

**RAFAELLA RODRIGUES BARRETO**

**INFLUÊNCIA DA MÁ-NUTRIÇÃO SOBRE AS  
RESPOSTAS INFLAMATÓRIA AGUDA E SUBCRÔNICA  
E NA EFICÁCIA FARMACOLÓGICA DA  
INDOMETACINA EM RATOS**

**RECIFE**

**2011**

RAFAELLA RODRIGUES BARRETO

**Influência da Má-Nutrição sobre as Respostas Inflamatória  
Aguda e Subcrônica e na Eficácia Farmacológica da  
Indometacina em Ratos**

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

Orientador (a ): Profa. Dra. Maria  
Bernadete de Sousa Maia  
Co-orientador (a): Profa. Dra.  
Teresinha Gonçalves da Silva

RECIFE

2011

Barreto, Rafaella Rodrigues

Influência da má-nutrição sobre as respostas inflamatória aguda e subcrônica e na eficácia farmacológica da indometacina / Rafaella Rodrigues Barreto. – Recife: O Autor, 2011.

93 folhas: il., fig.; 30 cm.

Orientador: Maria Bernadete de Sousa Maia  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2011.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Desnutrição precoce. 2. Inflamação. 3. Indometacina. I. Maia, Maria Bernadete de Sousa. II. Título.

616.39

CDD (20.ed.) CCS2011-201

UFPE



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

Av. Prof. Moraes Barros s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-911 - Recife - PE  
Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - Anexo  
Fone/Fax: (51) 32124-0029  
<http://www.patologia.ufpe.br> <http://www.ufpe.br>



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

**AUTORA: RAFAELLA RODRIGUES BARRETO**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA**

**NOME DA DISSERTAÇÃO: "INFLUÊNCIA DA MÁ-NUTRIÇÃO SOBRE AS  
RESPOSTAS INFLAMATÓRIA AGUDA E SUBCRÔNICA E NA EFICÁCIA  
FARMACOLÓGICA DA INDOMETACINA EM RATOS".**

**ORIENTADORA: Prof.ª. Dr.ª. MARIA BERNADETE DE SOUSA MAIA**

**CO - ORIENTADOR: Prof.ª. Dr.ª. TERESINHA GONÇALVES DA SILVA**

**DATA DA DEFESA: 09 DE AGOSTO DE 2011.**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Nicodemus Teles de Pontes Filho**

---

**Prof. Dr.ª. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes**

---

**Prof. Dr.ª. Teresinha Gonçalves da Silva**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**R E I T O R**

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE- REITOR**

Prof. Sílvio Romero Marques

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Francisco de Sousa Ramos

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

Prof. José Thadeu Pinheiro

**CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA**

Prof<sup>a</sup>. Catarina de Oliveira Neves

**COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA**

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

**VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA**

Prof. Hilton Justino da Silva

**R E C I F E**

2011

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, orientador da minha vida, por ter me dado persistência e sabedoria para concluir essa etapa da minha vida.

Aos meus pais e minhas irmãs pelo amor incondicional e por me apoiarem em todas as minhas decisões.

Ao meu namorado Juliano Cazuzú pelo amor, pela paciência, pela injeção diária de bons pensamentos e por ter possibilitado a realização de parte desse trabalho.

A Professora Dra. Maria Bernadete de Sousa Maia por todos os ensinamentos, pela credibilidade e por ter sido tão importante para conclusão deste ciclo .

A professora Dra. Teresinha Gonçalves da Silva do Departamento de Antibióticos pela paciência ímpar e pela disposição em me auxiliar na realização deste trabalho.

A Técnica Rejane Souza e Silva por ter me auxiliado em todos os experimentos e pela doçura com que sempre me tratou.

Aos amigos Carlos Fernando Brasileiro e Gustavo Dimech pela grande ajuda na realização de parte deste trabalho.

Aos amigos Anacássia Fonseca, Ricardo Martins, Eryvelton Franco, Raphael Dutra e Thiago Oliveira pelo compartilhamento de conhecimentos, pela amizade e por terem tornado a convivência diária muito agradável.

As minhas amigas Francine Iane e Diana Malta pelo auxílio em alguns experimentos, pela amizade e por todo incentivo;

As minhas amigas Liliane Lima e América Palmeira pela amizade verdadeira, pelo compartilhamento de sorrisos e tristezas e pelo companheirismo constante.

*“Onde não há obediência, não há virtude. Onde não há virtude, não há bem, não há amor; e onde não há amor, não há Deus, e sem Deus não se chega ao paraíso. Tudo isso é como uma escada: se faltar um degrau, caímos.”*

*Santa Teresa D'Ávila*

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar o impacto da desnutrição intrauterina na intensidade das respostas inflamatórias aguda e subcrônica e suas implicações sobre o efeito anti-inflamatório da indometacina na prole adulta de ratas da linhagem Wistar. **Material e Métodos:** Ratos machos Wistar divididos em 2 grupos experimentais de acordo com a dieta fornecida às mães: Nutridos (Controle-N; Labina, n=36) e desnutridos durante a gestação (DBR-g, n=36). Aos 60 dias de idade, os grupos foram subdivididos (n=6 animais/grupo) e os animais foram submetidos aos modelos de inflamação aguda e subcrônica. Carragenina ou zymosan (0,1 mL) foi injetado na região subplantar (0 minuto) da pata de cada animal dos grupos Controle-N e DBR-g. Os grupos Controle-N e DBR-g receberam salina 0,9% v.o. Outros grupos foram submetidos ao mesmo procedimento acima, mas receberam indometacina (10 mg/Kg, v.o) 45 minutos antes da injeção do agente e foram divididos em dois grupos: Controle-NI (Normonutridos tratados com indometacina) e DBRI-g (DBR-g tratados com indometacina). O volume do edema inflamatório das patas foi calculado nos tempos 0, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos. No modelo de inflamação subcrônica, dois “pellets” de algodão de  $50 \pm 1$  mg foram assepticamente implantados na região dorsal dos animais dos grupos Controle-N e DBR-g e esses receberam 0,9% de salina v.o durante sete dias consecutivos. Outros grupos de animais (Controle-NI e DBRI-g) foram submetidos ao mesmo procedimento acima, porém foram tratados diariamente com indometacina (2mg/Kg; v.o) em uma única dose diária. Posteriormente, os animais foram dissecados e os “pellets” foram submetidos ao processo de desidratação para obtenção do peso médio. Ao final dos experimentos, amostras de sangue foram retiradas de todos animais para avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos e do homogenato da pele da região supplantar dos animais para dosagem de citocinas. **Resultados:** A desnutrição durante a gestação promoveu retardo do crescimento fetal refletido no baixo peso ao nascimento ( $5,38 \pm 0,28$ ) quando comparado ao grupo Controle-N ( $7,26 \pm 0,64$ ). O volume do edema das patas, os níveis séricos de PCR e albumina e os níveis de citocinas foram inferiores nos animais dos grupos DBR-g quando comparados aos grupos Controle-N nos modelos de inflamação aguda; o peso médio dos granulomas e os níveis séricos de PCR e albumina foram inferiores nos animais dos grupos DBR-g quando comparados aos grupos Controle-N no modelo de inflamação subcrônica. Entretanto, nenhuma diferença foi encontrada na contagem total de leucócitos. Quando comparados aos respectivos grupos tratados com salina (Controle-N e DBR-g), o efeito anti-inflamatório da indometacina foi menor nos animais dos grupos DBRI-g do que nos grupos Controle-NI no modelo de inflamação aguda; no modelo de inflamação subcrônica, o efeito anti-inflamatório da indometacina foi reduzido nos animais desnutridos. **Conclusão:** A desnutrição precoce atenuou a severidade da resposta inflamatória aguda, mas não foi verificada alteração estatisticamente significativa na inflamação subcrônica induzida por lesão granulomatosa.

**PALAVRAS-CHAVE:** Desnutrição precoce; inflamação; indometacina

## Abstract

**Aim:** To assess the impact of intrauterine malnutrition on the severity of acute and subchronic inflammatory responses and their implications for the pharmacological effect of indomethacin in the adult offspring of Wistar rats. **Methods and Materials:** Male Wistar rats were divided into two groups according to the diet fed to mothers: normal nourished rats (Control-N, Labina, n = 36) and undernourished during pregnancy ones (BRD-g, n = 36). At 60 days of age, the groups were subdivided and the animals were subjected to models of acute and subchronic inflammation. Carrageenan or zymosan (0.1 mL) was injected into the subplantar region (0 min) of the hind paw of each animal in both Control-N and BRD-g groups. All animals received 0.9% v.o. saline. Other groups of animals underwent the same procedure as above but were given indomethacin (10 mg / kg, po) 45 min before the injection of the agent and then divided into two groups: Control-NI (normal nourished rats treated with indomethacin) and BRDI-g (BRD-g rats treated with indomethacin). The paw edema volume was calculated at 0, 30, 60, 120, 180 and 240 minutes. In the subchronic model of inflammation, two cotton pellets of  $50 \pm 1$  mg were aseptically implanted in the dorsum of the animals in the Control-N and BRD-g groups and they received 0.9% v. o. saline for seven consecutive days. Other groups of animals (Control-NI and BRDI-g) underwent the same procedure as above but were treated daily with indomethacin (2 mg/kg; v.o.) in a single daily dose. Subsequently, the pellets were subjected to dissection to obtain the average weight. At the end of the experiments, blood samples were taken from all animals for evaluation of hematological and biochemical parameters and a homogenate of the skin of the subplantar zones of the animals was made, in order to measure the cytokine levels. **Results:** Malnutrition during pregnancy caused fetal growth retardation shown by the low birth weight ( $5.38 \pm 0.28$ ), when compared to the Control-N ( $7.26 \pm 0.64$ ) group. The volume of paw edema, the serum levels of CRP and albumin, the average weight of the granulomas and the cytokine levels were lower than those in the BRD-g groups when compared to the ones in the Control-N groups in both models of inflammation that were studied. However, no difference was found in the total leukocyte count. When compared to the respective groups treated with saline (Control-N and BRD-g), the antiinflammatory effect of indomethacin in the model of acute inflammation, in the animals of BRDI-g groups was lower than in the Control-NI groups; in the model of subchronic inflammation, the pharmacological effect of indomethacin was effective only in normal nourished animals. **Conclusion:** The malnutrition in the early stages of development attenuated the severity of the acute inflammatory response, but there was no statistically significant change in subchronic inflammation induced by granulomatous lesion.

**KEYWORDS:** Early undernutrition; inflammation; indomethacin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### ARTIGO ORIGINAL

- Figura 1.** Time course of hind paw swelling in time zero, 30, 60, 120, 180 and 240 after carrageenan (figure 1A) or zymosan injection (figure B) on control-N and undernourished adult male rat offspring..... 63
- Figura 2.** Effect of treatment with indomethacin (10 mg/Kg) on hind paws edema on control-N (figure 2A) and undernourished (figure 2B) adult male Wistar rat offspring after carrageenan injection..... 63
- Figura 3.** Effect of treatment with indomethacin (10 mg/Kg) on hind paws edema on control-N (figure 3A) and undernourished (figure 3B) adult male Wistar rat offspring after zymosan injection..... 64
- Figura 4.** Effect of treatment with Indomethacin (2mg/Kg) on the average weight of the granulomas of a adult male wistar rats in BRD-g and in Control-N groups..... 64
- Figura 5.** Levels of TNF- $\alpha$  in control and undernourished adult male Wistar rat offspring after carrageenan (figure 5A) and zymosan (figure 5B) injection.. 65
- Figura 6.** Levels of IL-6 in control and undernourished adult male Wistar rat offspring after carrageenan (figure 6A) and zymosan (figure 6B) injection..... 65

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO ORIGINAL

<b>Tabela 1.</b> Data on Wistar Rat offspring of dams nourished (Control-N) and that received a Basic Regional Diet (BRD) during gestation (BRD-g).....	61
<b>Tabela 2.</b> Average weight of the cotton pellets of male Wistar rats of Control-N and BRD-g groups.....	61
<b>Tabela 3.</b> Biochemical and hematological parameters of Control-N and Undernourished adult male Wistar rat offspring.....	62

## SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	11
2	Objetivos.....	13
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3.1	Aspectos gerais do estado nutricional.....	14
3.2	O processo inflamatório.....	17
3.3	Mediadores químicos envolvidos na resposta inflamatória.....	19
3.4	Eventos vasculares da resposta inflamatória e formação do edema.....	27
3.5	Moléculas de adesão de membrana envolvidas na migração leucocitária.....	28
3.6	Marcadores da resposta de fase aguda.....	29
3.7	Fase Subcrônica da Resposta Inflamatória.....	29
3.8	Indometacina.....	30
3.9	Nutrição, sistema imune e inflamação.....	31
4	MÉTODOS.....	34
4.1	Animais.....	34
4.2	Manipulação Nutricional.....	34
4.3	Delineamento metodológico.....	35
4.3.1	<i>Fase aguda da resposta inflamatória – Edema de pata induzido por carragenina.....</i>	35
4.3.2	<i>Fase aguda da resposta inflamatória – Edema de pata induzido por zimosan....</i>	36
4.3.3	<i>Fase subcrônica da resposta inflamatória – Lesão granulomatosa induzida por pellets de algodão.....</i>	36
4.3.4	<i>Determinação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos.....</i>	37
4.3.5	<i>Dosagem de citocinas.....</i>	37
4.4	Análise estatística.....	38
4.5	Considerações bioéticas.....	38
5	RESULTADOS.....	39
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63
	ANEXOS.....	77
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE.....	77
	ANEXO B – Normas e Instruções aos Autores do European Journal of Pharmaceutical Sciences.....	78
	ANEXO C- Encaminhamento do Artigo Original.....	93

## APRESENTAÇÃO

---

### 1 APRESENTAÇÃO

Estudos indicam que a desnutrição é um dos fatores não genéticos que mais interferem no desenvolvimento normal dos órgãos e participam de doenças crônico-degenerativas. O mecanismo subjacente ao desenvolvimento dessas afecções parece estar associado aos efeitos deletérios das deficiências nutricionais no período crítico de desenvolvimento. Evidências epidemiológicas têm demonstrado que a carência de nutrientes na infância eleva o risco de obesidade e doenças correlatas (hipertensão, diabetes tipo II, dislipidemia, hiperinsulinemia e doenças cardíacas) na vida adulta.

Por outro lado, a reação inflamatória representa um conjunto de reações locais e gerais do organismo contra uma agressão. Ela é composta por uma série de fenômenos complexos que se associam e se complementam uns aos outros em uma reação em cascata. A resposta inflamatória visa, em última instância, combater o agente agressor e eliminar produtos resultante da destruição celular, promovendo condições ideais para o reparo do tecido lesado. A inflamação pode ser de origem aguda ou crônica. O processo inflamatório agudo pode durar minutos, horas ou dias, independe da natureza do agente agressor e apresenta respostas semelhantes a estímulos distintos. O processo inflamatório crônico tem duração prolongada que pode variar de semanas a meses, no qual há tentativas de reparo através da proliferação de fibroblastos e formação de granuloma.

Estudos experimentais realizados com animais na fase adulta têm demonstrado que a deficiência nutricional predispõe a um baixo grau de resposta inflamatória local e sistêmica, e dessa forma, a resposta do hospedeiro a estímulos encontra-se prejudicada, o que o torna mais susceptível ao desenvolvimento de infecções e danos teciduais. No sistema imune, a desnutrição perinatal altera os mecanismos de defesa, com prejuízos da função fagocitária de macrófagos, na ação do sistema complemento e na produção de citocinas. Tanto a imunidade humoral como a celular encontram-se comprometidas na presença de desnutrição perinatal.

O uso de fármacos anti-inflamatórios não-esteróides costuma ser indicado nos casos em que a morbidade da reação inflamatória supera os benefícios de regeneração tecidual proporcionados pela inflamação. Esses fármacos constituem um grupo heterogêneo de moléculas com propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas eficazes, embora a incidência de seus efeitos adversos em decorrência do uso continuado seja alta.

Alguns estudos têm investigado o impacto da desnutrição intrauterina sobre as respostas inflamatórias aguda e subcrônica, bem como suas repercussões sobre a eficácia farmacológica de alguns fármacos não-esteroidais, sobretudo a indometacina. No entanto, é preciso aprimorar a abordagem da influência da programação fetal resultante da desnutrição perinatal sobre as respostas inflamatórias local e sistêmica.

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar o perfil da resposta inflamatória da prole adulta de ratas da linhagem Wistar submetidas à desnutrição durante a gestação, utilizando-se um modelo nutricional denominado Dieta Básica Regional (DBR), bem como avaliar as implicações da desnutrição precoce sobre o efeito anti-inflamatório da indometacina. Os objetivos específicos deste trabalho consistiram em avaliar: 1) o perfil da resposta inflamatória aguda e o da subcrônica de ratos machos Wistar adultos provenientes de matrizes submetidas à desnutrição durante a gestação, 2) a influência da desnutrição intrauterina sobre o efeito anti-inflamatório da indometacina e sobre alguns marcadores da resposta inflamatória (Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina -6 (IL-6)).

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Farmacologia e de Produtos Bioativos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco, tendo como orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Bernadete de Sousa Maia e como co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Teresinha Gonçalves da Silva. O estudo originou o artigo científico intitulado: **Impact of early malnourishment on the acute and subchronic inflammatory responses and its implications in the effect of indomethacin in Wistar rats**, que foi submetido para publicação na revista “European Journal of Pharmaceutical Sciences”.

## OBJETIVOS

---

### 2 OBJETIVOS

#### 2.1 Objetivo geral:

- Investigar o perfil da resposta inflamatória de ratos machos Wistar adultos provenientes de matrizes submetidas à desnutrição durante a gestação e suas implicações sobre o efeito antiinflamatório da indometacina.

#### 2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar os perfis das respostas inflamatória aguda (volume do edema de pata induzido por carragenina ou zymosan) e da subcrônica (reação granulomatosa induzida por “pellets” de algodão) na prole de ratas Wistar submetidas à desnutrição durante a gestação;

- Determinar o número total e diferencial de leucócitos nos animais desnutridos e normonutridos;

- Determinar a concentração plasmática de alguns marcadores da resposta inflamatória (PCR e albumina)

- Determinar os níveis das citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-6) no homogenato de pata de animais desnutridos e normonutridos submetidos aos modelos experimentais de inflamação aguda.

## REVISÃO DA LITERATURA

---

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Aspectos gerais do estado nutricional

A desnutrição é uma condição patológica que resulta da privação nutricional adequada e frequentemente acontece devido à pobreza (OMS, 1999). Além dos fatores fisiológicos, elementos políticos, sociais, econômicos e culturais estão envolvidos. Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), a má nutrição engloba um grupo de distúrbios nutricionais que resulta da falta concomitante de calorias e de proteínas. A má nutrição calórico-protéica pode alterar uma série de órgãos e tecidos, tendo em vista que as proteínas são componentes importantes para a estrutura e função específicas das células do organismo (CICOGNA *et al.*, 2001).

O estado nutricional é definido por indicadores antropométricos que verificam o crescimento e, indiretamente, pela alimentação insuficiente (HOFFMAN, 1995). O desenvolvimento e a manutenção das dimensões corporais apropriados necessitam de condições viáveis, principalmente em relação à ingestão e utilização biológica de calorias e proteínas pelo corpo. Geralmente a má nutrição está associada a outras condições nocivas à saúde, como infecções, pobreza e doenças crônicas, como as doenças cardíacas de origem congênita, fibrose cística, falência renal crônica e doenças neuromuscular (GROVER e LOOI, 2009).

No Brasil, inquéritos epidemiológicos recentes revelaram uma elevada frequência de baixa estatura e reduzido peso corporal, características antropométricas indicativas da ocorrência da desnutrição em estágios diferenciados dos períodos iniciais do ciclo vital (MONTE, 2000; ACUNÃ e CRUZ, 2004).

A má nutrição calórico-protéica é reconhecida como uma das principais causas de mortalidade infantil e agravo à saúde de indivíduos senis (BERGSTROM E LINDHOLM, 1998) e portadores de doenças debilitantes (BRUNN *et al.*, 1999). A desnutrição por carência de energia (calorias) e proteínas é a forma mais letal de má nutrição e tem um papel significativo em pelo menos metade das 10,4 milhões de mortes anuais de crianças nos países em desenvolvimento e lesa uma em cada quatro crianças em todo o mundo. Destas, 150 milhões (26,7%) possuem baixo peso e 182 milhões (32,5%) possuem atraso do

desenvolvimento físico e mental. Geograficamente, mais de 70% das crianças com carências energético-protéicas vivem na Ásia (principalmente no oeste asiático), 26% na África e 4% na América Latina e Caribe (UNICEF, 1998; OPAS/OMS, 2000).

No Brasil, um estudo feito no semi-árido mostrou que crianças com menos de 2 anos de idade estavam muito susceptíveis à desnutrição em 484 municípios (34,3% do total de 1.444), e mais de 10% das crianças nessa faixa etária encontravam-se com quadro de desnutrição instalado (UNICEF, 2005).

Uma alimentação adequada é imprescindível para que os seres vivos atinjam seu pleno potencial de crescimento, saúde, reprodução e longevidade (GIANINI; VIEIRA; MOREIRA, 2005). A má nutrição é um dos fatores não genéticos que mais interferem no desenvolvimento normal dos órgãos (MORGANE *et al.*, 1993; BATISTA FILHO; RISSIN, 2003 ). Esse fenômeno pelo qual um estímulo ou insulto, quando aplicado em fases críticas do desenvolvimento, pode conduzir a alterações permanentes na estrutura e função dos tecidos é conhecido como programação (LUCAS, 1991; LUCAS; FEWTRELL; COLE, 1999).

