, UFPE - PE.

Objetivo: No presente estudo, nós avaliamos os efeitos de diferentes estressores sobre PH em ratos.

Métodos e Resultados: Ratos Wistar, entre 90-120 dias, foram submetidos aos estresses: biológico (administração i.p. de LPS 1mg/Kg, GLPS, n=6) e psicológico (contenção em cilindro de PVC/40min, GEC, n=8) ou não (GC, n=10). Após 24 horas, foram coletadas amostras do sangue periférico para determinação dos valores de: hemácias (x10³), hemoglobina (g/dl), hematócrito-Ht (%), plaquetas-PI (x10⁵) e a contagem total-CTL (x10³) e diferencial-CDL (%) de leucócitos. Dados foram representados em medianas (valor máx.-mín). Para análise estatística, foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis (p<0,05). O GLPS apresentou maior nº de Ht 47 (52-45) em relação a GEC 40 (48-37) e menor nº de PI 2 (4-1), quando comparado a GC 6 (9-4) e GEC 6 (1-3). Nas CTL, GLPS 12 (13-7) foi maior do que GC 6 (8-4) e GEC 6 (14-5). No CDL, houve diferença apenas para linfócitos (L) e neutrófilos (N). No %L, GLPS 60 (77-27) foi > GC 79 (88- 68) e %N, GLPS 37,5 (69-22) aumentou em relação a GC 17,5 (31-10) e GEC 27,5 (42-11).

Conclusões: O PH indiretamente indica ativação do sistema imune (SI). Os resultados parciais mostraram que o estresse biológico parece propiciar maior alteração no PH. Todavia, estudos são necessários para informar se esses efeitos no SI são duradouros.

Apoio Financeiro: CNPq, PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

ANEXO 2 - Trabalhos publicados em Revistas Indexadas

1

| Bras Patol Med Lab • v. 40 • n. 2 • p. 123-5 • abril 2004



Altered lectin-binding sites in normal colon and ulcerative colitis

Recebida em 03/04/03
 Última revisão em 31/07/03
 Aceito para publicação em 02/09/03
 Publicado em 20/04/04

Alteração dos sítios de ligação da lectina no cólon normal e na colite ulcerativa

Mario R. Melo-Júnior¹; Adriana M. S. Telles²; Francisco E. B. Albuquerque³;
 Nicodemos T. Pontes-Filho⁴; Luiz B. Carvalho Jr.⁵; Eduardo I. C. Beltrão⁵

Key words abstract

Ulcerative colitis
 Lectin histochemistry
 Image analysis
 Diagnosis

The aim of this study was to evaluate the expression of carbohydrates via lectin histochemistry and computer image analysis in normal colon and ulcerative colitis. Sections of human intestinal tissues (4µm) were incubated with lectins (Con A, WGA, LTA and PNA) and evaluated through optical microscopy. Staining results were analysed using an image analysis programme. The results showed a positive intense staining pattern to the inflammatory cells, mainly neutrophils of sigmoid and rectum portion of colon as well as epithelial gland cells. WGA and LTA lectins showed distinct patterns between normal gland epithelium and ulcerative colitis. PNA and Con A failed to recognize carbohydrate moieties in studied cases. The results were also confirmed by the image analysis. The observations reported here suggest that WGA and LTA lectins are promising histologic markers to differentiate normal gland epithelium from inflammatory ulcerative colitis regarding the differences observed in the expression of N-acetylglucosamine and L-fucose.

resumo unitermos

O presente trabalho objetivou, através de histoquímica com lectinas e análise digital de imagens, avaliar a expressão de carboidratos em amostras de colo normal e com colite ulcerativa. A partir de fragmentos de mucosa intestinal foram obtidos cortes histológicos (4µm) que foram incubados com lectinas (Con A, WGA, LTA e PNA), e os resultados das marcações foram avaliados através de microscopia óptica e sistema de análise de imagens. Os resultados obtidos revelaram uma intensa marcação para as células inflamatórias, principalmente neutrófilos infiltrados no tecido de reto e sigmóide, bem como células das glândulas intestinais. As lectinas WGA e LTA exibiram padrões distintos de marcação entre o epitélio normal e os casos de colite ulcerativa. As lectinas PNA e Con A falharam em reconhecer os carboidratos celulares nos casos estudados em ambos os grupos. Os resultados obtidos foram confirmados pela análise de imagem. As observações obtidas sugerem que as lectinas WGA e LTA são marcadores promissores para diferenciar o epitélio normal do padrão inflamatório da colite ulcerativa, indicando uma expressão distinta de N-acetilglucosamina e L-fucose nos respectivos casos estudados.

