

WYLLA TATIANA FERREIRA E SILVA

**PROGRAMAÇÃO PELA DESNUTRIÇÃO PERINATAL DO
CONTROLE SEROTONINÉRGICO DA LIBERAÇÃO DE
ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS ALVEOLARES EM
RATOS ADULTOS**

Recife
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

WYLLA TATIANA FERREIRA E SILVA

**PROGRAMAÇÃO PELA DESNUTRIÇÃO PERINATAL DO
CONTROLE SEROTONINÉRGICO DA LIBERAÇÃO DE
ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS ALVEOLARES EM
RATOS ADULTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Nutrição

Orientador: Prof. Dr. Raul Manhães de Castro

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Recife
2008

Ferreira e Silva, Wylla Tatiana

Programação pela desnutrição perinatal do controle serotoninérgico da liberação do óxido nítrico por macrófagos alveolares em ratos adultos / Wylla Tatiana Ferreira e Silva. – Recife : O Autor, 2008.

134 folhas ; il., fig., graf., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2008.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Desnutrição neonatal - Consequências. I. Título.

613.221

CDU (2.ed.)

UFPE

612.3

CDD (22.ed.)

CCS2008-093

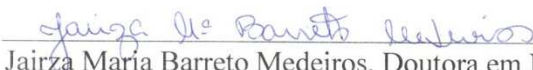
WYLLA TATIANA FERREIRA E SILVA

**PROGRAMAÇÃO PELA DESNUTRIÇÃO PERINATAL DO
CONTROLE SEROTONINÉRGICO DA LIBERAÇÃO DE
ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS ALVEOLARES EM
RATOS ADULTOS**

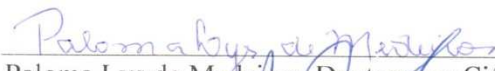
Tese aprovada em 05 de agosto de 2008



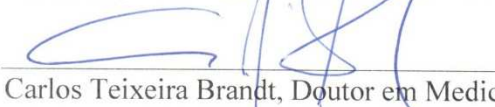
Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa, Doutora em Nutrição, UFPE



Jairza Maria Barreto Medeiros, Doutora em Nutrição, UFBA



Paloma Lys de Medeiros, Doutora em Ciências Biológicas, UFPE



Carlos Teixeira Brandt, Doutor em Medicina, UFPE



Hilton Justino da Silva, Doutor em Nutrição, UFPE

Recife
2008

A Dudu, meu filho.

À Lili, minha mãe.

A Raul e Célia, mestres e amigos.

A Bruno e Mischa, amigos e companheiros.

AGRADECIMENTOS

“E aprendi que se depende sempre, de tanta, muita, diferente gente... E é tão bonito quando a gente sente que nunca está sozinho por mais que pense estar...”¹. Minha profunda gratidão à grande equipe que fez deste trabalho, um grande trabalho!

*Aos **meus orientadores**, Raul Manhães de Castro e Célia de Castro. Eu não consigo prestar uma homenagem à proporção das suas grandezas. A vocês por terem estado comigo.*

*Aos **colegas do grupo de pesquisa Nutrição, Neuropsicofarmacologia e Imunidade (NNI)/UFPE**.*

Ao Programa de Pós-graduação em Nutrição/UFPE, ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa em Pernambuco (FACEPE).

*Aos **professores e funcionários do Departamento de Nutrição (DN) e do Centro Acadêmico de Vitória (CAV)/UFPE**.*

*Aos **alunos** aos quais tenho tido a honra de ensinar, mas, sobretudo, com os quais, de aprender!*

*A Eduardo Ferreira do Couto, **meu filho**. “Não sei se o mundo é bom, mas ele está melhor desde que você chegou e perguntou: tem lugar pra mim? Não sei se o mundo é bom, mas ele está melhor porque você chegou e explicou um mundo pra mim. Não sei se esse mundo está são, mas pro mundo que eu vim já não era; meu mundo não teria razão se não fosse você...”²*

*À **minha mãe**, Lili Ferreira; **minha avó**, Sérvula Carlos; **minhas irmãs**, Liege Karina e Carla Cibelle; **meus sobrinhos**, Thiago Dantas e Matheus da Paixão. Pessoas que eu amo.*

*Aos **meus amigos**, “os mais certos das horas incertas... Naqueles momentos difíceis... Com palavras de força, de fé e de carinho... Com verdades em frases abertas...”³*

*À **aqueles** que, por uma “razão⁴” ou “estação⁴”, de mim se aproximaram com palavras, atitudes ou gestos de amizade.*

*E por tudo, agradeçamos a **Deus!***

¹ Da música “Caminhos do coração” (Gonzaguinha)

² Da música “Espatódea” (Nando Reis)

³ Da música “Amigo” (Roberto Carlos e Erasmo Carlos)

⁴ Do texto “Razão, estação ou vida inteira” (autor desconhecido)

(...)

“Esta parte da minha vida...

Esta pequena parte...

Chama-se FELICIDADE.”⁵

⁵ Do filme “À Procura da Felicidade” (de Gabriele Muccino).