Indivíduos mal nutridos no início da vida, onde o período de crescimento ocorre de forma acelerada, apresentam importantes mudanças nas quais o organismo deverá ajustar-se para sobreviver (ENGELBREGT *et al.*, 2000). Um dos mecanismos usados é a diminuição na taxa de divisão celular, com possibilidade de alterar a “programação” da estrutura e função do sistema (LUCAS, 1991; BARKER e CLARK, 1997; DENNISON *et al.*, 1997). Na vida fetal, os órgãos e tecidos do corpo passam pelo chamado período crítico de desenvolvimento que coincide com períodos de rápida divisão celular. Embora o crescimento do feto seja influenciado por seus genes, alguns autores sugerem que pode ser limitado pelo meio ambiente (BARKER, 1998; OSMOND e BARKER, 2000; GODFREY e BARKER, 2001). Quando um indivíduo recebe uma alimentação insuficiente quantitativamente ou inadequada do ponto de vista qualitativo, sobretudo no início da vida, o sistema nervoso, órgão controlador de toda a atividade metabólica, programa-se permanentemente para economizar energia em forma de gordura e reduzir o crescimento para garantir a sobrevivência em condições adversas (SAWAYA, 2006).

Em humanos e animais, estudos evidenciaram que a dieta hipoprotéica durante a gestação e lactação gera alterações fisiológicas e morfológicas que se traduzem em danos funcionais podendo repercutir por toda a vida (OZANNE; HALES, 2002; GIANINI; VIEIRA; MOREIRA, 2005). Estudos realizados em humanos demonstraram a existência de uma relação entre a má nutrição fetal e doenças crônicas na vida adulta (SCRIMSHAW, 1997; SLOAN *et al.*, 2001), pontuando uma associação entre retardo do crescimento fetal,

conseqüente à má nutrição no útero, com o desenvolvimento de Hipertensão Arterial Sistêmica (ERIKSSON *et al.*, 2000) e doenças coronarianas na vida adulta (LEISTIKOW, 1998). Lucas (1998) sugeriu a hipótese da existência de uma programação nutricional de doenças tardias causadas por manipulações nutricionais nos períodos pré e pós-natal.

Vários protocolos utilizando dietas de composições diferentes foram propostos para o estudo dos efeitos da má nutrição ou da deficiência de determinados nutrientes na formação, desenvolvimento e manutenção das funções orgânicas (HU *et al.*, 2000). Passos *et al.* 2000 demonstraram que a restrição protéica (8% de proteína) durante a lactação provoca alterações no volume e na composição do leite das ratas lactantes com repercussões no ganho de peso da prole.

Estudo realizado por HU *et al.* (2000), utilizando uma dieta com restrição protéico-calórica, durante o período intrauterino em ratos, apontou para a deficiência de proteínas maternas, como sendo a maior causa de má nutrição. Essa deficiência resultou em efeitos deletérios, tanto no crescimento corpóreo demonstrado por baixo peso e baixa estatura (TEODÓSIO *et al.*, 1990; MARÍN *et al.*, 1995; PASSOS *et al.*, 2001; EL-SAYED *et al.*, 2006; SAWAYA, 2006; GAMA, LIBERTI e SOUZA, 2007), quanto no desenvolvimento de órgãos e sistemas, tais como intestino, rins, fígado, pâncreas, coração, sistema imunológico dentre outros (DESAI *et al.*, 1996; DESAI *et al.*, 2005; GURMINI *et al.*, 2005; EL-SAYED *et al.*, 2006; PORTO *et al.*, 2006).

Além da importância da presença dos componentes protéicos e calóricos na dieta (JEOR *et al.*, 2001), dependendo da fase de desenvolvimento a que o indivíduo é submetido, a má nutrição pode também interferir na estrutura e função normal dos órgãos e tecidos (CICOGNA *et al.*, 2001). Em ratos, quando a restrição calórico-protéica ocorre entre as 1<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> semanas do período pré-natal, induz repercussões significativas no ganho ponderal, no desenvolvimento do sistema nervoso e na morfologia renal (MCCANCE, 1962). Nesses animais, a fase de maior divisão celular acontece no período de aleitamento, a partir do qual ocorre maior desenvolvimento dos órgãos e maturação do SNC, portanto, diferindo do homem, no qual essa fase tem início no terceiro trimestre da gestação, estendendo-se até o segundo ou terceiro ano após o nascimento (GUEDES, 1985).

Estudos nutricionais realizados por TEODÓSIO *et al.* (1990), a partir de uma enquête alimentar com a população da Zona da Mata do estado de Pernambuco, permitiram a formulação de um modelo nutricional chamado Dieta Básica Regional (DBR). A DBR é deficiente em proteínas, lipídios, vitaminas, minerais, e tem sido considerada por muitos pesquisadores como dieta modelo para estudos experimentais de má nutrição em animais,

visto que seus efeitos assemelham-se aos estados nutricionais observados em comunidades carentes do Nordeste brasileiro (TEODÓSIO *et al.*, 1990; PAIXAO *et al.*, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2001).

### **3.2 O processo inflamatório**

A reação inflamatória é um mecanismo fisiopatológico em resposta à invasão por um agente infeccioso ou apenas uma reação a uma lesão de natureza variada (térmica, química e/ou mecânica), sendo representada por um conjunto de reações locais e sistêmicas do organismo. Esse mecanismo é composto por vários fenômenos que se associam e se complementam uns aos outros formando uma reação em cascata, que envolve uma complexa interação de células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, monócitos/macrófagos), das células vasculares da muculatura lisa e de células endoteliais (TEDGUI e MALLAT, 2001). A resposta infamatória visa destruir ou neutralizar o agente agressivo sendo portanto, uma reação de defesa e reparo do dano tecidual (CHANDRASSOMA e TAYLOR, 1993).

A inflamação é caracterizada, em sua forma aguda, pelos sinais cardinais de dor, calor, rubor, edema e perda de função, envolvendo uma série de eventos como: aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, exsudação de fluídos, migração de leucócitos, liberação de agentes algésicos e dos efeitos induzidos por mediadores químicos no foco inflamatório (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005).

O resultado principal do processo inflamatório agudo é a bem sucedida resolução e reparo do dano tecidual, mais do que a persistência da inflamação, que normalmente pode levar à formação de quelóides, tecido de granulação e perda de função (SERHAN e SAVILL, 2005).

A inflamação aguda se caracteriza pelo predomínio de fenômenos exsudativos conseqüentes das alterações na permeabilidade vascular, levando ao acúmulo de líquido na região inflamada, fibrina, leucócitos, especialmente neutrófilos e hemácias. Evidências demonstram que vários fatores desempenham importantes papéis na modulação de cada uma das fases da resposta inflamatória aguda. Na fase precoce, mediadores como a histamina e a bradicinina modulam a resposta inflamatória aumentando o calibre e o fluxo vascular, responsável pelo calor e rubor presente no foco da inflamação (KUMAR, ABBAS E FAUSTO, 2005; ALBERTINI *et al.*, 2004).

A inflamação aguda tem duração relativamente curta, durando alguns minutos, horas ou dias e é independente da natureza do agente agressor, sendo a resposta muito similar aos

diferentes estímulos. A resposta fisiológica que ocorre imediatamente após um estímulo agressivo é referida como uma fase precoce (0-1 hora), ao contrário do que ocorre na fase tardia da inflamação aguda (5-6 horas após a lesão), onde as células inflamatórias se acumulam no local lesado (ALBERTINI *et al.*, 2004).

Durante a fase tardia da inflamação aguda, há predominância de eventos celulares que se caracterizam pela marginação, aderência endotelial, diapedese e migração dos leucócitos para o foco da lesão decorrentes de estímulos quimiotáticos. Todos os granulócitos, monócitos, e em menor grau, linfócitos respondem aos estímulos quimiotáticos com taxas variáveis de velocidade (KUMAR, ABBAS E FAUSTO, 2005). Diversas substâncias endógenas e exógenas podem atuar como agentes quimiotáticos. Os agentes quimiotáticos exógenos são principalmente produtos bacterianos. Dentre as substâncias endógenas que podem atuar como agentes quimiotáticos, podem ser citados: componentes do sistema complemento- C5a (KILGORE *et al.*, 1994), fator de ativação plaquetária (PAF) (KIM *et al.*, 1995), vários produtos da lipooxigenase- Leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) ou ácidos hidroxicicosatetraenóicos (HETEs) (FREED *et al.*, 1999) e alguns produtos da ciclooxigenase como as prostaglandinas (ISSEKUTZ *et al.*, 1982).

Os leucócitos penetram nos tecidos através da passagem pelas paredes dos vasos sanguíneos, após a ligação por intermédio de moléculas de adesão aos respectivos receptores no endotélio e subsequente processo de transmigração pelo endotélio. A migração leucocitária para dentro dos tecidos é essencial para defesa contra patógenos e antígenos estranhos ao organismo. No entanto, este mesmo fenômeno pode produzir inflamação inapropriada e destruição tecidual em vários tipos de doenças inflamatórias crônicas, agudas e auto-imunes (JAAKKOLA *et al.*, 2000).

A ativação leucocitária, liberação de radicais livres, proteases, metabólitos do ácido araquidônico, citocinas inflamatórias e antiinflamatórias liberadas no local inflamado podem induzir a secreção de quimiocinas e substâncias imunomoduladoras pelas células endoteliais, epiteliais e células intersticiais, criando uma reposta inflamatória local exacerbada (RINALDO *et al.*, 1990; AGOURIDAKIS *et al.*, 2002). Os eventos seguintes dessas interações humorais/celulares são importantes para iniciação e propagação da resposta inflamatória responsável por injúrias teciduais (STRIETER *et al.*, 1994).

A inflamação crônica tem duração prolongada (semanas a meses), na qual há inflamação ativa, destruição tecidual e as tentativas de reparo estão ocorrendo simultaneamente. Embora possa suceder a inflamação aguda, a inflamação crônica começa, com frequência, de maneira insidiosa, como uma resposta de baixo grau, latente e muitas

vezes pela ausência dos sinais cardinais da inflamação. A inflamação crônica origina-se de infecções persistentes por certos microrganismos, por exposição prolongada a agentes parcialmente tóxicos (inalação de sílica) e de distúrbios de auto-imunidade (Artrite Rematóide, Lúpus Eritematoso Sistêmico) (COLLINS, 2000).

Diferentemente da inflamação aguda que se manifesta por alterações vasculares, edema e infiltração, principalmente de neutrófilos, a inflamação crônica se caracteriza por:

- Infiltração de células mononucleares, que incluem macrófagos, linfócitos e plasmócitos;
- Destruição tecidual induzida sobretudo pelas células inflamatórias;
- Tentativas de cicatrização por substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, realizada por proliferação de pequenos vasos e em particular fibrose (COLLINS, 2000).

Durante a evolução do processo de reparo, os eventos que ocorrem são: infiltração de neutrófilos, infiltração de macrófagos, fibroplasia e deposição de matriz extracelular, angiogênese, cicatrização e reepitelização (GERSZTEN *et al.*, 1999).

### **3.3 Mediadores químicos envolvidos na resposta inflamatória**

Os mediadores do processo inflamatório originam-se do plasma ou das células. Os mediadores oriundos do plasma estão presentes em formas precursoras que devem ser ativadas, em geral por uma série de clivagens proteolíticas, a fim de adquirir suas propriedades biológicas. Os mediadores oriundos de células estão contidos em grânulos intracelulares que precisam ser secretados (por exemplo histamina nos mastócitos) ou são sintetizados originalmente (p.ex. prostaglandinas, citocinas) em resposta a um estímulo. As principais fontes celulares são as plaquetas, os neutrófilos, os monócitos/macrófagos, mastócitos e as células mesenquimais (endotélio, músculo liso) e fibroblastos também podem ser induzidos a elaborar alguns mediadores) (COLLINS, 2000).

A inflamação é desencadeada, conduzida, controlada e extinta pela presença de mediadores químicos, cada um com um papel específico, atuando em estágios definidos da resposta inflamatória. Dividem-se nos seguintes grupos: aminas vasoativas (histamina e serotonina), proteases plasmáticas (sistema de cinina- bradicinina, sistema complemento, sistema de coagulação-fibrinolítico); metabólitos do ácido araquidônico (via ciclooxigenase e via lipooxigenase), proteases lisossômicas, radicais livres derivados do oxigênio, fatores

ativadores das plaquetas (PAF), quimiocinas, citocinas e óxido nítrico (KUMAR, ABBAS E FAUSTO, 2005; ALBERTINI *et al.*, 2004).

### AMINAS VASOATIVAS

A histamina encontra-se distribuída nos tecidos, sendo os mastócitos, normalmente presentes no tecido conjuntivo adjacente, a fonte mais rica. Também é encontrada nos basófilos e plaquetas. Em humanos, a histamina causa dilatação das arteríolas e aumento da permeabilidade vascular. É considerada o principal mediador na fase imediata de aumento da permeabilidade vascular e exerce seus efeitos pela ocupação principalmente de receptores H1 localizados nas células endoteliais (COLLINS, 2000).

A serotonina possui ações semelhantes às da histamina e foi originalmente isolada do sistema das células enterocromafins na mucosa gastrointestinal, mas também está presente no sistema nervoso central e nas plaquetas (BARMAN, 1997).

MICHEL e KENDALL (1997) demonstraram que os efeitos da serotonina e da histamina eram temporários, com picos de aumento da permeabilidade dentro de 3 minutos após microperfusão com a serotonina e entre 6 a 9 minutos com a histamina. A permeabilidade retornou aos níveis normais entre 12 e 30 minutos, a despeito da presença do mediador no perfusato. Portanto, a mudança de permeabilidade durante o tempo corresponde aproximadamente com a abertura e fechamento dos “gaps” no endotélio vascular.

### CININAS

As cininas se interrelacionam com dois fatores derivados do plasma, o sistema complemento e da coagulação. A bradicinina e a lisil-bradicinina são peptídeos cujo precursor é o cininogênio de alto peso molecular, presente na fração globulínica do plasma. São hormônios ativos localmente e liberados principalmente pela calicreína plasmática (BHOOLA *et al.*, 1992).

Classificada como autacóide de ação local, a bradicinina produz dor, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, síntese de prostaglandinas, liberação de histamina dos mastócitos, etc. Possui capacidade de contrair a musculatura lisa extra-vascular, especialmente útero de rato e íleo de cobaio. O mecanismo de ação das cininas envolve a ativação de 3 receptores, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub>, que por meio da ativação da fosolipase C, aumenta as concentrações de cálcio citosólico. Além disso, a bradicinina também é capaz de ativar a fosfolipase A<sub>2</sub>, resultando em síntese de eicosanóides (GARRISON, 1991).

## SISTEMA COMPLEMENTO

Compreende 20 proteínas encontradas em maior concentração no plasma e funciona na imunidade inata e adaptativa, defendendo o organismo contra agentes microbianos através de lise pelo chamado Complexo de Ataque à Membrana (CAM) (REID *et al.*, 1998). Na formação do CAM, uma série de componentes do complemento são produzidos, causando aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia e opsonização (MORGAN, 1995). Os fatores derivados do complemento executam uma série de fenômenos na inflamação aguda. C3a e o C5a podem aumentar a expressão do receptor para adesão celular endotelial neutrofílica, induzir extravasamento vascular, atrair leucócitos por quimiotaxia e estimular a liberação de histamina e enzimas líticas na área afetada (KAJITA *et al.*, 1990; MEUER *et al.*, 1981).

## SISTEMA DE COAGULAÇÃO

A inflamação e a coagulação são dois processos intimamente relacionados que fazem parte de uma única resposta defensiva do organismo. Alguns estudos já referiram o envolvimento da formação de fibrina no edema de pata induzido por carragenina, estabelecendo uma ligação entre a inflamação e a coagulação (WISEMAN *et al.*, 1968).

De acordo com CICALA *et al.* (1998), após dano ao endotélio vascular, uma proteína receptora de alta afinidade para trombina é liberada (trombomodulina). O complexo trombina-trombomodulina ativa a Proteína C que forma um complexo com um co-fator, a proteína S no endotélio. A proteína C ativada inibe a coagulação e ativa a via fibrinolítica. Por outro lado, a trombina ativa a via da proteína C, agindo como inibidor de sua própria produção por feedback negativo. Portanto, a presença de trombomodulina no endotélio e a integridade da via da proteína C são requisitos fundamentais para um correto balanço entre a coagulação e a fibrinólise (ESMON *et al.*, 1991).

A trombina tem se mostrado indutora de várias respostas celulares que estão envolvidas na inflamação, tais como: quimiotaxia para monócitos e neutrófilos, mitogênese para diferentes tipos celulares e estimulação das células endoteliais com liberação de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (OHBA *et al.*, 1996).

## METABÓLITOS DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

A principal fonte de eicosanóides é o ácido araquidônico (AA) (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico), um ácido graxo insaturado com 20 átomos de carbono contendo quatro ligações duplas. O ácido araquidônico é encontrado esterificado nos fosfolípídeos da membrana e vários estímulos, como a trombina das plaquetas, o fragmento do sistema complemento C5a nos neutrófilos, as reações antígeno-anticorpo nos mastócitos e lesões celulares são estímulos para liberação do ácido araquidônico. O AA livre, liberado a partir dos fosfolípídios de membrana pela enzima fosfolipase A<sub>2</sub>, é metabolizado por diversas vias: via das ciclooxigenases, que iniciam a biossíntese das prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs), e por várias lipooxigenases que iniciam a síntese dos leucotrienos (LTs), as lipoxinas e outros compostos. (RANG *et al*, 2007).

Em células de mamíferos as ciclooxigenases (COXs) existem em pelo menos duas isoformas (COX-1 e COX-2). A COX-1 é uma enzima constitutiva, expressa em quase todo tipo de célula responsável pela produção de prostaglandinas (PGs), com função fisiológica, em diversos órgãos, e tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) que é expresso nas plaquetas. A COX-2, por outro lado, geralmente está ausente na maioria dos tecidos (com exceção dos rins, partes do cérebro e útero gravídico, onde a COX-2 é constitutiva), mas sua expressão pode ser facilmente induzida por numerosos estímulos como fatores de crescimento, promotores de tumor ou citocinas produzindo grandes quantidades de PGs, em particular PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>, que são mediadores pró-inflamatórios que atuam aumentando a permeabilidade vascular e promovendo edema nos locais inflamados. A COX-2 é expressa por células que estão envolvidas na inflamação (por exemplo, neutrófilos, macrófagos, monócitos, mastócitos, sinoviócitos), surgindo como a principal isoforma responsável pela síntese de prostanóides envolvidos nos processos patológicos, tanto manifestações agudas como em estados inflamatórios crônicos (GOMES *et. al.*, 2009).

As prostaglandinas, na maior parte PGE<sub>2</sub> e prostaciclina, são mediadores importantes em processos inflamatórios, de dor e de febre. Em áreas de inflamação aguda, a PGE<sub>2</sub> e a PGI<sub>2</sub> são produzidas pelos vasos sanguíneos locais. Na inflamação crônica, as células da série monócitos-macrófagos também liberam PGE<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub>. A PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> são poderosos vasodilatadores e atuam de modo sinérgico com outros vasodilatadores inflamatórios como a histamina e a bradicinina (RANG *et al.*, 2007).

O tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) é outro metabólito do ácido araquidônico produzido durante a catálise do AA pela COX através da enzima tromboxano sintetase (TXS). É um dos

mais potentes indutores da vasoconstricção e agregação plaquetária, acredita-se que desempenha um papel importante na patogênese dos distúrbios circulatórios, incluindo infarto do miocárdio, angina e acidente vascular cerebral (SATO, 1995; NAKAHATA, 2008).

As lipooxigenases são encontradas nos pulmões, nas plaquetas, nos mastócitos e nos leucócitos. A principal enzima desse grupo é a 5-Lipooxigenase, a primeira enzima na biossíntese dos leucotrienos. O Leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) pode ser encontrado em exsudatos inflamatórios e ocorre nos tecidos em muitas condições inflamatórias, incluindo a artrite reumatóide. Há evidência de que estes contribuem para a hiperreatividade brônquica subjacente em asmáticos e acredita-se que estejam envolvidos entre os principais mediadores tanto na fase inicial quanto na tardia da asma (RANG *et al.*, 2007). Ao atuar sobre os receptores, produz adesão, quimiotaxia de Polimorfonucleares (PMN) e macrófagos além de aumentar a produção de citocinas como a IL-6, relacionada com destruição tissular, por parte dos monócitos, e a IL-5, a partir dos linfócitos T (AMATLLER; ANTEZANA, 2007; BECA; HERNÁNDEZ; BASCONES, 2007), agindo também como agregante plaquetário (RIVER-RAMÍREZ; MENDONZA-MAGAÑA; RACETTE, 2008).

As lipoxinas possuem várias ações biológicas, sendo algumas pró-inflamatórias e outras antiinflamatórias. Causam vasodilatação em modelos *in vivo* e *in vitro*. Em certos tecidos, as lipoxinas podem estimular a formação de prostaciclina pelas células endoteliais, o que pode contribuir para a vasodilatação (SERHAN, 2007).