Colite ulcerativa
 Histoquímica com lectinas
 Análise digital de imagens
 Diagnóstico

1. Mestre em Anatomia Patológica, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE).
2. Professor-adjunto do Departamento de Patologia do CCS/UFPE.
3. Professor-adjunto do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE.
4. Professor-titular do Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da UFPE.
5. Doutor em Ciências Biológicas, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)-UFPE.

The inflammatory bowel diseases, Crohn's disease and ulcerative colitis are complex multifactorial traits involving environmental, genetic and pathobiochemical factors^(11, 14).

Ulcerative colitis is associated with abnormalities of mucin synthesis and secretion, features that may also be associated with malignant changes⁽⁸⁾, alterations in the metabolism of lipids, carbohydrates and proteins, leading to injuries in tissues⁽⁹⁾.

Glycoconjugates are integral components of cell membrane and act as receptors of different compounds (e.g., lectins, antibodies, galectins) and regulate cell-to-cell interactions. The stage of differentiation and maturity of a cell is reflected in the structure of cell-surface glycoconjugates^(6, 17). Carbohydrates are mainly found in glycoproteins and glycolipids presenting a high complexity and structural variability. They also function as signals in cells which have undergone alterations⁽¹³⁾.

Lectins are (glyco)proteins that recognize carbohydrates. Lectin-binding patterns are altered as response of changes in glycoproteins expression accompanying cell maturation and/or disease^(1, 16, 18).

In histochemistry lectins have been used as tissue markers under neoplastic transformation⁽²⁾. Lectin binding to human colonocytes can predict malignant and premalignant lesions of colon and has potential as a non-invasive screening tool for colorectal neoplasms⁽⁵⁾.

In this study we evaluated the composition of carbohydrates in cell surface using lectin histochemistry and computer image analysis in intestinal biopsies of normal colon ($n = 6$) and ulcerative colitis ($n = 7$). Surgical specimens ($\pm 0.3\text{cm}^2$) were obtained from different patients of both sexes (mean age: 55 years old). Biopsies were fixed in buffered formalin, processed according to routine laboratory procedure and embedded in paraffin. Tissues section ($4\mu\text{m}$) were adhered to albumin-treated glass slides and kept at 35°C until use. Haematoxylin and eosin staining was used for diagnosis.

Lectin histochemistry was developed using Concanavalin A (Con A), wheat germ agglutinin (WGA), *Lotus tetragonolobus* agglutinin (LTA) and peanut agglutinin (PNA) conjugated to peroxidase (Sigma Chemical Company, USA). Slices were deparaffinized in xylene and hydrated through graded alcohol. Tissue sections were treated with 0.1% (w/v) trypsin solution, followed by 0.3% (v/v) methanolic hydrogen peroxide solution and incubated with the lectins (Con A, $50\mu\text{g}/\text{mL}$; WGA, LTA and PNA, $25\mu\text{g}/\text{mL}$) for two hours. Peroxidase was visualized with diaminobenzidine

(DAB) and hydrogen peroxide in PBS. Tissue sections were counterstained with haematoxylin and evaluated through optical microscopy. Lectin-binding inhibition assays were performed using the corresponding lectin-specific sugar: methyl- α -D-mannoside, N-acetylglucosamine, D-galactose and L-fucose for Con A, WGA, PNA and LTA, respectively, at final concentration of 300mM .

Images of histological slices were captured using a digital video camera (Sony-USA) connected to a microscope and were processed using the OptimasTM 6.1 (Optimas Corporation, USA) image analysis programme. Lectin-binding patterns were used to calculate the mean area of stained cells (μm^2) and the mean number of cells⁽¹⁵⁾. Semi-quantitative optical analysis was carried out taking account the intensity (I), indicated as weak (+), moderate (++) or intense (+++), according to Özer *et al.*⁽¹⁰⁾.