### PROTEASES LISSOSSÔMICAS

Após a adesão ao endotélio vascular, os neutrófilos migram para o sítio infectado onde liberam radicais livres do oxigênio e seus constituintes internos, incluindo grânulos de proteínas azurófilos (BORREGAARD *et al.*, 1997). Recentemente foram descobertos muitos mecanismos potencialmente patogênicos pelos quais proteinases e mieloperoxidases liberadas de grânulos neutrofílicos produzem efeitos deletérios nos tecidos e células em múltiplos modelos experimentais (JOHNSON *et al.*, 1987). Estas proteases degradam moléculas da matriz extracelular como a elastina, fibronectina, laminina e colágeno tipo IV resultando na destruição tecidual típica de alguns processos inflamatórios purulentos (BORREGAARD *et al.*, 1997).

### RADICAIS LIVRES DO OXIGÊNIO

O estresse oxidativo agudo e crônico ao endotélio vascular causa séria disfunção nas células endoteliais e desempenha um importante papel na fisiopatologia de várias doenças inflamatórias. Dois aspectos da disfunção endotelial podem ser particularmente importantes na determinação da doença inflamatória: o aumento da permeabilidade vascular e o aumento da adesão endotelial para os leucócitos, ambos fatores críticos para a formação do edema e extravasamento de leucócitos (LUM *et al.*, 2001).

Espécies reativas do oxigênio funcionam como moléculas sinalizadoras, estimulando atividades celulares que vão desde a secreção de citocinas e de quimiocinas até a proliferação celular e, em altas concentrações, elas podem produzir injúria e morte celular por modificação oxidativa de proteínas e carboidratos e peroxidação de lipídios. Estas respostas diversas estão relacionadas a vários fatores, tais como as espécies prevalentes no local da inflamação, concentração dos oxidantes e a capacidade antioxidante local assim como as células-alvo (LANDER, 1997).

### FATOR DE ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA

O Fator de Ativação Plaquetária (PAF) é um fosfolipídio biologicamente ativo, inicialmente descrito por seus efeitos como agregante plaquetário e como um produto liberado pelos basófilos. Atualmente, sabe-se que o PAF pode ser produzido por muitas células inflamatórias, incluindo leucócitos, plaquetas, macrófagos e células endoteliais. O PAF tem sido considerado um mediador de processos inflamatórios agudos, de respostas sistêmicas ao choque e de reações alérgicas. Apresenta diversas ações pró-inflamatórias, entre elas a estimulação da formação de eicosanóides, produção de superanion e ativação da fosfolipase A2 (MYERS *et al.*, 1995).

### CITOCINAS

Independente de qualquer definição, o termo citocina compreende as monocinas (mediadores derivados dos monócitos/macrófagos) e linfocinas (mediadores derivados dos linfócitos) (TURNBULL *et al.*, 1999). As quimiocinas e interleucinas fazem parte deste grupo, que se caracteriza por apresentar meia-vida curta, modulação da resposta imune, interação com outras citocinas, assim como reconhecimento por receptores específicos (ZHANG, 2008). As principais citocinas que medeiam a inflamação são a Interleucina-1 $\beta$

(IL-1 $\beta$ ) e o Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ). A IL-1 $\beta$  e o TNF compartilham muitas propriedades biológicas (DINARELLO, 1996; BEUTLER, 1995).

A IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  são reconhecidas como as iniciadoras dos processo inflamatório, pois ativam uma cascata complexa, envolvendo mais de 20 outras citocinas, além dos sistemas de coagulação e do complemento (SANTOS *et al.*, 2004). A síntese e a liberação de proteínas de fase aguda de classe 1 é iniciada pelas citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  via um mecanismo que é mediado pela interleucina-6 (IL-6) (COUPADE *et al.*, 2001). Promovem ainda a adesão de leucócitos às células endoteliais e acionam outros eventos inflamatórios (WAN *et al.*, 1989).

A IL-1 tem sido associada com a ativação de linfócitos T e de várias células não-linfóides, incluindo as células endoteliais, nas quais a atividade pró-coagulante é induzida. É uma das responsáveis por induzir a expressão da molécula de adesão ICAM-1. Além de estar relacionada à pirogenicidade, é responsável pela síntese de outras citocinas como IL-6 pelos monócitos, atuando sinergicamente com o TNF $\alpha$  (WAN *et al.*, 1989; LEMAY *et al.*, 1990) O TNF- $\alpha$  aumenta a aderência de neutrófilos às superfícies endoteliais aumentando o número de sítio de ligações nos neutrófilos e nas células endoteliais. Trata-se ainda de um agente quimiotático para neutrófilos e monócitos, estimula a fagocitose e a produção de outras citocinas pró-inflamatórias como algumas quimiocinas, estando ainda relacionado com a produção de hipernocicepção inflamatória, juntamente com a IL-1 (WAN *et al.*, 1989; CAMUSSI, 1991; ZHANG, 2001; CUNHA *et al.*, 2007).

A Interleucina-6 (IL-6) que é produzida em resposta à ação da IL-1 $\beta$  e/ou à ação do TNF- $\alpha$ , é uma citocina multifuncional que foi originalmente identificada como um fator de diferenciação de células B envolvidas na maturação de células produtoras de anticorpos. É uma proteína de cadeia simples produzida por células B, células T, monócitos, fibroblastos e certamente por outros tipos de células (SANTOS *et al.*, 2004). É considerada como um mediador fundamental em diversas etapas da inflamação (GALLUCCI *et al.*, 2000). Dente os vários efeitos pró-inflamatórios que lhe são atribuídos estão os seus efeitos quimioatraentes sobre os neutrófilos na fase mais precoce e os intimamente relacionados ao processo de reparo e a indução mitótica de queratinócitos na fase mais tardia (SATO *et al.*, 1999).

A família das quimiocinas é composta de aproximadamente 50 membros. São proteínas homólogas de 8 a 10KD que são subdivididas em quatro famílias (C, CC, CXC e CX<sub>3</sub>C) baseadas na posição relativa dos resíduos de cisteína na proteína madura (VOLIN *et al.*, 2001). Apesar de a ação das quimiocinas ser mais evidente na quimiotaxia de macrófagos e linfócitos, alguns membros desta família de moléculas, como a proteína quimioatraente de

macrófagos (MCP-1) exerce esta função também sobre neutrófilos (CHRISTOPHERSON e HROMAS, 2001).

São secretadas em sítios de inflamação e infecção por células teciduais residentes, leucócitos residentes e recrutados e células endoteliais ativadas por citocinas. O aumento da secreção de quimiocinas durante a inflamação resulta no recrutamento seletivo de leucócitos para dentro do tecido inflamado. Os principais estímulos para a produção de quimiocinas são citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e TNF- $\alpha$ , produtos bacterianos e infecção viral. A capacidade de controlar precisamente o movimento de células inflamatórias sugere que as várias quimiocinas e seus receptores podem gerar novos alvos para intervenções terapêuticas (LUSTER, 1998).

### ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é uma pequena molécula lipofílica gasosa, capaz de difundir-se facilmente através das membranas biológicas. Trata-se, na verdade, de um radical livre, extremamente reativo dentre uma série de óxidos de nitrogênio, que pode reagir com outros radicais, formando espécies tão ou mais biologicamente ativas do que a molécula original (BRUCKDORFER, 2005).

O NO é gerado via oxidação da L-arginina pela enzima chamada óxido nítrico sintase (NOS) (NATHAN, 1997). Existem três isoformas da NOS identificadas, duas são expressas constitutivamente, sendo dependentes de cálcio/calmodulina e classificadas como endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) e uma é induzível por citocinas e é independente de cálcio/calmodulina (iNOS) (MONCADA *et al.*, 1995).

O papel do NO na inflamação está relacionado a várias funções: relaxamento do músculo liso vascular, redução da agregação e aderência plaquetária, redução do recrutamento de leucócitos, ação citostática e citotóxica através de mecanismo mediados por radicais livres que são protetores contra agentes infecciosos e células tumorais, mas que também podem ser lesivos para o próprio organismo, contribuindo para o estabelecimento de doenças inflamatórias (RIBBONS *et al.*, 1997).

### 3.4 Eventos vasculares da resposta inflamatória e formação do edema

O endotélio controla o tônus vascular a partir de músculos lisos vasculares pela liberação de várias substâncias vasoativas, incluindo o NO, espécies reativas do oxigênio, íons potássio, metabólitos do ácido araquidônico, como algumas prostaglandinas (PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) e alguns leucotrienos (LTB<sub>4</sub>) (LAWRENCE *et al.*, 2002).

O endotélio se comporta como uma camada condutiva propagando sinais elétricos ao longo do vaso sanguíneo, através das “gaps junctions” percorrendo toda parede vascular. Essa condução elétrica ativa canais de Ca<sup>2+</sup> voltagem dependentes, aumentando assim a concentração de Ca<sup>2+</sup> e conseqüentemente abrindo canais de K<sup>+</sup> dependentes de canais de Ca<sup>2+</sup>. Esses canais são os canais Ca<sup>2+</sup> de pequena condutância, amplamente distribuídos pela membrana plasmática, e os canais de condutância intermediária, expressos potencialmente nas células endoteliais em direção às células do músculo liso (FÉLÉTOU e VANHOUTTE, 2009).

A vasodilatação resulta em geração de calor e rubor local e tem como função aumentar o aporte de mediadores inflamatórios e de leucócitos circulantes no tecido inflamado, ocorrendo inicialmente nas arteríolas (LAWRENCE *et al.*, 2002). Sob as condições fisiopatológicas da inflamação, a hiperpermeabilidade vascular é promovida por mediadores circulantes e fatores de crescimento que se ligam aos receptores endoteliais e desse modo disparam sinais nessa barreira, até então semipermeável, permitindo assim o extravasamento plasmático e de proteínas formando o edema inflamatório, também denominado de exsudato (KUMAR *et al.*, 2009).

Dentre estes mediadores, destacam-se a histamina, a bradicinina, os leucotrienos, os componentes do sistema complemento, o fator de ativação plaquetária e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (LAWRENCE *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2009).

As células endoteliais são unidas por proteínas de adesão transmembranar que formam as regiões de junção. Existem as junções de oclusão (tight junctions) e as junções aderentes (adherens junctions), que impedem a passagem de proteínas do plasma (por exemplo, albumina e imunoglobulinas) para o espaço extravascular (DEJANA *et al.*, 2009).

O estímulo edematogênico é capaz de induzir a contração de células endoteliais, permitindo a formação de espaços entre as mesmas, e conseqüentemente o efluxo de líquidos e proteínas para o tecido. A passagem de líquidos e proteínas através do endotélio pode ainda ocorrer através da própria célula endotelial, mediado por poros chamados “fenestras” (estruturas dinâmicas capazes de contrair e dilatar) ou por transporte vascular através das

cavéolas (invaginações na membrana plasmática que funcionam como vesículas endocíticas) (RYAN e MAJNO, 1977; SERHAN *et al.*, 2008).

### **3.5 Moléculas de adesão de membrana envolvidas na migração leucocitária**

Uma importante forma de ativação de células na microcirculação é a expressão de moléculas de adesão de membrana que facilitam a fixação de células circulantes ao endotélio e de estruturas teciduais sobre o qual migram. Duas classes gerais de moléculas de adesão são descritas nos leucócitos: as integrinas e selectinas e seus ligantes. Elas são pré-expressas na membrana plasmática e também em grânulos citoplasmáticos ou podem ser sintetizadas novamente após estimulação (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

A fixação inicial de leucócitos às membranas endoteliais é facilitada por selectinas, um grupo de três lectinas de mamíferos (P, E e L-selectina). As L-selectinas localizam-se preferencialmente na região final das microvilosidades das membranas dos leucócitos que fazem ligação inicial com o endotélio. Já P-selectina é pré-expressa em vesículas de membranas das células endoteliais e podem também ser induzidas por síntese protéica. A E-selectina é encontrada predominantemente no endotélio e precisa ser induzida em condições inflamatórias (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

Em contrapartida, a firme adesão à membrana e a disseminação de células no endotélio são facilitadas pelas integrinas, uma família de heterodímeros e receptores tirosina quinase que atribuem sítios de adesão à matriz extracelular para as proteínas estruturais na célula citoplasmática e são também sinalizadores moleculares. Uma das mais importantes integrinas na reação inflamatória é a CD11b/CD18 (também conhecido como receptor complemento 3 ou Mac-1) expressa nos neutrófilos, macrófagos, monócitos e em linfócitos natural killer. Mac-1 pode se ligar a uma variedade de ligantes, sendo a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) um dos mais importantes, expressa em células endoteliais específicas em vênulas da microcirculação e menos expressa em arteríolas e capilares. ICAM-1 é um membro da superfamília das imunoglobulinas e sua expressão é regulada através de mecanismos de transcrição na microcirculação que são largamente desconhecidos (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

### 3.6 Marcadores da resposta de fase aguda

A resposta de fase aguda iniciada pela IL-1 ou TNF, ou ambas, inclui febre, catabolismo músculo-esquelético, aumento hepático de síntese de proteínas de fase aguda, alteração do sistema endócrino e neutrofilia (WAN *et al.*, 1989).

Em resposta à lesão tecidual ou à inflamação aguda, muitas proteínas plasmáticas sintetizadas pelo fígado exibem mudanças quantitativas que se manifestam em tempo variável após o início da resposta de fase aguda. Proteínas com um aumento transitório na síntese e na concentração plasmática são chamadas de proteínas positivas de fase aguda, enquanto que aquelas proteínas cuja síntese diminui são chamadas de proteínas negativas de fase aguda. Em muitas espécies de mamíferos, a regulação da expressão dos genes das proteínas de fase aguda é mediada por citocinas inflamatórias que incluem principalmente Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-1 (IL-1) e Fator de Necrose Tumoral (TNF) (LYOUMI *et al.*, 1998).

Os efeitos das citocinas sobre o padrão de expressão gênica hepática durante o processo inflamatório permite distinguir duas classes de proteínas de fase aguda: a classe 1 em humanos inclui a Hepatoglobina, Proteína C Reativa (PCR), Amilóide Sérica A (SSA),  $\alpha$ -1 glicoproteína ácida (AGP) e Hemopexina, reguladas principalmente por IL-1 ou combinações de IL-1, IL-6 e glicocorticóides. A classe 2 inclui o fibrinogênio,  $\alpha$ -1 antiqumotripsina e a  $\alpha$ -1 antitripsina e são reguladas exclusivamente pela IL-6 e glicocorticóides (LYOUMI *et al.*, 1998).

A IL-6 estimula, no fígado, a síntese de algumas proteínas como a  $\alpha$ -1 glicoproteína ácida, a amilóide sérica A e a PCR e inibe a síntese de outras proteínas como a transferrina e a albumina. Os marcadores da resposta inflamatória mais sensíveis são elevado nível sérico de PCR e o reduzido nível sérico de albumina (SANTOS *et al.*, 2004).

### 3.7 Fase Subcrônica da Resposta Inflamatória

A lesão granulomatosa induzida por “pellets” de algodão é um modelo de inflamação subcrônica indicativo da fase proliferativa da inflamação. De acordo com COLLINS (2000), a inflamação granulomatosa é um tipo específico de inflamação desencadeada por uma variedade de agentes infecciosos e não infecciosos. Um granuloma é uma área focal de inflamação granulomatosa e consiste em uma agregação de macrófagos que estão transformados em células de aparência epitelial (epitelióide), circundadas por leucócitos mononucleares, principalmente linfócitos. De acordo com FREITAS (1997), vários

mediadores estão envolvidos na fase subcrônica da inflamação. Fatores quimiotáticos como produtos do sistema complemento (C5a e C567), LTB<sub>4</sub>, linfocinas, histamina, bem como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e várias interleucinas, numa complexa organização funcional, seriam os responsáveis pelas etapas do processo.

### 3.8 Indometacina

A indometacina é um fármaco derivado do ácido indolacético, pertencente à categoria dos antiinflamatórios não-esteróides (AINEs). Da mesma forma que os outros AINEs, a indometacina apresenta potente atividade antiinflamatória, além de ação analgésica e antipirética. É empregada em doenças inflamatórias reumáticas, sendo também indicada em situações não inflamatórias como doenças degenerativas das articulações (osteoartrite e espondilite anquilosante), cólicas, febre e dor de cabeça (ROBERTS II e MORROW, 2001).

O efeito antiinflamatório da indometacina é mediado tanto pela inibição de ambas as isoformas da COX quanto pela redução da migração dos neutrófilos (JACOBS e BIJLSMA, 1997; PESKAR, 2001). Em função de seu efeito inibitório sobre a COX-1, a indometacina apresenta importantes efeitos adversos, que são dose-dependente e restringem sua utilização a doenças inflamatórias severas, nas quais outras alternativas terapêuticas não são efetivas (ROBERTS II e MORROW, 2001). Sua toxicidade está relacionada principalmente ao trato gastrointestinal, no qual pode provocar ulcerações, perfurações e hemorragias. Tem sido observado que um efeito citotóxico direto independente das COXs está envolvido com o desenvolvimento de lesões gastrintestinais (TOMISATO *et al.*, 2004). A inibição de prostaglandinas renais protetoras dos efeitos vasoconstritores de angiotensina e catecolaminas pode agravar disfunções renais preexistentes e causar insuficiência renal, tornando necessária a interrupção do tratamento para a reversão do quadro clínico (ROBERTS II e MORROW, 2001; WANNMACHER e FERREIRA, 2004).

Os efeitos dos AINEs em pacientes com artrite reumatóide são atribuídos à inibição da ativação leucocitária e adesão de leucócitos, função que parece ser independente da inibição da síntese de prostaglandinas. Entretanto, assim como outros AINEs, o uso da indometacina no tratamento de doenças reumáticas visa apenas o alívio dos sintomas, principalmente a dor e a inflamação, uma vez que inexitem tratamentos que possam ser considerados terapias definitivas, ou capazes de impedir as deformidades e a perda de função locomotora relacionadas com essas doenças (ROBERTS II e MORROW, 2001; WANNMACHER e FERREIRA, 2004).

Hartel *et al.* (2004) avaliaram o impacto da inibição da COX pela indometacina na produção de citocinas. Monócitos incubados com diferentes concentrações terapêuticas desse fármaco apresentaram aumento dose-dependente na expressão de fator de necrose tumoral (TNF) e de interleucina-6 (IL-6). Dessa forma, o estudo propõe que a indometacina está associada ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que a inibição da COX poderia ser crucial para a imunomodulação pró-inflamatória.

### 3.9 Nutrição, sistema imune e inflamação

O sistema imunológico é filogeneticamente dividido em imunidade inata ou não específica e sistema imune adaptativo ou específico, havendo uma interação entre esses sistemas em níveis moleculares e celulares. A imunidade inata é caracterizada pela presença de neutrófilos, encontrados em maior abundância no sangue periférico, com importante papel na fase inicial das reações inflamatórias. São sensíveis a agentes quimiotáxicos como produtos de clivagem de frações do complemento (C3a e C5a) e substâncias liberadas por mastócitos e basófilos. Estão entre as primeiras células a migrarem dos vasos para os tecidos atraídos por quimiocinas, como a IL-8, e são ativados por diversos estímulos, como produtos bacterianos, proteínas do complemento (C5a), imunocomplexos (IC), quimiocinas e citocinas (WAN *et al.*, 1989; REAVES *et al.*, 2005).

Os macrófagos também participam da resposta imune inata, e juntamente com os neutrófilos, são responsáveis pela fagocitose e morte de muitos microorganismos patogênicos. Além de mediar as respostas de fase aguda, os macrófagos são responsáveis pela apresentação e processamento de antígenos, desencadeando assim a resposta imune específica. Potencializam a ativação de Linfócitos T e Linfócitos B pela expressão de moléculas co-estimuladoras e liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e quimiocinas (WAN *et al.*, 1989; HEYWORTH *et al.*, 2003).

Evidências sugerem que insulto nutricional decorrente da desnutrição protéico-energética contribui para anormalidades na resposta inflamatória. O principal objetivo da terapia nutricional na doença inflamatória é fornecer proteína e energia suficientes para atender às necessidades endógenas para reparação tecidual, produção de IL-1 e restauração da função celular, evitando assim infecções secundárias. O suporte nutricional durante a fase aguda da resposta inflamatória deve ser direcionado para redistribuição de aminoácidos e conseqüente regulação da síntese protéica, uma vez que a síntese de anticorpos, produção de

linfócitos, citólise mediada por células e produção de citocinas são dependentes da síntese protéica (WAN *et al.*, 1989).

O período crítico de desenvolvimento do sistema imunológico ocorre a partir das primeiras semanas de vida pré-natal, sendo a competência imunológica adquirida gradualmente após o nascimento tanto em humanos como em animais (SPENCER *et al.*, 2006). A desnutrição, uma importante causa de imunossupressão em períodos críticos da gestação e maturação neonatal, prejudica o desenvolvimento e diferenciação de um sistema imunológico normal. Tem sido relatado que tanto a morfogênese da medula óssea vermelha, em termos quantitativos, como também a função das células imunológicas em adultos submetidos à desnutrição intrauterina estão comprometidos (LANDGRAF *et al.*, 2007).

Os principais prejuízos nos mecanismos imunes são caracterizados pela redução da função linfocitária, traduzida em danos da estrutura e função do timo e redução das respostas de células T a antígenos específicos, além da redução de migração de leucócitos para os locais de infecção e diminuição acentuada da síntese citocinas pró-inflamatórias. A resposta celular imune é mais diretamente afetada pela desnutrição calórico-protéica do que o sistema imune humoral (CUNNINGHAM *et al.*, 2005; LANDGRAF *et al.*, 2007).

A redução da migração leucocitária pode estar relacionada ao comprometimento da relação leucócito-endotélio, principalmente no processo de pavimentação da resposta inflamatória aguda, observando-se uma redução da expressão de P-selectina endotelial e L-selectina leucocitária, além da significativa diminuição da expressão de ICAM-1, reduzindo dessa forma a capacidade de neutrófilos em aderir ao endotélio e conseqüentemente a eficácia da resposta inflamatória em animais submetidos à desnutrição intrauterina (LANDGRAF *et al.*, 2005).

De acordo com Fock *et al.* (2007), estudos experimentais em roedores gravemente desnutridos mostram redução de parâmetros das imunidades inespecífica e específica, como por exemplo menor ativação de macrófagos e diminuição de granulócitos polimorfonucleares, linfócitos e monócitos.

Poucos estudos têm investigado o impacto da desnutrição intrauterina sobre os mecanismos da resposta inflamatória local e sistêmica na prole durante a idade adulta em ratos, bem como suas implicações nos efeitos (farmacológicos e adversos) de antiinflamatórios não esteróides (AINES) como a indometacina. É evidente que o entendimento da resposta inflamatória em indivíduos com deficiências nutricionais intra-uterinas, considerando os numerosos fatores envolvidos na resposta inflamatória como Interleucinas (IL), Fator de Necrose Tumoral (TNF), albumina, Proteína-C-Reativa (PCR),

células leucocitárias, entre outros, pode favorecer o desenvolvimento de novas estratégias para prever suscetibilidade a doenças, acompanhar terapias e, em última instância, desenvolver novas abordagens para a prevenção e o tratamento de doenças nas quais a resposta inflamatória tem implicações fisiopatológicas (artrite reumatóide, arteriosclerose, doenças inflamatórias intestinais).

## MÉTODOS

---

### 4 MÉTODOS

#### 4.1 Animais

Foram utilizadas 30 ratas albinas primíparas da linhagem *Wistar*, com peso corporal compreendido entre 200 e 220 g, e seus descendentes machos provenientes da colônia de criação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em biotério de experimentação com temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 1$ , ciclo claro-escuro de 12/12 horas e alojados em gaiolas de polipropileno com dimensões de 46x31x21 cm (CxLxA) com livre acesso à água.

As ratas primíparas foram acasaladas (2 ratas para cada macho). A gestação foi confirmada pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal montado em lâmina histológica. A seguir, as ratas foram divididas em dois grupos de acordo com a dieta fornecida: Controle Normonutridos (Controle-N, n=15), alimentadas com dieta padrão Labina® ou Desnutridas durante a gestação (DBR-g, n=15) alimentadas com a Dieta Básica Regional (DBR). Durante a lactação, as ratas permaneceram recebendo dieta Labina® e a ninhada foi reduzida para 6 filhotes. Ao desmame (21 dias de idade) somente os filhotes machos (Controle-N, n=36 e DBR-g, n=36) permaneceram no experimento e receberam dieta equilibrada Labina®, enquanto que as fêmeas (mães e filhotes) foram eutanasiadas por inalação de CO<sub>2</sub>. Aos 60 dias de idade, os animais foram submetidos aos diferentes ensaios biológicos e subdivididos em grupos de acordo com o modelo experimental.

#### 4.2 Manipulação Nutricional

Durante a gestação, as ratas do grupo Controle-N receberam dieta padrão de biotério Labina®, cuja composição se encontra detalhada na tabela 1. O grupo DBR-g recebeu dieta multicarenciada Dieta Básica Regional (tabela 2). Após o desmame, todos os filhotes receberam dieta Labina®.

Os pesos dos animais descendentes foram mensurados ao nascimento, ao desmame e no 60º dia de vida.

**Tabela 1:** Composição da dieta padrão (Labina®, Purina Brasil)

Ingredientes	Quantidade (g)	Calorias (Kcal)
Proteína	23,0	92,0
Carboidratos	74,5	288,0
Gordura	2,5	22,5
<b>Total</b>	<b>100,0</b>	<b>402,5</b>

**Tabela 2:** Composição básica centesimal da Dieta Básica Regional (DBR) segundo Teodósio et al. (1990).

INGREDIENTES	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA DBR						
	g%	Proteínas	Carboidratos	Gorduras	Cinza	Fibras	kcal
Feijão*	18,34	3,99	10,66	0,24	0,57	1,09	60,76
Mandioca	64,81	0,84	48,59	0,12	0,43	5,64	198,8
Carne seca e salgada*	3,73	2,74	-	0,05	0,06	-	11,50
Gordura da carne seca e salgada	0,35	-	-	-	-	-	3,15
Batata doce*	12,76	0,30	9,99	0,20	0,20	0,48	41,43
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>7,87</b>	<b>69,24</b>	<b>1,26</b>	<b>1,26</b>	<b>7,21</b>	<b>315,64</b>

\* = Cozido, desidratado e moído

### 4.3 Delineamento Metodológico

#### 4.3.1. Fase aguda da resposta inflamatória- Edema de pata induzido por carragenina (Winter et al., 1962)

Dois experimentos foram realizados. No Experimento A, os animais (n=6 animais/grupo) Controle Normonutridos (Controle-N) ou submetidos à desnutrição durante a gestação (DBR-g) receberam uma injeção subplantar de 0,1 mL de carragenina tipo IV (1% w/v em salina) na pata traseira direita. No experimento B, um terceiro e quarto grupos de

animais foram submetidos ao mesmo procedimento acima descrito, mas ao invés de salina, os animais normonutridos (Controle-NI) ou submetidos à desnutrição durante a gestação (DBRI-g) foram previamente tratados com indometacina (10 mg/kg; v.o.) 45 min antes da injeção subplantar do agente edematogênico (carragenina). O volume da pata injetada foi medido pletismograficamente (pletismômetro Ugo Basile) antes (0 min) e 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após a injeção da carragenina. A variação do volume das patas foi expresso em mililitros pela diferença registrada no volume das patas antes (0 min.) e após a injeção do agente edematogênico ao final de cada intervalo de tempo. A intensidade da resposta inflamatória (volume do edema) exibida pelo grupo DBR-g foi comparada à do grupo Controle-N. A atividade antiedematogênica da indometacina nos grupos DBRI-g e Controle-NI foram calculadas, de acordo com a fórmula abaixo, em termos de porcentagem de inibição:

Porcentagem de inibição =  $1 - \frac{V_t}{V_c} \times 100$ , onde  $V_t$  e  $V_c$  correspondem à média das diferenças resultantes das medidas das patas nos grupos tratados com indometacina (DBRI-g ou Controle-NI) e controle (DBR-g ou Controle-N, respectivamente).

#### ***4.3.2 Fase aguda da resposta inflamatória- Edema de pata induzido por zimosan (Gado e Gigler, 1991)***

O procedimento para indução do edema foi semelhante àquele empregado no método anterior, à exceção do agente edematogênico que, neste caso, foi o zimosan (0,1 mL) diluído em salina (1mg/mL). Nesse procedimento, os dois experimentos A e B realizados no método anterior também foram aplicados e a intensidade da resposta inflamatória (volume do edema) exibida pelo grupo DBR-g foi comparada à do grupo Controle-N. A atividade antiedematogênica da indometacina nos grupos DBRI-g e Controle-NI foram calculadas, em termos de porcentagem de inibição, de acordo com a fórmula descrita anteriormente.

#### ***4.3.3 Fase subcrônica da resposta inflamatória- Reação granulomatosa induzida por pellets de algodão (Winter e Potter, 1957)***

Dois experimentos foram realizados. No Experimento C, os animais submetidos à desnutrição durante a gestação (DBR-g) ou Controle Normonutridos (Controle-N) foram anestesiados com uma associação de cetamina (15 mg/kg i.m) e xilazina (50 mg/kg i.m.) e tiveram a região cervical na linha média dorsal tricotomizada através da depilação manual e aplicação da técnica anti-sepsia com álcool 70%. Em seguida, dois “pellets” de algodão ( $50 \pm$

1 mg) foram assepticamente implantados na região subcutânea em cada lado da linha mediana dorsal de cada animal, próximo à região axilar e foi administrado solução de NaCl 0,9% (1 mL/animal/dia; v.o.) durante 7 dias consecutivos. No experimento D, um terceiro (DBRI-g) e quarto grupos (Controle-NI) foram submetidos ao mesmo procedimento acima descrito, mas foram tratados diariamente com indometacina (2 mg/kg; v.o), em dose única. No oitavo dia, os animais de todos os grupos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, dissecados e os “pellets” granulomatosos foram submetidos ao processo de desidratação em estufa a 70°C até a obtenção de peso constante. O peso dos “pellets” de algodão antes da implantação foi subtraído de seu peso após a dissecação e secagem. A média do peso dos “pellets” secos foi determinada para todos os grupos e a intensidade da resposta inflamatória do grupo DBR-g foi comparada com a do grupo Controle-N. A porcentagem de inibição do granuloma nos grupos tratados com indometacina (DBRI-g e Controle-NI) foi calculada em relação aos grupos não tratados (DBR-g e Controle-N, respectivamente), conforme descrito anteriormente.

#### ***4.3.4 Determinação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos***

Ao final dos experimentos, foram obtidas amostras de sangue (cerca de 5 mL) de todos os animais através do plexo orbital para determinação de variáveis bioquímicas (Albumina sérica e Proteína C Reativa (PCR) e hematológicas (contagem total e diferencial dos leucócitos). A determinação do número total de leucócitos foi realizada por método automatizado através do aparelho Coulter TKS. Para a contagem diferencial dos leucócitos foi utilizada a técnica do esfregaço sanguíneo corado pelo método de May-Grunwald-Giemsa (segmentados, eosinófilos, linfócitos e monócitos). Os testes foram realizados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

#### ***4.3.5 Dosagem de citocinas***

A pele da região plantar das patas foi obtida após 4 horas de injeção de carragenina ou zymosan e homogeneizadas em 500 µL de solução tampão. Os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 foram determinados pelo método ELISA sanduíche através da utilização de kits específicos para ratos e de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, Califórnia, Estados Unidos). Todas as amostras foram testadas em duplicata e os resultados foram obtidos através da comparação da absorbância com as curvas padrões. Além disso, os

resultados foram ajustados para 0,5 mL, volume utilizado para extrair as citocinas da pele da pata, e foram expressos em picograma por pata (pg/pata) para cada citocina.

#### **4.4 Análise estatística**

Os valores foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. Para avaliação de peso, volume do edema, intensidade de resposta inflamatória e percentagem de inibição de edema pela indometacina foram utilizados o teste ANOVA duas vias, seguido do teste de Bonferroni. Para a comparação entre os grupos em relação à análise de parâmetros hematológicos, bioquímicos e quantificação de citocinas foram utilizados o teste ANOVA uma via, seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância foi mantido  $p \leq 0,05$  e toda análise estatística foi realizada utilizando o programa Graphpad Prism 5.0 para Windows.

#### **4.5 Considerações bioéticas**

Os procedimentos adotados no manejo dos animais seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (BRASIL, 1979).

O projeto foi enviado e aprovado junto ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (Processo No: 230760070027/2008-19).

## RESULTADOS

---

### 5.0 RESULTADOS

#### 5.1 ARTIGO ORIGINAL

**Título:** Impact of early malnourishment on the acute and subchronic inflammatory responses and its implications in the effect of indomethacin on Wistar rats.

**Autores:**

Rafaella Rodrigues BARRETO<sup>1</sup>

Eryvelton de Souza FRANCO<sup>1</sup>

Carlos Fernando BRASILEIRO<sup>1</sup>

Gustavo Santiago DIMECH<sup>2</sup>

Teresinha Gonçalves da SILVA<sup>2</sup>

Maria Bernadete de Sousa MAIA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology and Pharmacology, Laboratory of Pharmacology of Bioactive Products, Federal University of Pernambuco, <sup>2</sup>Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco

**Endereço para correspondência:**

Maria Bernadete de Sousa Maia

Prédio da Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 52670-901, Recife-PE Brasil

Email: mbsm@ufpe.br

**Submetido à revista European Journal of Pharmaceutical Sciences**

## 1. Abstract

**Aim:** To Investigate the impact of intrauterine malnutrition on the acute and subchronic inflammatory response and its influence on the pharmacological effect of indomethacin.

**Methods Design:** Rat offspring of dams which were fed from the first day of their gestation to its term received a balanced diet (Labina) or a basic regional diet (BRD) from northeast Brazil. According to their dams, the offspring were divided in two groups: Control-N (nourished) e BRD-g (malnourished during gestation). At two months of age, the animals were subjected to the models of acute and subchronic inflammation. Carrageenan or zymosan (0.1 mL) was inoculated into the plantar surface of hind paw (0 minute) of the animals. All animals received (saline 0.9%; p.o). Another set of adult offspring was submitted to same procedure above, but instead of saline they received indomethacin (10mg/kg; p.o), and were divided in two groups: Control-NI (Control-N treated with indomethacin), and BRDI-g (BRD-g treated with indomethacin). The hind paw volume was calculated (0 minute (initial paw volume), 30, 60, 120, 180 and 240 minutes). In the subchronic model of inflammation, two cotton pellets of  $50 \pm 1$  mg were aseptically implanted in the dorsum of the animals both in the Control-N and BRD-g groups and they received 0.9% saline for seven consecutive days. Other groups of animals (Control-NI and BRDI-g) underwent the same procedure as above but were treated daily with indomethacin (2 mg / kg, po) with a single daily dose. Subsequently, the pellets were subjected to dissection to obtain the average weight. Hind paw swelling, blood albumin and C-reactive protein (CRP) levels, leucocytes count and cytokine levels were evaluated as indicators of inflammation. **Results:** Malnutrition during pregnancy caused fetal growth retardation which was shown in low birth weight ( $5.38 \pm 0.28$ ), when compared to the Control-N ( $7.26 \pm 0.64$ ) group. The volume of paw edema, the serum levels of CRP and albumin, the average weight of granuloma and cytokine levels were lower than those in the BRD-g group when compared to the ones in the Control-N groups, in both models of inflammation studied. However, no difference was found in the total leukocyte count. When compared to the respective groups treated with saline (Control-N and BRD-g), the antiinflammatory effect of indomethacin in the animals of BRDI-g groups was lower than in the Control-NI groups, in the model of acute inflammation ; in the model of subchronic inflammation, the pharmacological effect of indomethacin was effective only in normo-nourished animals. **Conclusion:** The malnutrition in the early stages of development attenuated the severity of the acute inflammatory response, but there was no statistically significant change in subchronic inflammation induced by granulomatous lesion.

**Keywords:** Malnutrition; acute inflammation; subchronic inflammation; indomethacin

## 2 INTRODUCTION

Malnutrition has been considered an important factor in the increasing susceptibility to infections in normal individuals and in hospitalized patients<sup>(1)</sup>. The lack or deficiency of nutrients during the critical period of development seems to show associations with the structure and function of tissues in adult life<sup>(2)</sup>. Epidemiological studies have associated the emergence of chronic non-communicable and degenerative diseases in adulthood (obesity, heart disease, diabetes and hypertension) with low birth weight<sup>(3)</sup>.

Experimental studies indicate that malnutrition undermines both the acute inflammatory<sup>(4)</sup> and the systemic<sup>(5-7)</sup> response. Epidemiological findings show a reduction in cell-mediated immune responses and humoral response in subjects with intrauterine growth retardation, as a consequence of perinatal malnutrition in childhood and adolescence<sup>(6)</sup>. The phagocytic function and the cytokine production are also impaired in situations of protein-energy malnutrition, often incapacitating the immune system to solve complete conditions of systemic inflammatory response such as, for example, an excessive inflammatory response<sup>(8)</sup>.

Using nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is often indicated in cases where the morbidity of inflammatory reaction outweighs the benefits afforded by regenerative tissue inflammation. Indomethacin is a methyl indole acetic acid derivative belonging to the class of NSAIDs commonly used to reduce paw edema in experimental carrageenin and zymosan in which they function as edema agents.

The relationship between perinatal malnutrition and its impact on local and systemic inflammatory response has been little explored, and nutritional status also hasn't been implicated as a factor that may affect the pharmacokinetics and pharmacodynamics of many drugs.

Thus, this study aims to determine the impact of perinatal malnutrition, induced by a Basic Regional Diet (BRD), available in the rural area of the state of Pernambuco, Brazil, on the acute inflammatory responses characterized by paw edema induced by carrageenin and zymosan and the subchronic response by granulomatous lesions induced by cotton pellets, and to evaluate the anti-inflammatory properties of indomethacin.

### 3 MATERIAL AND METHODS

#### Animals

First time pregnant Wistar rat (200-220g) and their offspring (male Wistar rats) from the breeding colony from the Department of Nutrition at the University of Pernambuco were used. The animals were mated at a ratio of two females to one male in polypropylene cages with dimensions of 46x31x21 cm (LxWxH) in an environment with a temperature of 22 ° C with free access to filtered water. The first day of pregnancy was determined by observing the presence of sperm in vaginal fluid.

#### Maternal diet and date:

As soon as the pregnancy was detected, the group of pregnant rats was divided in two groups: 1) A control group (Control-N) , which was represented by dams who continued on an *ad libitum* diet of laboratory standard (Labina- Purina, Brazil), this diet being composed of 23% protein, 74.5% of carbohydrates and 2.5% fat, 2) Dams which received a basic regional diet (BRD) until their pregnancy came to term (BRD-g). This diet was rich in carbohydrates (69.24%) and deficient in proteins (7.87%), lipids (1.26%), vitamins and minerals, including sodium chloride<sup>(9)</sup>. Immediately after the birth, the pups were fed *ad libitum* with a laboratory standard diet. In their sixtieth day of life, the adult male offspring were then subjected to biological assays. The weights of the offspring were measured at birth, at the 21eth and at the 60eth day of life.

#### Experimental Protocol

Four experiments were carried out:

Experiment A- To assess the impact of early malnutrition on the intensity of acute inflammatory response of adult offspring, 0.1 mL of a commercially prepared carrageenan (1% w/v)<sup>(10)</sup> or zymosan (1% w/v)<sup>(11)</sup> was inoculated into the right hind paw of adult male offspring. The animals were allowed to develop acute inflammation over a period of 4 hours, and divided in two groups (n = 6) according their own dams namely: 1) Control-N and 2) BRD-g. Since they would be used as a control to the Experiment B, all animals received a single dose (via gavage) of 0.9% saline (5mL/kg). The volume of the hind paw swelling (mL)

was measured with an electronic water plethysmometer (Ugo Basile, Italy) at zero minute (before) and 30, 60, 120, 180 and 240 minutes after a carrageenan or zymosan injection. The severity of hind paw inflammation was calculated by the paw volume variation ( $\Delta V$ ) between each time interval and initial hind paw volume ( $t=zero$ ). The hind paw volume (severity of inflammatory response) in the BRD-g group was compared to the volume in the Control-N group. At the end of the experiments blood samples were extracted through the orbital plexus for evaluation of hematologic (total leukocytes and differential) and biochemical (plasma albumin and C-reactive protein (CRP) levels) variables.

- Experiment B - To assess the impact of malnutrition on the anti-inflammatory effect of indomethacin in adult offspring, another set of animals was submitted to the same procedure described above, but instead of saline they received a single dose (via gavage) of indomethacin (10mg/kg) 45 minutes before the injection of carrageenan or zymosan. According to their own dams, they were divided in two groups (n=6), labelled as: 1) Control-NI - that represents nourished adult offspring treated with indomethacin and 2) BRDI-g - that represents malnourished adult offspring treated during gestation with indomethacin. The anti-inflammatory effect of indomethacin (expressed as percentage inhibition of edema) in each group was determined by comparing the hind paw volume between the Control-NI groups and the BRDI-g groups with their respective control groups, Control-N and BRD-g. According to the formula below:

Percent inhibition (% I) =  $1 - V_t / V_c \times 100$ , where  $V_t$  and  $V_c$  represents the average of the differences resulting from the hind paw volume in the group treated with indomethacin and control (untreated), respectively.

Experiment C - To assess the impact of early malnutrition on severity of subchronic inflammatory response of adult offspring, two cotton “pellets” of ( $50 \pm 1$  mg) were aseptically implanted subcutaneously into each side of the dorsal midline of each animal near the axillary region<sup>(12)</sup>. The animals were allowed to develop subchronic inflammation over a period of 7 days, and divided in two groups (n = 6) according to their own dams, namely: 1) Control-N and 2) BRD-g. Since they would be used as a control tool to Experiment B, all animals received a single dose (via gavage) of 0.9% saline (5mL/kg). On the eighth day, animals of all groups were sacrificed in a CO<sub>2</sub> chamber and the “pellets” surrounded by granuloma tissues were dissected out, weighed, dried for 24 h at 70 ° C and again weighed. The weight of the cotton pellets, before the deployment, was subtracted from their weight after the dissection and drying process. The average weight of the dried pellets was

determined for all groups and the intensity of the inflammatory response of the BRD-g group was compared to Control-N.