Our results showed an intense positive staining pattern to inflammatory cells, mainly neutrophils, of sigmoid and rectum portion of colon as well as epithelial gland cells. PNA and Con A failed to recognize carbohydrate moieties in the studied cases. WGA and LTA showed distinct patterns between normal gland epithelium and inflammatory tissue pattern of ulcerative colitis. In ulcerative colitis, WGA binding was observed in the gland cells of intestinal crypts while PNA recognized the inflammatory cells; in both cases the binding pattern was intense. Normal glands were weakly recognized by LTA (Table). Image analysis of ulcerative colitis showed that a higher number of cells were recognized by LTA (19.78 ± 4.08) followed by WGA (18.23 ± 3.25). The same profile was observed for the mean area, 18.26 ± 5.02 and 15.08 ± 4.14 , respectively for LTA and WGA. Image analysis for normal gland was coherent with the results observed in lectin histochemistry method. Unspecific inflammations were also recognized by WGA and LTA (weak intensity) but not by Con A and PNA. The results of image analysis confirmed the semi-quantitative results observed for these samples.

Table Lectin histochemistry of the ulcerative colitis and normal gland epithelium

	Lectin staining patterns			
	Con A ^a	WGA ^b	LTA ^b	PNA ^b
Normal gland ($n = 6$)	-	-	+	-
Ulcerative colitis ($n = 7$)	-	+++	+++	-

none (-); weak (+); moderate (++); intense (+++); a: $50\mu\text{g}/\text{ml}$; b: $25\mu\text{g}/\text{ml}$.

Preliminary experiments with normal and diseased intestinal tissues exhibited differential lectin-binding patterns^(3, 12) as observed in our study. The increasing PNA binding from unspecific inflammations up to colorectal carcinomas was already observed. In contrast to normal colon and colorectal mucosa, PNA reactive glycoconjugates are commonly expressed in most colorectal carcinomas and in some pre-malignant conditions such as adenomas and ulcerative colitis⁽⁷⁾. Changes in carbohydrate moieties of glycoconjugates in ulcerative colitis and Crohn's disease are associated with increased risk for colorectal cancer. Consequences of these changes may be relevant not only for cell-surface glycoconjugates but also for intracellular glycoconjugates⁽⁴⁾.

Our findings are in accordance with those observations. In this study WGA also presented a recognition pattern for diseased tissues. Our results indicate differences in the carbohydrate expression. N-acetylglucosamine was

absent or not accessible, for lectin recognition, in normal tissues, as well as mannosides and galactose. L-fucose was found in the intestinal crypts of normal glands. WGA and LTA indicated a high expression of N-acetylglucosamine in gland cells in ulcerative colitis; and L-fucose, in inflammatory cells in ulcerative colitis and gland cells in the normal counterpart.

The results reported here indicate differences in the expression of N-acetylglucosamine and L-fucose in normal and sick tissues and suggest that WGA and LTA lectins are promising histological markers to differentiate normal gland epithelium from inflammatory tissue of ulcerative colitis.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq (CTPetro nº 463655/001). The authors thank Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti for technical assistance.

References

- BELTRÃO, E. I. C. et al. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumor. *Eur J Histochem*, v. 47, n. 2, p. 139-42, 2003.
- BROOKS, A. S. The involvement of *Helix pomatia* lectin (HPA) binding N-acetylgalactosamine glycan in cancer progression. *Histol Histopathol*, v. 15, n. 1, p. 143-58, 2000.
- CAMPBELL, B. J. et al. Direct demonstration of increased expression of Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in colonic adenocarcinoma and ulcerative colitis mucin and its concealment in normal mucin. *J Clin Invest*, v. 95, p. 571-6, 1995.
- CAMPBELL, B. J. et al. Altered glycosylation in inflammatory bowel disease: a possible role in cancer development. *Glycoconj J*, v. 18, n. 11-12, p. 851-8, 2001.
- DESILETS, D. J. et al. Lectin binding to human colonocytes is predictive of colonic neoplasia. *Am J Gastroenterol*, v. 94, n. 3, p. 744-50, 1999.
- JENSEN-JAROLIM, E. et al. The constitutive expression of galectin-3 is down regulated in the intestinal epithelia of Crohn's disease patients, and tumour necrosis factor alpha decreases the level of galectin-3-specific mRNA in HCT-8 cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, v. 14, n. 2, p. 145-52, 2002.
- KELLOKUMPU, I. H. et al. Detection of colorectal neoplasm with peanut-agglutinin (PNA) reactive carbohydrate structures in rectal mucus. *Int J Cancer*, v. 74, n. 6, p. 648-53, 1997.
- McMAHON, R. F. T. et al. South Asians with ulcerative colitis exhibit altered lectin binding compared with matched European cases. *Histochem J*, v. 29, n. 6, p. 469-77, 1997.
- NANGIA-MAKKER, P. et al. Carbohydrate-binding proteins in cancer and their ligands as therapeutic agents. *Trends Mol Med*, v. 8, n. 4, p. 187-92, 2002.
- ÖZER, E. et al. Effects of prenatal exposure on neuronal migration, neurogenesis and brain myelination in the mice brain. *Clin Neuropathol*, v. 19, n. 1, p. 21-5, 2000.
- RECTOR, A. et al. Mannan-binding lectin (MBL) gene polymorphisms in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Genes Immunity*, v. 2, n. 6, 323-8, 2001.
- SAID, I. T. et al. Comparison of different techniques for detection of Gal-GalNAc, an early marker of colonic neoplasia. *Histol Histopathol*, v. 14, n. 2, p. 351-7, 1999.
- SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. *Scientific Amer*, v. 268, p. 74-81, 1993.
- SINGH, R. et al. Cell surface-expressed Thomsen-Friedenreich antigen in colon cancer is predominantly carried on high molecular weight splice variants of CD44. *Glycobiol*, v. 11, n. 7, p. 587-92, 2001.
- Van BEMMEL, J. H.; MUSEN, M. A. Biostatistical methods. In: *Handbook of medical informatics*. Germany: Springer-Verlag (Ed.), 1997. p. 387-96.
- WRÓBLEWSKI, S. et al. Biorecognition of HEMA copolymer-lectin conjugates as an indicator of differentiation of cell-surface glycoproteins in development, maturation, and diseases of human and rodent gastrointestinal tissues. *J Biomed Mater Res*, v. 51, p. 329-42, 2000.
- WRÓBLEWSKI, S. et al. Potential of lectin-N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer-drug conjugates for the treatment of pre-cancerous conditions. *J Control Rel*, v. 74, p. 283-93, 2001.
- WRÓBLEWSKI, S. et al. The influence of a colonic microbiota on HEMA copolymer-lectin conjugates binding in rodent intestine. *J Drug Target*, v. 9, n. 2, p. 84-94, 2001.

Mailing address

Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
Universidade Federal de Pernambuco
Av. Moraes Rêgo s/n - Campus Universitário
CEP 50670-910 - Recife-PE - Brasil
Phone/fax: (81) 3271-8484/3271-8485
e-mail: ebeltrao@hotmail.com

HOW DOES THE MALNUTRITION ALTER THE IMMUNE SYSTEM?

Jairza Maria Barreto-Medeiros¹
 Célia Maria Machado Barbosa De-Castro²
 Adriana Maria da Silva Teles³
 Eduardo José Nepomuceno Montenegro¹
 Raul Manhaes-de-Castro³

Barreto-Medeiros JM, De-Castro CMBB, Teles AMS, Montenegro EJM, Manhaes-de-Castro R. How does the malnutrition alter the immune system? *An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb. Recife*, 48(1), p.69-71, 2003.

ABSTRACT: The nutritional state is one of the principal factors that can affect the functioning of the immune system and consequently to alter the capacity of the organism to win the aggressions of the milieu. That is due to the fact that the cells of the immune system as the cells of any other system depend on nutrients for its appropriate function. The present work makes a revision of as the malnutrition it can alter the immune system.

KEYWORDS: Malnutrition; Immune system.

INTRODUCTION

Happening in the first years of the man's life, the malnutrition (M) can have serious consequences for the organism, because that period is characterized by intense growth process and systemic development¹. During that specific period, the growth is fast and the needs of calories and proteins are larger¹. Like this, in that phase of the life, nutritional aggressions can cause alterations in functioning of organs and systems (among them, the immune system), which play important role for maintenance of the homeostasis and integrity of the body. The effects of the M on the immune system will be discussed in this work.