- Experiment D - To evaluate the impact of malnutrition on the anti-inflammatory effect of indomethacin in adult offspring, another set of animals was submitted to the same procedure described above, but instead of saline they received a daily dose (via gavage) of indomethacin (2mg/kg) during 7 days in a row. According to their own dams, they were divided in two groups (n=6) labelled as; 1) Control-NI - that represents nourished adult offspring treated with indomethacin and 2) BDRI-g - that represents malnourished adult offspring treated during gestation with indomethacin. The percentage of inhibition of granuloma in the groups treated with indomethacin (BRDI-g and Control-NI) was calculated relatively to the untreated groups (Control-N and BRD-g, respectively), as previously described.

#### **Determination of biochemical and hematological parameters:**

At the end of the experiments, blood samples for determination of biochemical (plasma albumin and C-reactive protein (CRP) levels) and hematological variables (total and differential leukocytes) were obtained through the orbital plexus. Total leukocytes count was performed in hematological cell analyzer Coulter TKS. Blood smears, stained with May-Grunwald-Giemsa, were used for differential counts of leukocytes (segmented, eosinophils, lymphocytes and monocytes). The tests were performed at the Central Laboratory of the Hospital das Clínicas, at Federal University of Pernambuco. Then all the animals were euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber.

#### **Determination of TNF- $\alpha$ and IL-6 levels**

The skin in the plantar area of the paws was obtained 4 h after carrageenan or zymosan injection and homogenized in 500  $\mu$ L of the appropriate buffer. The levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 were determined by sandwich Elisa test by using specific kits for rats and according to the manufacturer's instructions (Bioscience, San Diego, California, USA). All samples were double tested and the results were obtained by comparing the absorbance with standard curves. In addition, the results, which were adjusted to 0.5 mL, the volume used to extract the cytokine from the paw skin, are expressed as picograms of respective cytokine per paw.

## **Bioethical considerations**

The procedures in the handling of the animals followed the recommendations of the Brazilian College of Animal Experimentation - COBEA (BRAZIL, 1979). The experimental protocol and all procedures in the project were submitted and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of Federal University of Pernambuco (UFPE) (Protocol number: 230760070027/2008-19).

## **Statistical analysis:**

Results are given as average  $\pm$  standard deviation (SD). To assess weight, intensity of inflammatory response and percent inhibition of edema by indomethacin the two-way ANOVA test was used, followed by the Bonferroni test. For comparison between groups regarding the analysis of hematological, biochemical and quantification of cytokines the one-way ANOVA test was applied, followed by the Turkey test for multiple comparisons. The significance level was maintained at 5% ( $p < 0.05$ ) and all statistical analysis was performed using the program Graphpad Prism 5.0 for Windows.

## **4 RESULTS**

### ***Parameters of control and undernourished Wistar rat offspring***

As detailed in Table 1, maternal malnutrition impaired fetal growth, verified by the low body weight on birth as compared to the nourished one (Control-N) .

### **"Table 1"**

### ***Influence of early undernutrition on severity of inflammatory response***

In both groups of nourished and malnourished animals a single injection of carrageenan or zymosan (0.1 mL) in the right paw of each rat produced unilateral paw swelling due to edema during a period of 6 hours. However, the acute inflammatory response in malnourished animals differed markedly from that found in corresponding control animals.

Figure 1 shows the evolution of paw edema in the model of acute inflammation. The severity of the inflammatory response (magnitude of the swelling of the hind paw) induced by carrageenan was significantly lower ( $p < 0.05$ ) in animals BRD-g when compared to that observed in the Control-N animals at 30, 60 and 120 minutes. From the 3rd hour there was no difference between the volumes of the paws in groups BRD-g and Control-N, but the inflammatory response reached its peak in the 3rd hour in both Control-N animals and BRD-g animals (Figure 1A). Figure 1B shows the evolution of paw edema induced by zymosan. The severity of the inflammatory response induced by zymosan was significantly lower ( $p < 0.05$ ) in BRD-g animals when compared to that observed in the Control-N animals from the first hour on, and the peak of magnitude of the swelling of the hind has also been achieved around the third hour.. Table 2 shows the severity of the inflammatory response in Control-N and BRD-g animals submitted to subchronic model of inflammation. No statistical difference was observed between the groups.

### **"Figure 1 and Table 2"**

#### ***Influence of malnutrition on anti-inflammatory effect of indomethacin***

Figure 2 shows the evolution of paw edema in nourished (2A) and malnourished (2B) groups treated with indomethacin (10 mg/kg) in model of acute inflammation induced by carrageenin and figure 3 show the evolution of paw edema in nourished (3A) and malnourished (3B) groups treated with indomethacin (10 mg/Kg) in model of acute inflammation induced by zymosan. As observed for the acute inflammatory response, the pharmacological response to indomethacin in malnourished animals also differs markedly from that observed in corresponding control animals. Although it was found that the treatment with indomethacin attenuated the paw edema in all groups (Control-NI and BRDI-g), its effectiveness as an anti-inflammatory was lower ( $p < 0.05$ ) in the animals which were subjected to perinatal malnutrition. However, both in the Control-N and in the BRD-g groups, which were subjected to two models of acute inflammation, the pharmacological effect of indomethacin has become evident from the 1st hour on. Figure 4 shows the effect of the treatment with indomethacin (2 mg / kg) both in the nourished and malnourished groups undergoing granulomatous reaction. The efficacy of indomethacin as an anti-inflammatory drug was only observed in animals from Control-NI group ( $p < 0.05$ ) when compared to the Control-N group.

**"Figures 2, 3 and 4"*****Biochemical and hematological parameters of control and malnourished adult male Wistar rat offspring***

The plasma levels of albumin and C-reactive protein were statistically different in the Control-N and BRD-g groups submitted to the different models of inflammation. During the inflammation process, the levels of plasma C-reactive-protein were significantly increased while the plasma levels of albumin were lower in all groups in relation to no inflamed animals. However, plasma levels of albumin and C-reactive protein was lower in undernourished (BRD-g) when compared to animals from control group (Control-N). Regarding total and differential counts of leucocytes, statistical difference was seen only in the number of lymphocytes of rats subjected to this model of acute inflammation by carrageenan (Table 3).

**"Table 3"*****Determination of TNF- $\alpha$  and IL-6 levels of control and malnourished adult male Wistar rat offspring***

Figure 5 shows the levels of TNF- $\alpha$  in control and malnourished groups submitted to the model of acute inflammation induced by carrageenan (5A) and zymosan (5B) and figure 6 show the levels of IL-6 in both control and malnourished groups submitted to the model of acute inflammation induced by carrageenan (6B) and zymosan (6B). The levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 were significantly lower ( $p < 0.05$ ) in BRD-g animals, compared to the ones in the Control-N group, in both models of inflammation.

**"Figures 5 and 6"****5 DISCUSSION**

In this work, models of acute inflammation, induced by carrageenan or zymosan, and subchronic inflammation, induced by granulomatous reaction, were used to investigate the

impact of early undernutrition on acute and subchronic inflammatory and pharmacological response to indomethacin in adult rat offspring undernourished during gestation.

Handling the amount of protein in the diet during pregnancy is a well established model of malnutrition and it has been used in studies on fetal programming of metabolic diseases of adulthood<sup>(13-14)</sup>. The use of a multi-deprived diet (BRD) by pregnant rats resulted in a reduction in both body weight and weight gain in malnourished offspring compared to the offspring of the nourished control group (Table 1). The deficit on the weight gain of the offspring is associated with the short supply of nutrients from the mother, and consequently with the lowest nutrient transfer to offspring, impacting negatively on the growth of the organs<sup>(13)</sup>. Studies using both low protein (8% casein)<sup>(15)</sup> multi-deprived diet (BRD)<sup>(9)</sup> demonstrated that inadequate levels of protein and other nutrients can influence the quality of breastmilk.

The inflammatory mechanisms in the body are very complex and they can not be attributed to a single factor or mediator<sup>(16)</sup>, occurring in three distinct phases: (I) acute transitory phase, characterized by local vessel dilatation and capillary permeability increase, which result in the formation of a local inflammatory exudate; (II) late sub-acute phase, characterized by the infiltration of white and phagocytary cells and (III) chronic phase, in which fibrosis and tissue degeneration occurs. In a healthy individual, this coordinated set of physiologic actions results in a competent inflammatory response that fights infection and tissue injury and, thus, promotes recovery from external stressors before involvement of the specific immune system<sup>(8,17)</sup>.

Regarding the intensity of acute inflammatory response, the nourished and malnourished groups showed a significant difference. A comparatively lower ( $p < 0.05$ ) magnitude of hind paw swelling was produced after a carrageenan or zymosan injection in the adult offspring from malnourished dams (BRD-g) as compared to the nourished ones (Control-N), suggesting a decrease in the inflammatory response competence. The agents of inflammation (carrageenan and zymosan) used for inducing paw edema had a similar effect in the evolution of the edema, showing that the edema formation occurred about 30 minutes after the injection of the irritant agent, with accelerated development, and then reached a plateau around the third hour. As can be verified, the resultant hind paw swelling developed more slowly and was not as sharp as in the Control-N animals, and the extent of inflammatory response was lower (figures 1A and 1B) the longer the offspring were exposed to nutritional insult before carrageenan or zymosan challenge.

Previous studies of Landgraf et al. <sup>(18)</sup> show that animals subjects to malnutrition presented lower inflammatory response intensity, supposedly as a consequence of reduction of lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism that culminates in a significant reduction in the leukotriene B-4 (LTB-4) production, which is of considerable importance in the process of leukocyte chemotaxis, after stimulation with tumor necrosis factor- $\alpha$ . Thus, the leukocyte adhesion to the vascular endothelium and edema formation are engaged in adult offspring that was subjected to intra-uterine malnutrition. Furthermore, impairment of the leukocyte-endothelium relationship, especially in the process of paving the acute inflammatory response, occurs due to the reduced expression of endothelial P-selectin and leukocyte L-selectin, along with the significant reduction of ICAM-1<sup>(19)</sup>. It is known that effective leukocyte margination, endothelium aggregation, endothelial transmigration, as well as an effective recruitment of blood leukocytes to the inflammatory site are essential steps to a competent inflammatory response. Important parameters associated with leukocyte migration are related to the availability of circulating leukocytes as well as the regulation of migration these cells from the blood is facilitated by interaction of adhesive molecules with the vascular endothelium. Our data reveal that there were no statistically significant differences in leukocyte counts between nourished and malnourished animals, except for the relative lymphocyte count in rats exposed to the model of acute inflammation with carrageenan. These data don't corroborate with those found in studies of Landgraf et al. <sup>(18)</sup> who observed a reduction in total and differential count of blood leukocytes in young animals (56 and 63 days old) submitted to malnutrition during pregnancy. The difference between their results and the one obtained in our study perhaps may be explained by the difference between the dietary experiences used. In the Control-N animals of both models of acute inflammation and in the malnourished animals treated with zymosan, the relative count of blood leukocytes points to typical picture of acute infection, with neutrophilia and lymphopenia. In contrast, animals in the malnourished group treated with carrageenan showed lymphocytosis, which may be related to the dynamics of inflammatory response of the phlogistic agent front of intrauterine programming and its immunogenic power.

The model of granulomatous reaction induced by cotton pellets has been widely used to evaluate the exudative, transudative and proliferative components of chronic inflammation, and is a typical feature of chronic inflammatory reaction <sup>(20)</sup>. Regarding the subchronic model of inflammation induced by granulomatous lesions, our data reveal that although the weights of the cotton pellets of malnourished animals were lower than those of nourished there were no statistically significant differences in weights of cotton pellets between nourished and

malnourished animals. In malnourished animals, relatively short periods of dietary inadequacy were found in some experiments to inhibit the local inflammatory response in rats. Furthermore, protein may be required locally by the proliferative elements in the area of inflammation <sup>(21)</sup>. Our data reveal that there were no statistically significant differences in leukocyte counts between nourished and malnourished animals, although there was a suggestive delay in the leukocytic response of malnourished animals. Leukocytosis was observed in both group of animals in the model of granulomatous lesion, and was accompanied by neutrophilia and lymphocytosis.

Once it was established that early undernutrition attenuated the acute inflammatory response, we also verify its influence on the therapeutic efficacy of indomethacin, a standard anti-inflammatory, a weak organic acid (2 - {1 - [(4-chlorophenyl) carbonyl ]-5-methoxy-2-methyl-1H-indole-3-yl} acetic acid) and as such, it binds preferentially to albumin (90-99%). It is known that only a fraction of the drug (not protein bound) may cross the endothelium of blood vessels and interact with their pharmacological target. In addition to acute inflammatory response, undernutrition can also affect the pharmacological efficacy of indomethacin. Short-term treatment with indomethacin resulted in a lower significant ( $p < 0.05$ ) reduction in hind paw swelling induced by carrageenan or zymosan of BRDI-g (Figures 2B and 3B) group as compared to the control groups (Figures 2A and 3A), respectively. The inflammatory reaction induced by carrageenan has two phases: the early phase and the late phase. The initial phase lasts 60 minutes and is associated with the release of serotonin, histamine and bradykinin. The late phase occurs about 60 minutes after injection and lasts three hours, with the release of free radicals such as hydrogen peroxide, superoxide, and the release of prostaglandins <sup>(16)</sup>. It is known that indomethacin acts in this model of inflammation in several ways, inhibiting prostaglandin synthesis and infiltration of plasma proteins and neutrophils in the inflammatory site <sup>(22)</sup>. The inhibition of paw edema induced by carrageenan to 180 minutes coincide with the peak of edema, inhibition of COX-2 <sup>(23)</sup> and prostaglandin release. The pharmacological efficacy of indomethacin was statistically significant from 1 h on after injection of carrageenan in both BRD-g and Control-N animals, which lead us to ratify the action of indomethacin on the prostaglandin synthesis in this model of acute inflammation. The inflammatory response in the paw edema induced by zymosan is the result of a cascade of events that include activation of the complement system <sup>(24)</sup>, degranulation of mast cells <sup>(25)</sup> and the generation of metabolites of 5-Lipoxygenase (LTB<sub>4</sub>) and cyclooxygenase <sup>(26)</sup>. LTB<sub>4</sub> is a potent chemotactic agent for neutrophils. Thus, this model of acute inflammation is characterized by the infiltration of the inflammatory cells, such as the early influx of

neutrophils followed by mononuclear cells <sup>(27)</sup>. Indomethacin seems to act on this cell influx, since the polymorphonuclears (PMN) play a central role in vascular events that occur in this inflammation model <sup>(26)</sup>. The model of granulomatous reaction induced by cotton pellets has been widely used to evaluate the exudative, transudative and proliferative components of chronic inflammation, and is a typical feature of chronic inflammatory reaction <sup>(20)</sup>. Granulomatous tissue formed subcutaneously in animals is a mass composed of monocytes / macrophages. In animals treated with indomethacin, the weight of cotton pellets was smaller and lighter hyperemia was observed when compared with the control group. Indomethacin produces an inhibitory effect on granuloma by inhibiting granulocyte infiltration, preventing the formation of collagen fibers and suppressing mucopolysaccharides <sup>(16)</sup>. The percentage of inhibition of edema as a result of treatment with indomethacin in models of acute and subchronic inflammation was higher in nourished group. Some factors may be involved in reducing anti-inflammatory effect of indomethacin in malnourished animals: deficits in the intestinal absorption, resulting from the effect programmer during intrauterine malnutrition, and that it may have contributed to a reduced absorption of indomethacin, which leads to changes in its pharmacokinetics. At the moment, our data do not allow us to point a definitive reason to explain the reduced efficacy of indomethacin on acute and subchronic inflammatory responses of malnourished adult offspring.

In response to acute tissue injury or inflammation, many plasma proteins synthesized by the liver exhibit quantitative changes that become apparent at a variable time after onset of the acute-phase response. Proteins with the transient increase in synthesis and plasma concentration are called positive acute-phase proteins, whereas proteins whose synthesis decrease are referred to as negative acute-phase proteins. In all mammalian species, the regulation of expression of the acute-phase proteins genes is mediated by inflammatory cytokines. That includes mainly interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) <sup>(28)</sup>. C-reactive protein (CRP) and albumin are important blood markers of acute phase of inflammatory response. They play important roles on the modulation rate of protein synthesis of structural, hormonal transport, local modulation of hormonal effects, neutralization of the potentially toxic products of inflammatory response, on the inhibition of microbial invasion, and localization of bacteria<sup>(17)</sup>. Our data reveal that the albumin and C-reactive protein levels were reduced statistically ( $p < 0.05$ ) on the BRD-g group compared to the Control-N in all the animals in the three models of inflammation that were studied. Acute phase proteins are synthesized primarily in the liver through the stimulation of interleukin-6 (IL-6) secreted during the inflammatory events mainly by monocytes and macrophages <sup>(29)</sup>. It

is known that in many mammals which are subjected to intrauterine malnutrition, there is a redistribution of blood flow in the uterus to protect important tissues, especially the brain. This adaptation can lead to important costs for tissues other than the brain, notably the liver and other abdominal viscera<sup>(30)</sup>. Thus, others factors such as a decrease in the IL-6 production provoked by an impaired hepatic function developed during gestation period should not be discarded.

This study provides preliminary evidence that maternal malnutrition during gestation results in attenuated pro-inflammatory cytokine responses to carrageenan or zymosan. Interleukins (IL-1 $\beta$ , IL-6) and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) play key roles in the interaction of the innate and adaptive immune responses allowing for the differentiation and proliferation of lymphocytes as well as production of antibodies by plasma cells<sup>(6)</sup>. Reduced or altered innate responses are supported by human studies that report diminished adaptive and innate immune responses in intrauterine growth retardation offspring<sup>(31)</sup>. According to figures 7 e 8, the TNF- $\alpha$  e IL-6 levels recorded in the model of acute inflammation induced by zymosan were higher than the values found in the model that used carrageenan as phlogistic agent. This can be explained based in the mediators that took part in the development of the paw edema induced by zymosan, especially through the interaction between LTB4 and cytokins. Besides LTB4, cytokines also seem to be important for the genesis of hypernociception during zymosan-induced joint inflammation<sup>(24)</sup>. There is evidence in literature that LTB4 mediates TNF- $\alpha$ -induced neutrophil migration and also that LTB4 stimulates the production of TNF- $\alpha$  from murine macrphage<sup>(32,33)</sup>.

## 6 CONCLUSIONS

Our results allow us to conclude that:

- Early malnutrition attenuated acute inflammatory response;
- Blood levels of the acute-phase proteins (albumin and CRP) are reduced in the adult animals subjected to early malnutrition;
- The leukocyte count (total) was not altered on the animals subjected to early malnutrition;
- The levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 are reduced in the adult animals subjected to early malnutrition;
- The anti-inflammatory effect of indomethacin was less pronounced in the offspring of malnourished animals in models of acute inflammation.

**Acknowledgements**

The present study was supported by the Pos-Graduation Program of Pathology of Federal University of Pernambuco, Brazil. None of the authors had any personal or financial conflict of interest. M.B.S.M. and T.G.S. contributed to the study design, and R.R.B., M.B.S.M., E.S.F. performed the data collection. M.B.S.M., R.R.B. and E.S.F. were involved in the data analysis and the interpretation of results. M.B.S.M., R.R.B. and E.S.F. contributed to the writing of the manuscript.

**REFERENCES**

1. Huang YC. (2001) Malnutrition in the critically ill. *Nutrition* **17**, 745-746.
2. Lucas A. (1991) Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.* **156**, 38-50.
3. Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. (1989) Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* **298**, 564-567.
4. Leme-brasil MR, Collares EF, Verissimo MS, *et al.* (1980) Acute inflammatory responses in rats with protein-calorie malnutrition. *Agents Actions* **10**, 445-450.
5. Landgraf MA, Tostes, RCA, Borelli, P, *et al.* (2007) Mechanisms involved in the reduced leukocyte migration in intrauterine undernourishment. *Nutrition* **23**, 145–156.
6. Desai M, Gayle DA, Casillas E, *et al.* (2009) Early undernutrition attenuates the inflammatory response in adult rat offspring. *J Matern Fetal Neonatal Med.* **22**, 571-575.
7. Deitch EA, Ma WJ, Ma L, *et al.* (1990) Protein malnutrition predisposes to inflammatory-induced gut-origin septic states. Shreveport. *Annals of surgery* **211**, 560-567.
8. Bistrrian B. (2007) Systemic response to inflammation. *Nutr Rev.* **65**, 170-172. Review.
9. Teodósio NR, Lago ES, Romani SA, *et al* (1990). A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* **40**, 533-547.
10. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. (1962) Carrageenan-induced edema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp Bio.l Med.* **111**, 544-547.
11. Gado K, Gigler G. (1991) Zymosan inflammation: a new method suitable for evaluating new anti-inflammatory drugs. *Agents and Actions* **32**, 119-121.
12. Winter CA, Porter CC. (1957) Effect of alterations in side change upon anti-inflammatory and liver glycogen activities of hydrocorticosterone esters. *J. Amer. Pharm. Ass.* **46**, 515-519.
13. Barker DJ (2007) The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* **261**, 412-417.
14. Glouckman PD, Seng CY, Fukuoka H *et al.* (2007) Low birthweight and subsequent obesity in japan. *Lancet* **369**, 1081-1082.

15. Passos MCF, Ramos CF, Moura EG. (2000) Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutrition Research* **20**, 1603-1612.
16. Suleyman H, Demircan B, Karagoz Y *et al.* (2004) Anti-inflammatory effects of selective COX-2 inhibitors. *Pol J Pharmacol* **56**, 775-780.
17. Wan JM, Haw MP, Blackburn GL. (1989) Nutrition, immune function, and inflammation: an overview. Boston. *The Proceedings of the Nutrition* **48**, 315-335.
18. Landgraf MA, Tostes R de C, Borelli P *et al.* (2007) Mechanisms involved in the reduced leukocyte migration in intrauterine undernourishment. *Nutrition* **23**, 145-156.
19. Landgraf MA, Martinez LL, Rastelli VM *et al.* (2005) Intrauterine undernutrition in rats interferes with leukocyte migration, decreasing adhesion molecule expression in leukocytes and endothelial cells. *J Nutr* **135**, 1480-1485.
20. Rampasath VR, Shanti P, Sachdanandam P. (2004) Anti-inflammatory Effect of *Semecarpus anacardium* Linn. Nut Extract in Acute and Chronic Inflammatory conditions. *Biol Pharm Bull* **27**, 2028-2031.
21. Taylor PE, Tejada C, Sanchez M. (1967) The effect of malnutrition on the inflammatory response. *The journal of experimental medicine* **126**, 539-567.
22. Lo TN, Almeida AP, Beaven MA. (1982) Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. *J. Pharm. Exp. Ther.* **221**, 261-267.
23. Seibert K, Zhang Y, Leahy K *et al.* (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 12013-12017.
24. Williams TJ, Jose PJ (1981) Mediation of increased vascular permeability after complement activation. *J Exp Med* **153**, 136-153.
25. Konno S, Tsurufuji S (1985) Analysis of the factor (s) involved in pathogenesis of zymosan-induced inflammation in rats. *Jpn J Pharmacol* **38**, 177-184.
26. Rao TS, Currie JL, Shaffer AF, *et al.* (1994) In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. *J Pharm Exp Therap* **269**, 917-925.
27. Guerrero AT, Verri WA, Cunha TM, *et al.* (2008) Involvement of LTB<sub>4</sub> in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE<sub>2</sub>. *Journal of Leukocyte Biology* **83**, 122-130.
28. Lyoumi S, Tamion F, Petit J *et al.* (1998) Induction and Modulation of Acute-Phase Response by Protein Malnutrition in Rats: Comparative Effect of Systemic and

- Localized Inflammation on Interleukin-6 and Acute-Phase Protein Synthesis. *J Nutr* **128**, 166-174.
29. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paulsen F, *et al.* (1999) Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney int.* **55**, 1899-1911.
  30. Barker DJ (2000) In utero programming of cardiovascular disease. *Thrombosis and Haemostasis* **53**, 555-574.
  31. McDade TW, Beck MA, Kuzawa C *et al.* (2001) Prenatal undernutrition, postnatal environments, and antibody response to vaccination in adolescence. *Am J Clin Nutr* **74**, 543-548.
  32. Canetti C, Silva JS, Ferreira SH *et al.* (2001) Tumor necrosis factor- $\alpha$  and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. *Br J Pharmacol* **134**, 1619-1628.
  33. Talvani A, Machado FS, Santana GC *et al.* (2002) Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. *Infect Immun* **70**, 4247-4253.

## Tables

**Table 1.** Data on Wistar rat offspring of dams nourished (Control-N) and that received a Basic Regional Diet (BRD) during gestation (BRD-g).

Groups	Control-N	BRD-g
<b>Weight of pups (g)</b>		
At Birth	$7.26 \pm 0.64$	$5.38 \pm 0.28^*$
At 22 <sup>th</sup> (weaning)	$53.02 \pm 1.18$	$40.11 \pm 3.21^*$
At 60 <sup>th</sup> day	$259.8 \pm 6.94$	$248.7 \pm 6.86$

Each value is expressed as a mean  $\pm$  SD (n= 10 for each group). \* Significantly different from the control group,  $P < 0.05$

**Table 2.** Average weight of the cotton pellets of male Wistar rats of Control-N and BRD-g groups.

Groups	Weight of cotton pellets (mg)	
	Before implantation	After Implantation
Control-N	$50 \pm 1$	$175.5 \pm 18.0$
BRD-g	$50 \pm 1$	$158.8 \pm 36.5$

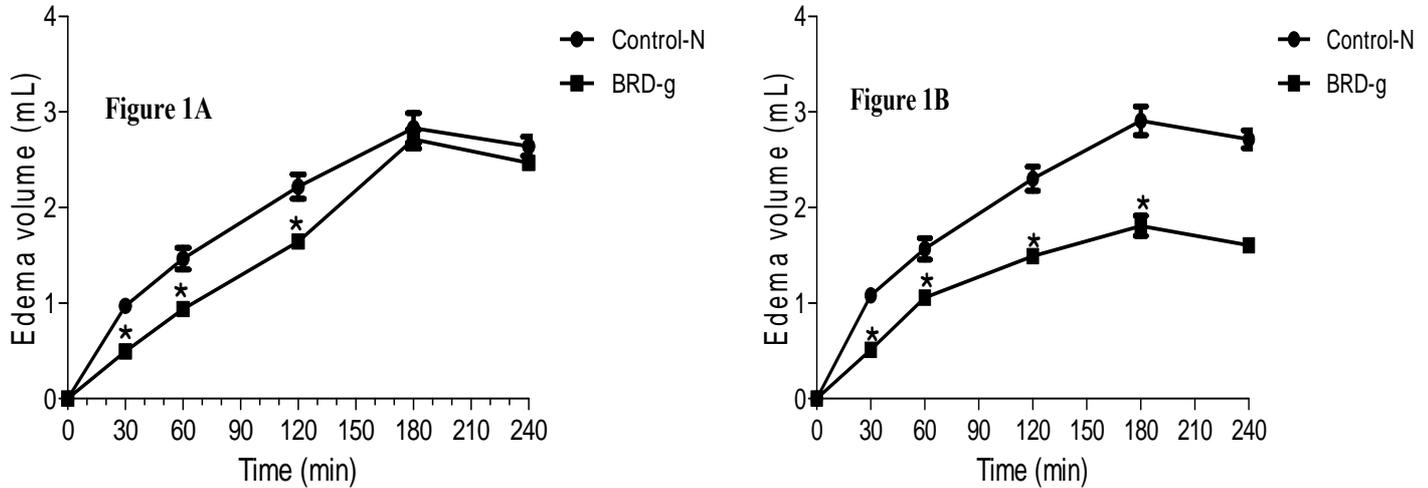
Each value is expressed as a mean  $\pm$  SD (n= 6 for each group).

**Table 3.** Biochemical and hematological parameters of Control-N and malnourished adult male Wistar rat offspring.

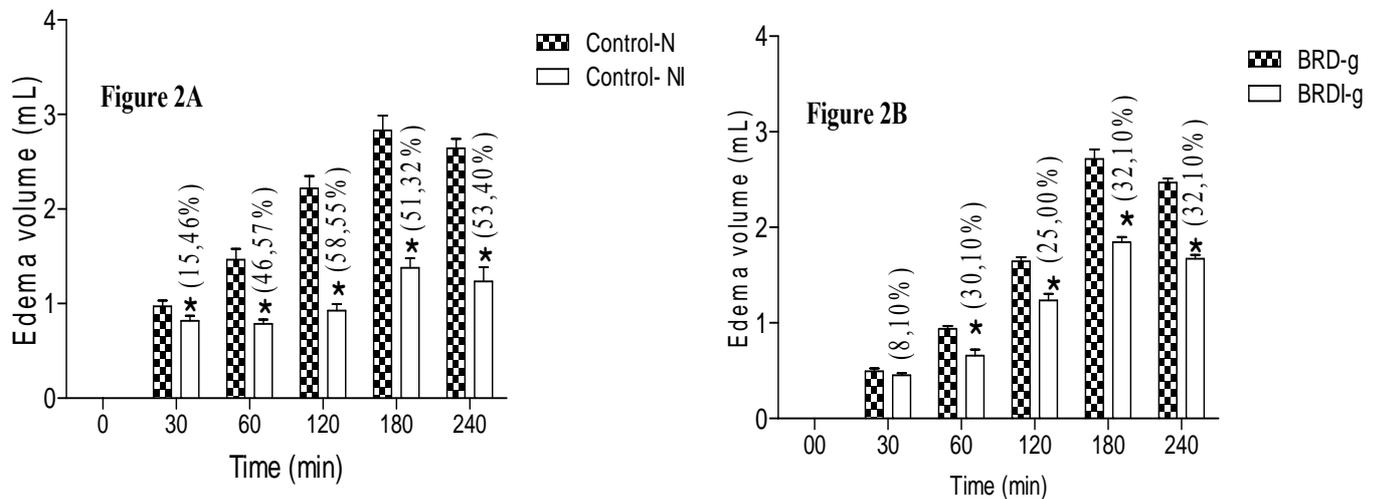
Parâmetros	Control-N Carrageenan	BRD-g Carrageenan	Control-N Zymosan	BRD-g Zymosan	Control-N granuloma	BRD-g granuloma
Albumin (g/dL)	3,45 ± 0.02	3,01 ± 0,11*	3,14 ± 0.09	2,73 ± 0,02*	3,33 ± 0.02	3,01 ± 0,15*
CRP (mg/dL)	7, 2 ± 0.05	6, 1 ± 0.07*	7, 9 ± 0.07	6,2 ± 0.02*	9,4 ± 0.15	6,9 ± 0.08*
Leukocytes (10 <sup>3</sup> mm <sup>3</sup> )	13,22±1,58	12,54±1,21	15,25±1,37	14,95±1,72	21,2±1,33	19,7±1,83
Neutrophil (%)	51,2±9,2	34,8±3,48	49±7,51	50,6±2,8	46,8±3,96	33,75±3,3
Eosinophil (%)	1,4±0,48	1,4±0,8	2±0,70	1,4±0,54	1	1,8±0,98
Basophil (%)	0,4±0,48	1±0,89	0	0	0	0
Lymphocyte (%)	44,6±9,15	59,6±2,41*	46,2±7,91	37±2,12	46,2±7,91	57,6±5,57
Monocyte (%)	3,2±0,74	3,2±1,32	2,8±0,83	3,8±1,78	5,66±1,36	5,88±2,56

Each value is expressed as a mean ± SD (n=6 for each group). \* Significantly different from the control group (Control-N Carrageenan x BRD-g carrageenan, Control-N Zymosan x BRD-g Zymosan and Control-N granuloma x BRD-g granuloma),  $P < 0.05$

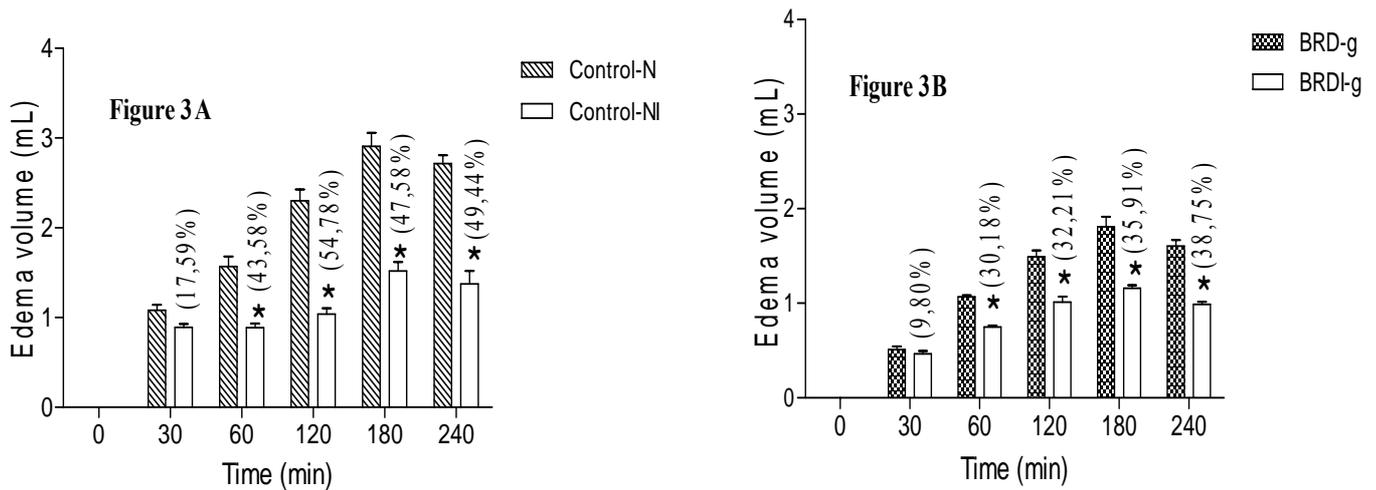
## Figures



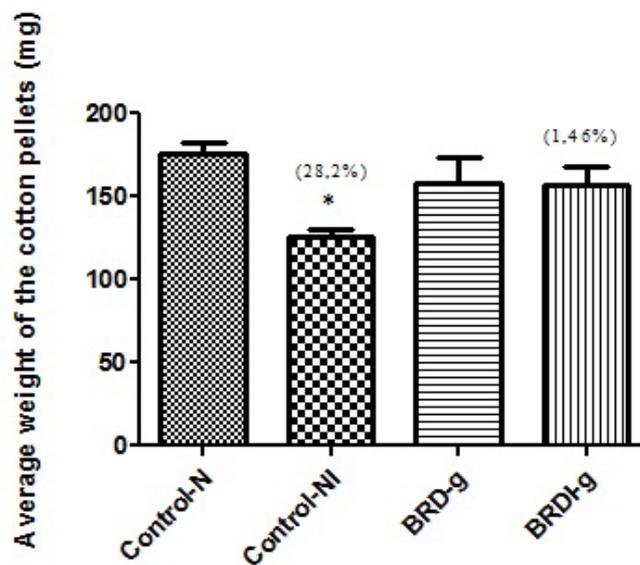
**Figure 1-** Time course of hind paw swelling initially in the experiment and on times 30, 60, 120, 180 and 240 minutes after carrageenan (figure 1A) or zymosan injection (figure 1B) on Control-N and malnourished adult male rat offspring. Each value is expressed as a mean  $\pm$  SD ( $n=6$  for each group). \* Significantly different from the control group,  $P < 0.05$ .



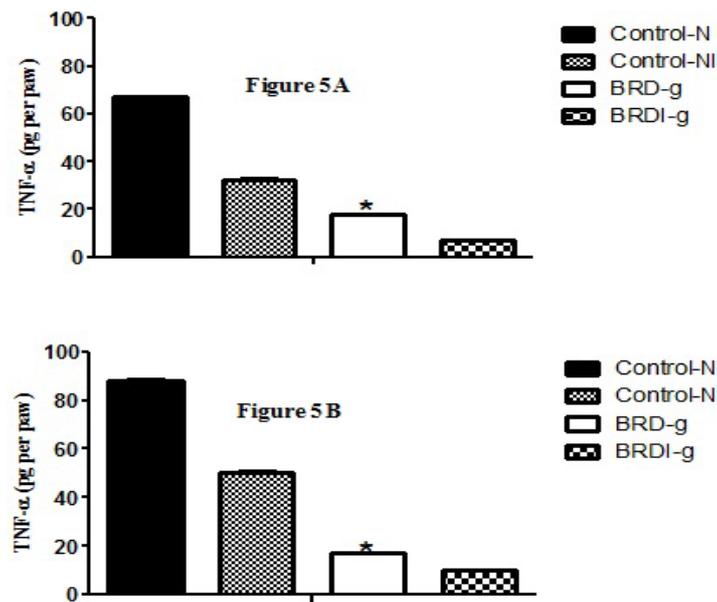
**Figure 2-** Effect of treatment with Indomethacin (10mg/kg) on hind paws edema on control-N (figure 2A) and malnourished (figure 2B) adult male Wistar rat offspring after carrageenan injection. Each value is expressed as a mean  $\pm$  SD ( $n=6$  for each group). \* Significantly different from the control group,  $P < 0.05$ . ( %) Percentage inhibition of edema when compared to control group.



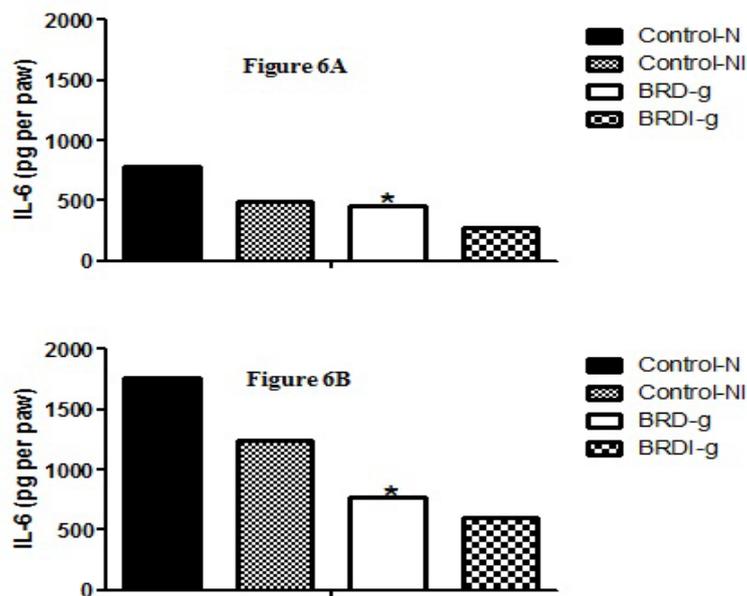
**Figure 3-** Effect of treatment with Indomethacin (10mg/kg) on hind paws edema on control-N (figure 3A) and malnourished (figure 3B) adult male Wistar rat offspring after zymosan injection. Each value is expressed as a mean  $\pm$  SD (n=6 for each group). \* Significantly different from the control group,  $P < 0.05$ . ( % ) Percentage inhibition of edema when compared to control group.



**Figure 4-** Effect of treatment with Indomethacin (2 mg/kg) on the average weight of the cotton “pellets” of adult male Wistar rats in BRD-g and in Control-N groups. Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n = 6 per group). \* Significantly different from the Control group,  $p < 0.05$  (Control-N versus Control- NI, BRD-g versus BRDI-g). ( ) Percentage inhibition of indomethacin.



**Figure 5-** Levels of TNF- $\alpha$  in control and in undernourished adult male Wistar rat offspring after carrageenan (Figure 5A) and zymosan (Figure 5B) injections. Each value is expressed as average  $\pm$  SD ( $n = 6$  per group). \* Significantly different from the Control group,  $p < 0.05$  (Control-N versus BRD-g).



**Figure 6-** Levels of IL-6 in control and undernourished adult male Wistar rat offspring after carrageenan (Figure 6A) and zymosan (Figure 6B) injections. Each value is expressed as average  $\pm$  SD ( $n = 6$  per group). \* Significantly different from the Control group,  $p < 0.05$  (Control-N versus BRD-g).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

### 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos, concluímos que:

- A desnutrição durante a gestação prejudicou o crescimento somático dos animais, verificando-se baixo peso ao nascimento naqueles que receberam dieta multicarenciada DBR;
- A desnutrição precoce atenuou a resposta inflamatória aguda, porém os dados estatísticos não revelaram significância para a influência desta sobre a resposta inflamatória subcrônica induzida por “pellets” de algodão;
- As concentrações séricas de PCR e albumina estão reduzidas em ratos adultos submetidos à desnutrição durante a gestação;
- O número total de leucócitos não foi alterado nos animais submetidos à desnutrição precoce, exceto para a contagem diferenciada de linfócitos em animais submetidos ao modelo de inflamação aguda induzida por carragenina;
- Os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 estão reduzidos em animais submetidos à desnutrição durante a gestação, sugerindo um decréscimo da imunocompetência;
- Em todos os modelos de inflamação utilizados, o efeito anti-inflamatório da indometacina foi menos pronunciado nos ratos machos adultos submetidos à desnutrição durante a gestação.

## REFERÊNCIAS

---

### REFERÊNCIAS

ACUNA, K.; CRUZ, T. Avaliação do estafio nutricional de adultos e idosos e situação nutricional da população brasileira. **Arq. Brás. Endocrinol Metab**, v.48, n.3, p. 345-361, 2004.

AGOURIDAKIS, P. et al. The predictive role of serum and bronchoalveolar lavage cytokines and adhesion molecules for acute respiratory distress syndrome development and outcome. **Respir. Res.**, v. 3, p. 25, 2002.

ALBERTINI, R.; AIMBIRE, F.S.C; CORREA, F.I.; RIBEIRO, W.; COGO, J.C; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, A.S.; DE NUCCI, G.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C; ZÂNGARO, R.A.; LOPES-MARTINS, R.A.B. Effects os different protocol doses of low power galliumamalminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw edema. **J. Photochem. Photobiol. B.**, 74: 101-107, 2004.

AMATLLER, A. M.; ANTEZANA, S. G. Antileucotrienos y asma. **Revista de La Sociedad Boliviana de Pediatría**, v. 46, n. 2, p. 113-117, 2007.

BARKER, D. J. E P. M. CLARK. Fetal undernutrition and disease in later life. **Rev Reprod.**, v.2, n.2, p.105-112. 1997.

BARMAN, S.A. Pulmonary vasoreactivity to serotonin during hypoxia is modulated by ATP-sensitive potassium channels. **Journal of Applied Physiology**, v.83, p.569-574, 1997.

BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. Nutritional transition in Brazil: geographic and temporal trends. **Cad Saude Publica**, n. 19, Suppl 1, p. S181-191, 2003.

BARKER, D.J. In utero programming of chronic disease. **Clin. Sci.**, v.95, n.2, p.115-128, 1998.