In the last 30 years, studies have been confirming that deficiency of nutrients harms the immune response and takes to frequent infections that result in mortality, especially in children⁹. The complex interactions among nutrition, infection and immunity are not still well understood. In that context, it is difficult to determine the specific role of each one of the involved factors. The infections induce to great metabolic alterations that result in nitrogen negative balance. On the other hand, the M of any origin can result in alteration of the immune response⁸.

Smythe and colls observed in children undernourished atrophy in the tonsils and reduction in the rate of transformation of lymphocytes²⁶. Reduction of the size and weight of the thymus during the M are also observed by other researchers²³. A decrease in the weight of the spleen was observed in rats submitted to the diet with low percentage in proteins²⁰. Chandra (1997) refers that, in the protein-energy M, there is also a significant loss of the lymphoid cells in the spleen, in the lymphnodes and in the thymus-dependent paracortical areas⁸.

In the protein-energy M there is a significant damage of several aspects of the immune response, including: decrease of lymphocytes, smaller titles of antibodies in response to vaccines, alteration of the phagocytic function, decrease of the activity of the complement and of the cytokine production^{7,9,17}.

Most of the studies demonstrate that the M seems to have a particularly vast effect on the immunity mediated by cells^{22,24}. Consequently, undernourished individuals are more susceptible to infection for obligatory intracellular pathogens. In mice, submitted to the moderate restriction of calories and proteins, a decrease was observed in the

¹Doutorando(a) em Nutrição - UFPE.

²Profa. Adjunta do Depto de Medicina Tropical - UFPE

³Prof. Adjunto de Fisiologia da Nutrição do Depto de Nutrição - UFPE

Correspondência: Célia M. M. Barbosa de Castro. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, CEP 50670-901 PE, Brasil, Fax: 55 81 32718485 E-mail: ccastro@lika.ufpe.br

1 - ARTIGO DE REVISÃO

immunity mediated by cells¹⁰. According to Keusch (1981), a significant damage in the immunity mediated by the cells T, it is also observed in the severe M¹⁶. In the same way, Chandra (1997) tells that in the M there is a reduction in the proportion of T-helper lymphocytes and in the number of T-suppressor cells⁸.

The macrophages play an important part in the defense of the host¹¹. However, researches have been demonstrating that in the M several functions are harmed in these cells^{21,2}. Reynolds et al. (1992) observed that the protein deficiency harms the activation of the macrophages²¹. This damage can commit the immune effector mechanisms, dependent of the macrophage activation, including rejection of intracellular pathogens. Besides, the macrophages number in the exudato peritoneal is reduced in undernourished animals²¹. In undernourished patients, it has also been observed a retard and a decrease in the mobilization of the monocytes²⁶. In rats, submitted to the protein privation, they were also found quantitative reductions, bankruptcy of the maturation and decrease of the proliferate capacity of the cells of Kupffer¹⁴.

The macrophage is the largest source of liberation of IL-1, a cytokine that acts increasing the proliferation of the T lymphocytes. Reynolds and collaborators (1992) observed that, in rats, the protein deficiency harms the production and, consequently, the activity of IL-1 in response to endotoxins²¹. Besides, the production of TNF for activated macrophages, it is also harmed in the M process³.

The migration and the cellular adhesion are two important stages in the phagocytic process. However, in mice submitted to the protein deficiency, it was observed decrease in the fibronectin expression and reduction in the adhesion of macrophages². It was verified in experimental research that dietary restriction for 7 days reduces the expression of molecules of adhesion of polymorphonuclear neutrophils in the cavity peritoneal, in rat¹⁵. This implicates in damage of the response mediated by those phagocytes.

The complement system is another component of the immune system that can be altered in the M. The concentration and activity of most of the components of the complement are reduced in the nutritional depletion. Studies in children showed a reduction of the activity and of the components of the complement¹⁶. Besides the alterations mentioned previously, the cutaneous response

of late hypersensitivity is quite depressed in the M⁶. Nohr and colls (1985), investigating in mice, the effects of short period of nutritional privation on the immunity, observed that the test of late cutaneous hypersensitivity and the responses to specific antigens were depressed¹⁹. In that study the nutritional recovery was enough to recuperate the corporal weight, but it didn't correct the appraised parameters, of the immune response.