BECA, T.; HERNANDEZ, G.; BASCONES, A. AINEs como tratamiento coadyuvante de la enfermedad periodontal. **Avances em periodoncia**, v. 19, n. 2, p.101-113, 2007.

BERGSTROM, J.; LINDHOLM, B. Malnutrition, cardiac disease and mortality: an integrated point of view. **Am. J. Kidney Dis.**, v.32, p.834-841, 1998.

BEUTLER, B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. **J. Invest. Med.**, v.43, p.227-235, 1995.

BHOOLA, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. **Pharmacol. Rev.**, v.44, p.1-80, 1992.

BORREGARD, N.; COWLAND, J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, v.89, p.3503-3521, 1997.

BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. **Mol. Aspects Med.**, v.26, p.3-31, 2005.

BRUUN, L.I.; BOSSAEUS, I.; BERGSTRAD, L.; NYGAARD, K. Prevalence of malnutrition in surgical patients: evaluation of nutritional support and documentation. **Clin. Nutr.**, v.18, p.141-147, 1999.

CAMUSSI, G. et al. The molecular action of tumor necrosis factor- $\alpha$ . **European Journal of Biochemistry**, v. 202, n. 1, p. 3-14, 1991.

CHANDRASSOMA, P.; TAYLOR, C. **Patologia básica**. São Paulo: Prentice Hall do Brasil: p.31-41, 1993.

CHRISTOPHERSON, K.; HROMAS, R. Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. **Stem cells**, v.19, p.388-396, 2001.

CICALA, C.; CIRINO, G. Linkage between inflammation and coagulation: an update on molecular basis of the crosstalk. **Life Sciences**, v.62, p.1817-1824, 1998.

CICOGNA, A.C.; PADOVANI, C.R.; OKOSHI, K.; MATSUBARA, L.S.; ARAGON, F.F.; OKOSHI, M.P. The influence of temporal food restriction on the performance of isolated cardiac muscle. **Nutrition Research**, v.21, p.639-648, 2001.

COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Eds.). **Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 44-78, 2000.

COUPADE, C. et al. Cytokine modulation of liver annexin 1 expression during experimental endotoxemia. **American Journal of Pathology**, v.159, p.1435-1443, 2001.

CUNHA, T.; VERRI, W. TNF-alpha and IL-1beta mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor. **Eur J Pharmacol.**, v. 573, n. 1-3, p. 221-229. 2007.

DEJANA, E.; TOURNIER-LASSERVE, E.; WEINSTEIN, B.M. The Control of Vascular Integrity by Endothelial Cell Junctions: Molecular Basis and Pathological Implications. **Dev. Cell**, v.16, n.17, p.209-221, 2009.

DENNISON, E.; FALL, C.; COOPER, C.; BARKER, D. Prenatal factors influencing long-term outcome. **Horm Res**, v. 48(Suppl 1), p.25-29,1997.

DESAI, M. *et al.* Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. **British Journal of Nutrition**, v.76, p.591-603, 1996.

DESAI, M. *et al.* Permanent reduction in heart and kidney organ growth in offspring of undernourished rats dams. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v.193, p.1224-1232, 2005.

DINARELLO, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v.87, p.2095-2147, 1996.

EL-SAYED, H.L. *et al.* Structural and functional affection of the heart in protein energy malnutrition patients on admission and after nutritional recovery. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.60, p.502-510, 2006.

ERIKSSON, J.G.; FORSEN, T.; TUOMILEHTO, J.; OSMOND, C.; BARKER, D.J. Fetal and childhood growth and hypertension in adult life. **Hypertension**, v.36, p.790-794, 2000.

ESMON, C.T.; TAYLOR JR, F.B.; SNOW, R. Inflammation and coagulation: linked processes potentially regulated through a common pathway mediated by protein C. **Thromb. Hemost.**, v.66, p.160-165, 1991.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P.M. EDHF: an update. **Clin. Sci.**, v.117, p.139-155, 2009.

FOCK, R.A.; VINOLO, M.A.; DE MOURA SÁ ROCHA, V.; DE SÁ ROCHA, L.C.; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-alpha in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. **Cytokine**, v.40, n.2, p.105-114, 2007.

FREED, M.S.; NEEDELMAN, P.; DUNKEL, C.G.; SAFFITZ, J.E.; EVERS, A.S. Role of invading leukocytes in enhanced atrial eicosanoid production following rabbit left ventricular myocardial infarction. **J. Clin. Invest.**, v.83, p.205-212, 1999.

FREITAS, R.A. Inflamação. In: PINTO, L.P.; SOUZA, L.B.; FREITAS, R.A.; FIGUEIREDO, C.R.L.V.; GALVÃO, H.C.; CÂMARA, M.L.A.S.; CARVALHO, R.A. **Patologia Básica: Sinopse**. 1. ed. Natal: Editora da UFRN, 1997. cap. 11, p. 124-154.

GADÓ, K.; GIGLER, G.; Zymosan inflammation: a new method suitable for evaluating new Anti inflammatory drugs. **Agents and Actions**, v. 32, n.1, p. 119-121, 1991.

GALUCCI, R.M.; SIMEONOVA, P.P.; MATHESON, J.M.; KOMMINENI, C.; GURIEL, J.L.; SUGAWARA, T.; LUSTER, M.I. Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. **FASEB.J.**, v.14, p.2525-2531, 2000.

GAMA, E.F.; LIBERTI, E.A.; SOUZA, R.R. Effects of pré and posnatal protein deprivation on atrial natriuretic peptide (ANP) granules of the right auricular cardiocytes. An ultrastructural morphometric study. **European Journal of Nutrition**, v.46, p.245-250, 2007.

GARRISON, J.C. Histamina, bradicinina, 5-hidroxitriptamina e seus antagonistas. In: GILMAN, A.G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 8ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.378-394, 1991.

GERSZTEN, R.E.; GARCIA-ZEPEDA, E.A.; LIM, Y.C.; YOSHIDA, M.; DING, H.A.; GIMBRONE, M.A.JR.; LUSTER, A.D.; LUSCINSKAS, F.W.; ROSENZWEIG, A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium inder flow conditions. **Nature**, v.398, p.718-723, 1999.

GIANINI, N. M.; A. A. VIEIRA; M. E. MOREIRA. Evaluation of the nutritional status at 40 weeks corrected gestational age in a cohort of very low birth weight infants. **J. Pediatr.**, v.81, n.1, p.34-40, 2005.

GODFREY, K.M.; BARKER, D.J.P. Fetal programming and adult health. **Public Health Nutrition**, v.4 (2B), p.611-624, 2001.

GOMES, A. et al. Anti-inflammatory potential of 2-styrylchromones regarding their interference with arachidonic acid metabolic pathways. **Biochemical Pharmacology**, v.78, n. 2, p. 171-177, julho. 2009.

GUEDES, R.C.A. O cérebro desnutrido. **Ciências Hoje**, v.3, n.18, p.61-65, 1985.

GURMINI, J. *et al.* Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.41, n.4, p.271-278, 2005.

HARTEL, C.; VON PUTTKAMER, J.; GALLNER, F.; STRUNK, T.; SCHULTZ, C. Dose-Dependente Immunomodulatory Effects of Acetylcalicylic Acid and Indomethacin

in Human Whole Blood: Potential Role of Cyclooxygenase-2 Inhibition. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.60, p.412-420, 2004.

HEYWORTH, P. G.; CROSS, A. R.; CURNUTTE, J. T. Chronic granulomatous disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 15, n. 5, p. 578-584, 2003.

HOFFMANN, R. Pobreza, insegurança alimentar e desnutrição no Brasil. **Estudos Avançados**, v.9, p.159-172, 1995.

HU, X.W.; LEVY, A.; HART, E.J.; NOLAN, L.A.; DALTON, G.R.; LEVI, A.J. Intra-uterine growth retardation results in increased cardiac arrhythmias and raised diastolic blood pressure in adult rats. **Cardiovascular Research.**, v.48, p.233-243, 2000.

ISSEKUTZ, A.C.; MOVAT, H. Z. The effect of vasodilator prostaglandins on polymorphonuclear leukocyte infiltration and vascular injury. **American Journal of Pathology** , v.107, p.300-309, 1982.

JAAKKOLA, K.; NIKULA, T. et al. In vivo detection of vascular adhesion protein-1 in experimental inflammation. **The American Journal of Pathology**, v. 157, p. 463-471, 2000.

JACOBS, J. W.G.; BIJLSMA, J.W.J. NSAIDs: a critical appraisal. **Netherlands Journal of Medicine**, v.51, p.198-204, 1997.

JEOR, S.T.; HOWARD, B.V.; PREWITT, E.; BOVEE, V.; BAZARRE, T.; ECKEL, R.H. Dietary Protein and Weight Reduction: A Statement for Healthcare Professionals From the Nutrition Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism of the American Heart Association. **American Heart Association. Circulation.**, v.40, p.1869-1874, 2001.

JOHNSON, R. J. et al. New mechanism for glomerular injury. Myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system. **J. Clin. Invest.**, v.79, p.1379-1387, 1987.

KAJITA, T.; HUGLI, T.E. C5a-induced neutrophilia- a primary humoral mechanism for recruitment of neutrophils. **Am. J. Pathol.**, v.137, p.467-477, 1990.

KILGORE, K.S. et al. The complement system in myocardial ischaemia/reperfusion injury. **Cardiovasc. Res.**, v.28, p.437-444, 1994.

KIM, F.J. et al. Reperfused gats elaborates PAF that chemoattracts and primes neutrophils. **J. Surg. Res.**, v.58, p.636-640, 1995.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran: Patologia: bases patológicas das doenças. 7ªed. São Paulo: Elsevier; 2005.

KUMAR, P.; SHEN, Q.; PIVETTI, C.D.; LEE, E.S.; WU, M.H.; YUAN, S.Y. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. **Exp. Rev. Mol. Med.**, v.11, n.19, p.1-20, 2009.

LANDER, H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. **FASEB J.**, v.11, p.118-124, 1997.

LANDGRAF, M.A.; ARTINEZ, L.L.; RASTELLI, V.M.F; FRANCO, M.C.P.; SOTO-SUAZO, M.; TOSTES, R.C.A.; CARVALHO, M.H.A.; NIGRO, D.; FORTES, Z.B. Intrauterine Undernutrition in Rats Interferes with Leukocyte Migration , Decreasing Adhesion Molecule Expression in Leukocytes and Endothelial cells. **The Journal of Nutrition**, v.135, p.1480-1485, 2005.

LANDGRAF, M.A.; TOSTES, R.C.A.; BORELLI, P.; ZORN, T.M.T; NIGRO, D.; CARVALHO, M.H.C.; FORTES, Z.B. Mechanisms involved in the reduced leukocyte migration in intrauterine undernourishment. **Nutrition**,v.23, p.145-156, 2007.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v.2, n.10, p.787-795, 2002.

LEISTIKOW, E.A. Is coronary artery disease initiated perinatally? **Semin. Thromb. Hemost.**, v.24, p.139-143, 1998.

LEMAY, L. G.; VANDER, A. J.; KLUGER, M. J. Role of interleukin 6 in fever in rats. **AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 258, n. 3, p. 798-R803. 1990.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found Symp**, v.156, p.38-50, 1991.

LUCAS, A. Programming by early nutrition: in experimental approach. **Journal of Nutrition**, v.128, p.401S-406S, 1998.

LUM, H.; MALIK, A.B. Regulation of vascular endothelial barrier function. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v.267, p.L223-L241, 1994.

LUSTER, A.D. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N. Engl. J. Med.**, v.338, p.436-445, 1998.

LYOUMI, S.; TAMION, F.; PETIT, J.; DÉCHELOTTE, P.; DAUGUET, C.; SCOTTÉ, M.; HIRON, M.; LEPLINGARD, A.; SALIER, J.P.; DAVEAU, M.; LEBRETON, J.P. Induction and Modulation os Acute-Phase Response by Protein-Malnutrition in Rats: Comparative Effect os Systemic and Localized Inflammation on Interleukin-6 and Acute-Phase Protein Synthesis. **The Journal of Nutrition**, v.128, p.166-174, 1998.

MARÍN, M.C.; TOMÁS, M.E.; SERRES, C.; MERCURI, O. Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. **J. Nutr.**, v.125, p.1017-1024, 1995.

Manejo da desnutrição grave: Um manual para profissionais de saúde de nível superior (médicos, enfermeiros, nutricionistas, e outros) e suas equipes de auxiliares. Organização Mundial da Saúde (OMS); Genebra, 1999.

MCCANCE, R.A. Food, growth and time. **Lancet**, v.2, p.671-676, 1962.

MEUER, S.; ECKER, U.; HADDING, U.; BITTER-SUERMAN, D. Platelet-serotonin release by C3a and C5a: two independent pathways of activation. **J. Immunol.**, v.126, p.1506-1509, 1981.

MICHEL, C. C.; KENDALL, S. Differing effects of histamine and serotonin on microvascular permeability in anaesthetized rats. **J. Physiol.**, v.501, p.657-662, 1997.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **FASEB J.**, v.9, p.1319-1330, 1995.

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

MONTEIRO, F.M.F; LAHLOU, S.; ALBUQUERQUE, J.A.; CABRAL, A.M.S. Influence of a multideficient diet from northeastern Brazil on resting blood pressure and baroreflex sensitivity in conscious, freely moving rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.**, v.34, p.271-280, 2001.

MORGAN, B.P. Physiology and pathophysiology of complement: progress and trends. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v.32, p.265-298, 1995.

MORGANE, P.J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DÍAZ-CINTRA, S. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Review**, v.17, p.91-128, 1993.

MYERS, S.I. et al. Platelet activating factor (PAF) stimulates release of PGI<sub>2</sub> for inflamed rabbit gallbladder cell cultures. **Prostaglandins**, v.50, p.19-31, 1995.

NAKAHATA, N. Thromboxane A<sub>2</sub>: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 118, n. 1, p. 18-35, abril. 2008.

NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make?. **J. Clin. Invest.**, v.100, p.2417-2423, 1997.

OHBA, T. et al. Thrombin in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis mediates proliferation of synovial fibroblast-like cells by induction of platelet derived growth factor. **J. Rheumatol.**, v.23, p.1505-1511, 1996.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS)- Brasil. Informativo. 2000.

OSMOND, C.; BARKER, D.J.P. Feta, Infant and Childhood are Predictors of Coronary Heart Disease, Diabetes and Hypertension in Adult Men and Women. **Environmental Health Perspectives**, v.108, supl.3, p.545-553, 2000.

OZANNE, S. E.; C. N. HALES. Early programming of glucose-insulin metabolism. **Trends Endocrinol Metab**, v.13, n.9, Nov, p.368-73, 2002.

PAIXAO, A.D.; MACIEL, C.R.; TELES, M.B.; FIGUEIREDO-SILVA, J. Regional brazilian diet-induced low birth weight is correlated with changes in renal hemodynamics and glomerular morphometry in adult age. **Biol. Neonate**, v.80, p.239-246, 2001.

PASSOS, M.C.F. *et al.* Comportamento alimentar de ratos adultos submetidos à restrição protéica cujas mães sofreram desnutrição durante a lactação. **Revista de Nutrição**, v.14, p.7-11, 2001.

PESKAR, B.M. Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defence. **Journal of Physiology-Paris**, v.95, p.3-9, 2001.

PORTO, S.M.M.S *et al.* Cinética do perfil leucocitário do sangue, antes e após treinamento físico moderado, em ratos adultos desnutridos no período neonatal. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v.51, n.1, p.59-65, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. "Inflamacao e Antiinflamatorios". In: \_\_\_\_\_ Farmacologia, 6 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. cap. 13-14, p. 211-245.

REAVES, T. A.; CHIN, A. C.; PARKOS, C. A. Neutrophil transepithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, s.1, p. 191-198, 2005.

REID, K.B. et al. Complement component C1 and the collections: parallels between routes of acquired and innate immunity. **Immuol. Today**, v.19, p.56-59, 1998.

RIBBONS, K.A. et al. The effect of inhibitors of inducible nitric oxide synthase on chronic colitis in the rhesus monkey. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.280, p.1008-1115, 1997.

RINALDO, J. E.; CHRISTMAN, J. W. Mechanisms and mediators of the adult respiratory distress syndrome. **Clin. Chest Med.**, v. 11, p. 621-32, 1990.

RIVER-RAMIREZ, O. A.; MENDONZA-MAGANA, M. J. E.; RACETTE, M. Anestesia e anafilaxia. **Revista Mexicana de Anestesiologia**, v. 31, n. 1, p. 37-44, 2008.

ROBBERTS II, L. J.; MORROW, J. D. Anagesic-antypiretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A. G. (Ed.) **Goodman e Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10 ed. New York: McGraw-Hill, 2001, cap. 27, p. 687-731.

RYAN, G.B.; MAJNO, G. Acute Inflammation: A Review. **Am. J. Pathol.**, v.86, n.1, p.183-276, 1977.

SANTOS, N.S.J.; DRAIBE, S.A.; KAMIMURA, M.A.; CUPPARI, L. Serum albumin as nutritional marker of hemodialysis patients. **Revista de Nutrição**, v.17, p. 339-349, 2004.

SPENCER, S.J.; MARTIN, S.; MOUIHATE, A.; PITTMAN, Q.J. Early-life imune challenge: definig a critical window for effects on adult responses to imune challenge. **Neuropsychopharmacology**, v.31, p.1910-1918, 2006.

SATO, M. et al. Synthesis and evaluation of novel fluorinated sulotroban-related sulfonamide derivatives as thromboxane A<sub>2</sub>receptor antagonists. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 5, p. 403-414. 1995.

SATO, M.; SAWAMURA, D.; INA, S.; YAGUCHI, T.; HANADA, K.; HASHIMOTO, I. In vivo introduction of interleukin 6 gene into human keratinocyte: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but, not by the alternatively spliced form. **Arch. Dermatol. Res.**, v.291, p.400-404, 1999.

SAWAYA, A.L. Desnutrição: consequências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. **Estudos Avançados**, v.20, n.58, p.147-158, 2006.

SCRIMSHAW, N.S. The relation between fetal malnutrition and chronic disease in later life. **B.M.J.**, v.315, p.825-826, 1997.

SERHAN, C.N., SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat. Immunol.** v.6, p. 1191-1197, 2005.

SERHAN, C.N. Resolution fase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annu. Rev. Immunol.**, v.25, p. 101-137, 2007.

SERHAN, C.N.; YACOUBIAN, S.; YANG, R. Anti-inflammatory and Proresolvin Lipid Mediators. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v.3, p.279-312, 2008.

SCHMID-SCHONBEIN, G.W. Analysis of inflammation. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v.8, p.93-151, 2006.

SLOAN, N.L.; LEDERMAN, S.A.; LEIGHTON, J.; HIMES, J.H.; RUSH, D. The effect of prenatal dietary protein intake on birth weight. **Nutrition Research**, v.21, p.129-139, 2001.

STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. Acute lung injury: the role of cytokines in the elicitation of neutrophils. **J. Investig. Med.**, v. 42, p. 640-651, 1994.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circ Res.**; 11: 877-887, 2001.

TEODÓSIO, N.R.; LAGO, E.S.; ROMANI, S.A.M.; GUEDES, R.C.A. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.40, p.533-547, 1990.

TOMISATO, W.; TSUTSUMI, S.; HOSHINO, T.; HWANG, H.J.; MIO, M.; TSUCHIYA, T.; MIZUSHIMA, T. Role of direct cytotoxic effect of NSAIDs in the induction of gastric lesions. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 575-585, 2004.

TURNBULL, A.V.; RIVIER, C.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of actions. **Physiol. Rev.**, v. 79, p.1-71, 1999.

VOLIN, M. et al. Fractalkine: A Novel Angiogenic Chemokine in Rheumatoid Arthritis. **Am. J. Path.**, v.159, p.1521-1530, 2001.

WAN, J.M.; HAW, M.P.; BLACKBURN, G.L. Nutrition, immune function, and inflammation: an overview. *The Proceedings of the Nutrition Society*, v. 48, p. 315-335, 1989.

WANNAMACHER, L.E; FERREIRA, M. B. Antiinflamatórios Não-Esteróides. In: FUCHUS, F.D; WANNAMACHER, L. (Ed.). **Farmacologia Clínica Fundamentos da Terapêutica Racional**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 21, p.187-193.

WINTER, C.A.; PORTER, C.C; Effect of alterations in side chain upon anti-inflammatory and liver glycogen activities of hydrocorticosterone esters. **J. Amer. Pharm. Ass.**, v.46, p.515-519, 1957.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W.; Carrageenan-induced edema in hind paw of The rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 111, p.544-547, 1962.

WISEMAN, E.H.; CHANG, Y.H. The role of fibrin in the inflammatory response to carrageenan. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v.159, p.206-209, 1968.

ZHANG, X. W. et al. Redundant function of macrophage inflammatory protein-2 and KC in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced extravasation of neutrophils in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 427, n. 3, p. 277-283, 2001.

ZHANG, C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. **Basic Research in Cardiology**, v. 103, n. 5, p. 398-406, setembro. 2008.

## ANEXOS

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE

## APROVAÇÃO NO COMITÊ DE BIOÉTICA

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

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



Recife, 15 de agosto de 2008

Ofício nº 50/08

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE  
Para: **Profa. Maria Barnadete de Souza Maia**  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – CCB  
Universidade Federal de Pernambuco  
Processo nº 23076. 007027/2008 - 19

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado "*Impacto da desnutrição na intensidade da resposta inflamatória e as implicações sobre o efeito de anti-inflamatórios não esteroides em ratos Wistar*".

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

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

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

Atenciosamente,

*Maria Teresa Jansen*  
Profa. Maria Teresa Jansen  
Presidente do CEEA  
UFPE

Observação:  
Origem dos animais: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia  
Animais: Ratos; Wistar; machos ; com 60 dias de vida  
Número de animais previsto no protocolo: 80 animais

## ANEXO B- NORMAS E INSTRUÇÕES AOS AUTORES DO EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES

---



### EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES

Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS)

#### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

ISSN: 0928-0987

•	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Audience</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
•	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
•	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.4</b>

#### DESCRIPTION

The *European Journal of Pharmaceutical Sciences* is the official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS). The journal publishes research reports, review articles and scientific commentaries on all aspects of the pharmaceutical sciences with strong emphasis on originality and scientific quality. The Editors welcome articles in this multidisciplinary field, ranging from drug discovery, over drug delivery to drug development. More specifically, the Journal publishes reports in medicinal chemistry, pharmacology, drug absorption and metabolism, pharmacokinetics and pharmacodynamics, pharmaceutical and biomedical analysis, drug delivery including gene delivery, drug targeting, pharmaceutical technology, pharmaceutical biotechnology and clinical drug evaluation. Scientific commentaries and review articles are generally by invitation only or by consent of the Editors. Proceedings of scientific meetings may be published as special issues or supplements to the Journal. Manuscripts submitted to the Journal are only accepted on the understanding that (a) they are subject to editorial review (generally by two independent referees); (b) they have not been, and will not be, published in whole or in part in any other journal; (c) the recommendations of the Declarations of Helsinki and Tokyo, for humans, and the European Community guidelines as accepted principles for the use of experimental animals have been adhered to.

#### AUDIENCE

Pharmaceutical and Biopharmaceutical Scientists, Medicinal Chemists, Pharmacologists, Analytical Chemists, Clinical Pharmacologists, Pharmaceutical Engineers

#### IMPACT FACTOR

2010: 3.291 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

BIOSIS  
 Bellstein Database  
 CAB Abstracts  
 Chemical Abstracts  
 Current Contents/Life Sciences  
 EMBASE  
 International Pharmaceutical Abstracts  
 MEDLINE®  
 Natural Products Update/Royal Society of Chemistry  
 S.E.F. Editoriale  
 Science Citation Index  
 Scopus

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief*

**A. Urtti**, Fac. of Pharmacy, Centre for Drug Research, University of Helsinki, P.O. Box 56; Vliikinkaari 5 E, FIN-00014 Helsinki, Finland, **Email:** [ejps-journal@helsinki.fi](mailto:ejps-journal@helsinki.fi)

### *Section Editors*

**S. Auriola**, University of Kuopio, Kuopio, Finland  
**R. Bodmeier**, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany  
**H. Derendorf**, University of Florida, Gainesville, FL, USA  
**K. Järvinen**, University of Kuopio, Kuopio, Finland  
**E. Mastrobattista**, Universiteit Utrecht, Utrecht, Netherlands  
**D. Wang**, Ohio State University, Columbus, OH, USA

### *Editorial Board*

**L.J. Aarons**, University of Manchester, Manchester, UK  
**F. Ahsan**, Texas Tech School of Pharmacy, Amarillo, TX, USA  
**J.M. Aiache**, University of Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France  
**M.J. Alonso**, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain  
**C. Altomare**, Università degli Studi di Bari, Bari, Italy  
**P. Artursson**, Uppsala Universitet, Uppsala, Sweden  
**A. Avdeef**, pION Inc., Woburn, MA, USA  
**M. Bermejo Sanz**, Miguel Hernández University, San Juan de Alicante, Spain  
**O.J. Bjerrum**, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark  
**H.H. Blume**, Oberursel, Germany  
**J.A. Bouwstra**, Leiden/Amsterdam Center for Drug Research (LACDR), Leiden, Netherlands  
**M. Brandl**, University of Southern Denmark, Odense M, Denmark  
**D. Brayden**, University College Dublin, Dublin, Ireland  
**C.M. Caramella**, Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italy  
**M.C. Davies**, University of Nottingham, Nottingham, UK  
**S.C. De Smedt**, Universiteit Gent, Gent, Belgium  
**M. Eichelbaum**, Dr. Margarete Fischer-Bosch Inst., Stuttgart, Germany  
**A. Fahr**, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Germany  
**E. Fattal**, Université Paris-Sud (Paris XI), Châtenay-Malabry, France  
**M. Finel**, University of Helsinki, Helsinki, Finland  
**H. W. Frijlink**, University of Groningen, Groningen, Netherlands  
**G. Golomb**, Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel  
**R.H. Guy**, University of Bath, Bath, UK  
**J. Hirvonen**, University of Helsinki, Helsinki, Finland  
**P. Honkakoski**, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland  
**L. Illum**, IDentity / Cosmas-Damian Ltd., Nottingham, UK  
**G. Imanidis**, Universität Basel, Basel, Switzerland  
**K.-I. Inui**, Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto, Japan  
**H.E. Junginger**, Marburg, Germany  
**M.O. Karlsson**, Uppsala Universitet, Uppsala, Sweden  
**J. Kopecek**, University of Utah, Salt Lake City, UT, USA  
**R. Kostianen**, University of Helsinki, Helsinki, Finland  
**J. Kreuter**, Goethe-Universität Frankfurt, Frankfurt, Germany  
**R.S. Langer**, Massachusetts Institute of Technology (MIT), Cambridge, MA, USA

**V.H.L. Lee**, Chinese University of Hong Kong, Shatin, N.T., Hong Kong  
**C.-M. Lehr**, Helmholtz-Institute for Pharmaceutical Research and Saarland University, Saarbrücken, Germany  
**H. Lennernäs**, Uppsala Universitet, Uppsala, Sweden  
**P. Macheras**, University of Athens, Athens, Greece  
**J.W. McGinity**, University of Texas at Austin, Austin, TX, USA  
**C.R. Middaugh**, University of Kansas, Lawrence, KS, USA  
**S. Mitragotri**, University of California, Santa Barbara, CA, USA  
**C. O'Driscoll**, University College Cork, Cork, Ireland  
**O. Pelkonen**, University of Oulu, Oulu, Finland  
**F. Podczek**, University College London (UCL), London, UK  
**J.E. Polli**, University of Maryland, Baltimore, MD, USA  
**J.P. Remon**, Universiteit Gent, Gent, Belgium  
**J.S. Remy**, Université Louis Pasteur (Strasbourg I), Illkirch, France  
**R.C. Rowe**, University of Bradford, Bradford, West Yorkshire, UK  
**W. Sadée**, Ohio State University, Columbus, OH, USA  
**E.H. Schacht**, Universiteit Gent, Gent, Belgium  
**C. Selch-Larsen**, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark  
**J. Siepmann**, Université Lille Nord de France, Lille, France  
**E. B. Souto**, Fernando Pessoa University, Porto, Portugal  
**S. Spampinato**, Università di Bologna, Bologna, Italy  
**G. Storm**, Universiteit Utrecht, Utrecht, Netherlands  
**Y. Sugiyama**, University of Tokyo, Tokyo, Japan  
**F.C. Szoka**, University of California at San Francisco (UCSF), San Francisco, CA, USA  
**Y. Takakura**, Kyoto University, Kyoto, Japan  
**G.T. Tucker**, University of Sheffield, Sheffield, UK  
**K. Uekama**, Kumamoto University, Kumamoto, Japan  
**K. Ulbrich**, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic  
**H. van de Waterbeemd**, AstraZeneca, Saint Andre, France  
**M.R. Vert**, Université Montpellier, Montpellier, France  
**E. Wagner**, Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU), München, Germany

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

Manuscripts submitted to the journal are accepted on the understanding that: (1) they are subject to editorial review, (2) they have not been and will not be published in whole or in part in any other journal and (3) the recommendations of the Declarations of Helsinki and Tokyo, for humans, and the European Community guidelines as accepted principles for the use of experimental animals, have been adhered to. *The European Journal of Pharmaceutical Sciences* will, therefore, only consider manuscripts that describe experiments which have been carried out under approval of an institutional or local ethics committee.

#### *Types of Paper*

##### *Research articles*

##### *Review articles*

The manuscript of a review article should be arranged as described for research articles (see sections 2.1 - 2.5) but according to the following sections: title page, abstract and keywords (indexing terms, normally 3-6 items), Introduction, Specific sections determined by the author, Conclusions, Acknowledgements, References, Figure legends and Figures, Tables. Sections ranging from the Introduction to the Conclusions should be numbered. Subdivisions within a section should also be numbered within that section: 2.1., 2.2., 2.3. etc. All pages should be numbered consecutively, the title page being p.1.

##### *Commentaries and Mini-reviews*

One page suggestions for comprehensive reviews, commentaries or mini-reviews should be sent to the Editor-in-Chief at [ejps-journal@helsinki.fi](mailto:ejps-journal@helsinki.fi) for consideration. Please see detailed information on commentaries and mini-reviews below.

##### *Commentaries (Guidance)*

The definition of a Commentary for EJPS is three-fold. Firstly, it can be an argued piece of provocative scientific writing purporting to take a balanced position on a controversial pharmaceutical science topic. A second option is for the author to approach the topic from a particular viewpoint on one side of an argument. A third option is to provide a topical update on a hot topic in Pharmaceutical Sciences and this can be more informative than controversial.

Commentaries will be commissioned by the editors in advance or invited from non-commissioned authors if they wish to initially submit a one page summary of the intended Commentary to the editors in advance. All manuscripts will be assessed by 2-3 independent referees.

The journal is looking for a stimulating and provoking essays, with referenced material, but without an extensive reference list. Commentaries can contain one summary figure and/or table and should have no more than 30 references to preferably recent peer-reviewed material. The word count should be approximately 2,000 words maximum.

The commentary should have a short abstract summary of 150 to 200 words and 4-5 key words should be included, The text should be broken down into 4-5 numbered sections beginning with an Introduction and ending with a Conclusions section. A model of the structures is to be found in *Eur. J. Pharm. Sci.* 19, 1-11 by R.D. Combes

##### *Mini-review (Guidance)*

Mini-reviews are thought provoking reviews of contemporary pharmaceutical research. Themes are as described in the Scope of the Journal section.

Mini-reviews will usually be commissioned by the editors in advance, but contributions are invited from non-commissioned authors if they wish to initially submit a one page summary of the intended review to the editors in advance. All manuscripts will be assessed by 2-3 independent referees.

The structure of the mini-review is as follows: a title page followed by a 200-300 word abstract with 4-5 key words. The text is then divided into numbered sections finishing with a Summary section. References should be kept to a maximum of 60 and should be mostly to recent peer-reviewed material. There is a combined maximum of 5 figures / tables. Authors are encouraged to submit their original unpublished work as part of the review if appropriate. The total length of the review should be a maximum of 4,000 words.

#### **Page charges**

This journal has no page charges.

### **BEFORE YOU BEGIN**

#### **Ethics in Publishing**

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

#### **Conflict of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

#### **Submission declaration**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

#### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

#### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

#### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Open access**

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Language and language services**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

### **Patient details**

Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission. For further information see <http://www.elsevier.com/patientphotographs>.

### **Submission**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

### **Referees**

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

### **Additional Information**

**Editorial review:** All manuscripts are generally submitted to 2-3 referees who are chosen for their ability to evaluate the work. Supplementary material may be included to facilitate the review process. Authors may request that certain referees should not be chosen. Members of the editorial board will usually be called upon for advice when there is disagreement among the referees or between referees and authors, or when the editors believe that the manuscript has not received adequate consideration by the referees.

All referees' comments must be responded to, and suggested changes be made. The author should detail the changes made in response to the referees' comments and suggestions in an accompanying letter. If the author disagrees with some changes, the reason, supported by data, should be given. The editors may refuse to publish manuscripts from authors who persistently ignore referees' comments. Handwritten additions or corrections will not be accepted. Only complete retyping of the pages affected

by revision is acceptable. A revised manuscript should be received by the editorial office no later than 2 months after the editorial decision was sent to the author(s); otherwise it will be processed as a new manuscript.

## **PREPARATION**

### *Use of wordprocessing software*

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

### *LaTeX*

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class "elsarticle", or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

The Elsevier "elsarticle" LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

### *Article structure*

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

Text, tables and figures must show minimal overlap, and must be internally consistent.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more, but should be readable on screen at a size of 200 × 500 pixels (at 96 dpi this corresponds to 5 × 13 cm). Bear in mind readability after reduction, especially if using one of the figures from the article itself. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

### Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### Abbreviations

Abbreviations are a hindrance for the reader. Use as few abbreviations as possible and write out names of compounds, receptors, etc., in full throughout the text of the manuscript, with the exceptions given below. Unnecessary and nonsense abbreviations are not allowed. Generic names should not be abbreviated. As an example, AMP, HAL, HIST, RAMH, TAM, SST, for amphetamine, haloperidol, histamine, (R)- $\alpha$ -methylhistamine, tamoxifen, somatostatin, are not accepted. Abbreviations which have come to replace the full term (e.g., GABA, DOPA, PDGF, 5-HT, for  $\gamma$ -aminobutyric acid, 3,4-dihydroxyphenylalanine, PDGF, 5-hydroxytryptamine) may be used, provided the term is spelled out in the abstract and in the body of the manuscript the first time the abbreviation is used. Unwieldy chemical names may be abbreviated. As an example, 8-OH-DPAT, DOI, DTG, BAPTA, for 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)tetralin, 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane, 1,3-di(2-tolyl)-guanidine, 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, are acceptable; however, the full chemical name should be given once in the body of the manuscript and in the abstract, followed in both cases by the abbreviation. Code names may be used, but the full chemical name should be given in the text and in the abstract. *Authors not conforming to these demands may have their manuscripts returned for correction with delayed publication as a result.*

Some abbreviations may be used without definition:

1 ADP, CDP, GDP, IDP 5'-pyrophosphates of adenosine UDP cytidine, guanosine, inosine, uridine AMP etc. adenosine 5'-monophosphate etc. ADP etc. adenosine 5'-diphosphate etc. ATP etc. adenosine 5'-triphosphate etc. CM-cellulose carboxymethylcellulose CoA and acetyl-CoA coenzyme A and its acyl derivatives DEAE-cellulose *O*-(diethylaminoethyl)-cellulose DNA deoxyribonucleic acid EGTA ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)*N,N,N',N'*-tetraacetic acid FAD flavin-adenine dinucleotide FMN flavin mononucleotide GSH, GSSG glutathione, reduced and oxidized Hepes 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulphonic acid NAD nicotinamide-adenine dinucleotide NADP nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate NMN nicotinamide mononucleotide Pi, PPI orthophosphate, pyrophosphate RNA ribonucleic acid Tris 2-amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol

Two alternative conventions are currently in use in some cases. For example, for the phosphoinositides there are both the abbreviations recommended by the IUPAC-IUB and those of the Chilton Convention (e.g., PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> vs. PIP<sub>2</sub> for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate). The journal will accept either of these forms but not their combination.

Abbreviations of units of measurements and other terms are as follows:

*Units of mass*

1 kilogram kg gram g milligram mg microgram  $\mu$ g nanogram ng mole (gram-molecule) mol millimole mmol micromole  $\mu$ mol nanomole nmol picomole pmol femtomole fmol equivalent eq

*Units of time*

1 hour h minute min second s millisecond ms microsecond  $\mu$ s

*Units of volume*

1 litre l millilitre ml microlitre  $\mu$ l

*Units of length*

1 metre m centimetre cm millimetre mm micrometre  $\mu$ m nanometre nm

*Units of concentration*

1 molar (mol/l) M millimolar mM micromolar  $\mu$ M nanomolar nM picomolar pM

*Units of heat, energy, electricity*

1 joule J degree Celsius (centigrade) °C coulomb C ampere A volt V ohm  $\Omega$  siemens S

*Units of radiation*

1 curie Ci counts per minute cpm disintegrations per minute dpm becquerel Bq

*Miscellaneous*

1 gravity *g* dissociation constant *K* d median doses LD<sub>50</sub>, ED<sub>50</sub> probability *P* routes of drug administration i.v., i.p., s.c., i.m. square centimetre cm<sup>2</sup> standard deviation S.D. standard error of the mean S.E.M. Svedberg unit of sedimentation coefficient S Hill coefficient *n* H

The isotope mass number should appear before the atomic symbol, e.g., [3H]noradrenaline, [14C]choline. Ions should be written: Fe<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>. The term absorbance (*A*) is preferred to extinction or optical density. For abbreviations not included in this list consult: *Units, Symbols and Abbreviations, A Guide for Biological and Medical Authors and Editors*, 1994 (The Royal Society of Medicine, London), ISBN 0-905958-78-0, or *Scientific Style and Format. The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, 6th edn. (Cambridge University Press, Cambridge), ISBN 0-521-47154-0.

### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g. lab technicians, statisticians, colleagues providing help preparing the manuscript).

### Nomenclature and Units

Only generic and chemical names of drugs should be used, although a proprietary equivalent may be indicated once, in parentheses. *Pharmacological and Chemical Synonyms*, E.E.J. Marler, 9th edn. (Elsevier, Amsterdam, 1990) may be consulted.

The nomenclature of chemical substances should be consistent, clear and unambiguous, and should conform to the usage of the American Chemical Society and the convention recommended by the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). When in doubt, writers should consult the indexes of *Chemical Abstracts*; the various reports and pamphlets of the American Chemical Society Committee on Nomenclature, Spelling and Pronunciation; and from the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB): *Biochemical Nomenclature and Related Documents* (Portland Press, London).

When drugs, which are mixtures of stereoisomers are used, the fact that they have a composite nature and the implication of this for interpretation of the data and drawing of conclusions should be made clear. The use of the appropriate prefix is essential. Use of the generic name alone without prefix would be taken to refer to agents with no stereoisomers. The nomenclature of the various isomers and isomeric mixtures can be found in: (i) *IUPAC, Nomenclature of Organic Chemistry*, eds. J. Rigaudy and S.P. Klesney (Pergamon Press, London), 1979, p. 481; (ii) *Signs of the times: the need for a stereochemically informative generic name system*, Simonyi, M., J. Gal and B. Testa, 1989, *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 349. For nomenclature of peptides, see *Neuropeptides*, Vol. 1, 1981, p. 231.

The nomenclature of receptors and their subtypes should conform to the *TIPS 1995 Receptor & Ion Channel Nomenclature Supplement (Trends Pharmacol. Sci. Receptor Nomenclature Supplement 1995)*. Copies of this supplement are available from the publisher (Elsevier Trends Journals, Oxford Fulfillment Centre, P.O. Box 800, Kidlington, Oxford OX5 1DX, UK. Tel.: (44-1865) 843-699; Fax: (44-1865) 843-911).

The trivial name of the enzyme may be used in the text, but the systematic name and classification number according to *Enzyme Nomenclature*, rev. edn. (Academic Press, New York, NY, 1984) should be quoted the first time the enzyme is mentioned.

### GenBank accession numbers

Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should reference this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below.) This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

**Example 1:** "GenBank accession nos. **AI631510** , **AI631511** , **AI632198** , and **BF223228** ), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048** ), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117** )".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.**

In the final version of the **printed article**, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

**Example 2:** "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the **electronic copy**, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

**Example 3:** "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

### Formulas and equations

Structural chemical formulas, process flow diagrams and complicated mathematical expressions should be very clearly presented. All subscripts, superscripts, Greek letters and unusual characters must be identified. Structural chemical formulas and process flow diagrams should be prepared in the same way as graphs.

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### Artwork

#### Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

#### Electronic artwork

##### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply "as is".

**Please do not:**

- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

*Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

*Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

**Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

**References**

*Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication". Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

*Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

*References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

*Reference management software*

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

*Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;

3. *Three or more authors*: first author's name followed by "et al." and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown ..."

*List*: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

*Examples*:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr, W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

*Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

### Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

**Ensure that the following items are present:**

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords

- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## AFTER ACCEPTANCE

### *Use of the Digital Object Identifier*

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

### *Proofs*

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### *Offprints*

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. If the corresponding author opts for paper offprints, this preference must be indicated via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Additional paper offprints can also be ordered via this form for an extra charge. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

### *Additional information*

No responsibility is assumed by the Publisher for any injury and/or damage to persons or property as a matter of products liability, negligence or otherwise, or from any use or operation of any methods, products, instructions or ideas contained in the material herein. Because of the rapid advances made in the medical sciences, independent verification of diagnoses and drug doses should be made.

**AUTHOR INQUIRIES**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2010 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

## ANEXO C- CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO ORIGINAL

---

Mensagem de Impressão do Windows Live Hotmail

<http://by152w.bay152.mail.live.com/mail/PrintMessages.aspx?cpid...>

### Submission Confirmation

De: **ees.ejps.0.12a9f8.2d57eaad@eesmail.elsevier.com** em nome de **European Journal of Pharmaceutical Sciences** (ejps-journal@helsinki.fi)

Enviada: sexta-feira, 22 de julho de 2011 22:45:38

Para: rafinha\_barreto@hotmail.com

Dear Mrs Rafaela Rodrigues Barreto,

Your submission entitled "Impact of early malnourishment on the acute and subchronic inflammatory responses and its implications in the effect of indomethacin on Wistar rats" has been received by journal European Journal of Pharmaceutical Sciences

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/ejps/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

European Journal of Pharmaceutical Sciences