Chandra (1991) refers that, for most of the authors, the humoral immunity is not affected directly by the protein-energy M, particularly when the antigen is not thymus-dependent⁵. According to Stiehm (1980), the B lymphocytes subpopulations, the serum IgA and IgG levels and immunoglobulin synthesis and metabolism are usually normal or increased in the M²⁷. Nahani and collaborators (1996) investigating the relationship between nutritional state and immune response in children, they observed that the immunoglobulins G and D were normal in the moderate and severe M, however IgA was just elevated in the serious M¹⁸.

Salimata and colls (1983) investigating in mice, the effects of a deficient alimentary ingestion, during the suckling period, on the immune response, observed that the animals maintained with an insufficient feeding, they presented a the depressed humoral immunity; the same not being observed with relationship to the animals nutritionally recovered²³. As referred them researchers, the protein-energy M for short period, same induced in the critical period of development of the immune system, relatively, it produces smaller effect.

Besides the effects of the M mentioned previously, several studies have been demonstrating that the M can alter the nervous system and the endocrine system^{1,12}. In the same way, undernourished rats in the critical period of development of the encephalon were not affected for anorexia induced by SSRI in the adult life¹. Likewise, in a recent article, we observed that M during the suckling period causes reduction in the corticosterone levels in adult rats¹². As the interaction among the physiologic systems (particularly Nervous System, Endocrine System and Immune System) can interfere in the immune response^{12,13} we can conclude that the immune alterations provoked by the deficit nutritional, they cannot just be consequence of the lack of nutrients for the immune cells, but also of neuro-endocrine disturbances that happen in the M.

Barreto-Medeiros JM, De-Castro CMBB, Teles AMS, Montenegro EJM, Manhães-de-Castro R. Como a desnutrição altera o sistema imune? An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb. Recife, 48(1), p.69-71, 2003.

RESUMO: O estado nutricional é um dos principais fatores que pode afetar o funcionamento do sistema imune e conseqüentemente alterar a capacidade do organismo de vencer as agressões do ambiente. Isso se deve ao fato de que as células do sistema imunológico como as células de qualquer outro sistema, dependem de nutrientes para o seu funcionamento apropriado. O presente trabalho faz uma revisão de como a desnutrição pode alterar o sistema imunológico.

UNITERMOS: Desnutrição; Sistema imune.

REFERENCES

1. Barreto Medeiros JM, Cabral Filho JE, De Souza SL, Freitas Silva SR, Mendes da Silva C, Deiró TCBJ et al. Early malnourished rats are not affected by anorexia induced by a selective serotonin reuptake inhibitor in adult life. *Nutr Neurosci* 2002; 5:211-214.
2. Borelli P, Souza IP, Borojevic R, Dagli MLZ, kang HC. Protein Malnutrition: Some Aspects of the in vitro adhesion of peritoneal mouse macrophages. *Ann Nutr Metab* 1998; 42: 367-373.
3. Bhaskaram P, Sivakumar B. Interleukin-1 in malnutrition. *Arch Dis Child* 1986; 61:182-5.
4. Brown JL, Pollitt E. Malnutrition, poverty and intellectual development. *Sci Am* 1996; 38-43.
5. Chandra RK: 1990 McCollum aware lecture: nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am. J. Clin. Nutr* 1991; 53:1087.
6. Chandra RK. Protein – energy malnutrition and immunological responses. *J. Nutr* 1992; 122: 597-600.
7. Chandra RK, Kumari S. Nutrition and immunity: An overview. *J Nutr* 1994; 124: 1433-1435.
8. Chandra RK. Nutrition and immune system: na introdução. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 460 - 463.
9. Chandra RK. Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again. *Proc Nutr Soc* 1999; 58:681-3.
10. Conge GA, Gouache P, Lagrange PH, Lemonnier D. Effect of moderate protein-calorie deprivation on cell-mediated immunity in mice. *Ann Nutr Metab* 1983; 27:286-95.
11. De-Castro CMB, Manhães de Castro R, Medeiros AF, Queirós Santos A, Silva WTF, Lima Filho JL. Effect of stress on the production of O2 in alveolar macrophages. *J Neuroimmunol* 2000; 108: 68-72.
12. De-Castro CMB, Manhães de Castro R, Queirós Santos A, Barreto-Medeiros JM, Silva WTF, Teles MAS et al. Neonatal Malnutrition Reduces Superoxide Production of Alveolar Macrophages in Adult Life. *Free Radic Res*, 2003. "in press".
13. De Simoni MG. Two-way communication pathways between the brain and the immune system. *Neurosci Res Commun* 1997; 21: 163-172.
14. Honda Y, Takahashi K, Naito M, Fujiyama S. The role of macrophage colony-stimulating factor in the differentiation and proliferation of Kupffer cells in the liver of protein-deprived mice. *Lab Invest* 1995; 72:696.
15. Ikeda S, Saito H, Fukatsu K, Inoue T, Han I, Furukawa S, Matsuda T, Hidemura A. Dietary restriction impairs neutrophil exudation by reducing CD11b/CD18 expression and chemokine production. *Arch Surg* 2001; 136 :297-304.
16. Keusch GT. Host defense mechanisms in protein energy malnutrition. *Adv Exp Med Biol* 1981; 135:183-209.
17. Lesourd MB. Nutrition and immunity in the elderly: modification of immune responses with nutritional treatments. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 478-484.
18. Nahani J, Nik-Aeen A, Rafii M, Mohagheghpour N. Effect of malnutrition on several parameters of the immune system of children. *Nutr Metab* 1976; 20:302-6.
19. Nohr CW, Tehervenkov JI, Meakins JL, Christou NV. Malnutrition and humoral immunity: Short-term acute nutritional deprivation. *Surgery* 1985; 14-16.
20. Pessoa DCNC. Efeitos da desnutrição pela Dieta Básica Regional (DBR), em três gerações de ratos, sobre a reprodução, crescimento corporal e desenvolvimento de órgãos. Tese (Doutorado em Nutrição) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife 1997; p.118.
21. Revillard JP, Cozon G. Experimental models and mechanisms of immune deficiencies of nutritional origin. *Food Addit Contam* 1990; 1:82-6.
22. Rikimaru T, Taniguchi K, Yartey JE, Kennedy DO, Nkrumah FK. Humoral and cell-mediated immunity in malnourished children in Ghana. *Eur J Clin Nutr* 1998; 52:344-50.
23. Salimata W, Lemonnier D, Bleiberg F, Delorme J. Early Nutritional Experiments: Effects on the Humoral and Cellular Immune Responses in Mice. *J Nutr* 1983; 113: 1131-1139.
24. Scrimshaw NSE, Sangiovanni JP. Synergism of nutrition, infection, and immunity: na overview. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 464-477.
25. Sirisinha S, Edelman R, Suskind RM. Complement and C3-proactivator levels in children with protein calorie malnutrition and effect of dietary treatment. *Lancet* 1973; 1:1016-9.
26. Smythe PM, Brereton-Stiles GG, Grace HJ. Thymo-lymphatic deficiency and depression of cell-mediated immunity in protein-calorie malnutrition. *Lancet* 1971; 11:939-43.
27. Stiehm ER. Humoral immunity in malnutrition. *Fed Proc* 1980; 39: 3093-7.

Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Ciências da Saúde
 Prof. Moraes Fogaça
 Cidade Universitária - Recife - PE.

ANEXO 3 - Trabalho Aceito para Publicação em Revista Indexada

1

Free Radical Research

Official Journal of the Society for Free Radical Research – European Region
Managing Editors, Barry Halliwell and Helmut Sies

Manuscript Number: HB 3072

14 August 2003

Dr. Célia M. M. B. De-Castro
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
Universidade Federal de Pernambuco
Recife, CEP 50670-901 PE
Brazil

Dear Dr. De-Castro

We are pleased to have received your manuscript entitled "Neonatal Malnutrition Reduces Superoxide Production of Alveolar Macrophages in Adult Life" on 11 August 2003.

Please e-mail an electronic version of your paper to Professor Frank J Kelly (E-mail: frank.kelly@kcl.ac.uk) who shall be the editor immediately as Prof. Kelly will be on holiday for two weeks from tomorrow night.

Thank you for allowing *FRR* to see your paper.

Yours sincerely

Professor Barry Halliwell
Managing Editor
Department of Biochemistry
Faculty of Medicine
National University of Singapore
MD 7 #03-15, 8 Medical Drive
Singapore 117 597
Tel: +65 6874 3247
Fax: +65 6874 1453
E-mail: bhalliwell@nus.edu.sg

 Taylor & Francis
healthsciences