RESUMO

Restrição nutricional no aleitamento tem conseqüências em longo prazo no funcionamento dos sistemas neuro-imunológico. Receptores e transportador serotoninérgicos presentes em macrófagos alveolares (MA) estão relacionados ao seu funcionamento. No artigo “Perinatal malnutrition programs sustainable alterations in nitric oxide production and cell viability in activated macrophages of the adult rat”, efeitos da desnutrição perinatal sobre liberação in vitro de óxido nítrico (LNO) foram analisados em MA nos ratos adultos. Os ratos desnutridos (D) apresentaram retardo do crescimento, confirmado pelo baixo peso ao desmame, persistindo até os 90 dias de vida. Os D também apresentaram menor número de células totais e MA no lavado broncoalveolar. A LNO por MA e a viabilidade dessas células foi menor nos D. No artigo, “Perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide release by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rats”, em adultos, nutridos ou desnutridos na fase perinatal, foi avaliada LNO por MA em resposta a fluoxetina em diferentes concentrações e tempos, e também em resposta aos agonistas de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B}. Na presença de fluoxetina, a LNO por MA dos controles foi menor, uma resposta relacionada à dose, mas não ao tempo. A adição de agonistas não interferiu na produção de NO por MA nos controles. A LNO por MA de D foi menor em todos os tempos analisados. A LNO não foi alterada na presença de fluoxetina ou dos agonistas por MA de D. Em conclusão, manipulação nutricional no período perinatal parece interferir com a programação da função de macrófagos e afeta sua regulação serotoninérgica, repercutindo no organismo adulto.

Descritores: Desnutrição, Programação, Macrófago Alveolar, Óxido Nítrico, Serotonina, Ratos.

ABSTRACT

Restriction on nutritional feeding has long-term consequences on the functioning of neuro-immune systems. Receptors and serotonin transporter present in alveolar macrophages (AM) are related to its operation. In the article "Perinatal malnutrition programs sustainable alterations in nitric oxide production and cell viability in activated macrophages of the adult rat," perinatal effects of malnutrition on *in vitro* release of nitric oxide (RNO) were analyzed in AM in adult rats. The rats malnourished (M) had retarded growth, confirmed by the low weight at weaning, persisting up to 90 days of life. The M also had lower total number of cells and AM in bronchoalveolar lavage. The RNO by AM and viability of these cells was lower in M. In the article, "Perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide release by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rats", in adults, nourished or malnourished in the perinatal phase, was evaluated the RNO by AM in response to fluoxetine in different concentrations and time, and also in response to receptor agonists, 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B}. In the presence of fluoxetine, the RNO control by AM was minor, a response related to dose, but not the time. The addition of agonists did not interfere in the production of NO by AM in control. The RNO by AM-M was lower in all times examined. The RNO has not changed in the presence of fluoxetine or agonists by AM of M. In conclusion, nutritional manipulation in the perinatal period seems to interfere with the programming of the function of macrophages and affects their serotonergic regulation, passed in the adult body.

Keywords: Malnutrition, Programming, Alveolar Macrophage, Nitric Oxide, Serotonin, Rat.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
OBJETIVOS	13
HIPÓTESES	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
“Programming”	15
Sistema Imune em Particular.....	17
Sistemas Fisiológicos de Integração e Defesa.....	23
Desnutrição e Sistema Nervoso.....	29
Desnutrição e Sistema Imune	31
A Serotonina.....	34
Macrófago e Óxido Nítrico	38
3 MÉTODOS	42
Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica	42
Animais e grupos experimentais	44
Lavado broncoalveolar.....	47
Contagem de células totais e de leucócitos diferenciais do lavado broncoalveolar	48
Contagem total e diferencial de leucócitos do sangue	49
Cultura de macrófagos alveolares	50
Cinética da liberação de óxido nítrico por macrófagos alveolares e substâncias serotoninérgicas.....	51
Análise da liberação de óxido nítrico.....	53
Análise da viabilidade celular	54
Análise estatística	55
4 RESULTADOS – ARTIGOS ORIGINAIS	56
Perinatal malnutrition programs sustainable alterations in nitric oxide production and cell viability in activated macrophages of the adult rat.....	57
Perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide release by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rat	88
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	120
REFERÊNCIAS	121
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	132
ANEXO B – DOCUMENTAÇÃO DE ENCAMINHAMENTO DO ARTIGO “PERINATAL MALNUTRITION PROGRAMS SUSTAINABLE ALTERATIONS IN NITRIC OXIDE PRODUCTION AND CELL VIABILITY IN ACTIVATED MACROPHAGES OF THE ADULT RAT” AO PERIÓDICO.....	133
ANEXO C – DOCUMENTAÇÃO DE ENCAMINHAMENTO DO ARTIGO “PERINATAL MALNUTRITION PROGRAMS SUSTAINED ALTERATIONS IN NITRIC OXIDE RELEASE BY ACTIVATED MACROPHAGES IN RESPONSE TO FLUOXETINE IN ADULT RAT” AO PERIÓDICO	134

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Algumas influências ambientais acontecidas precocemente podem ter conseqüências na vida de um organismo. Por exemplo, uma agressão nutricional durante o período perinatal pode afetar padrões morfofuncionais permanentemente em uma variedade de sistemas fisiológicos, inclusive o sistema imune. Em humanos, estudos epidemiológicos revelaram uma associação entre o baixo peso ao nascimento e doenças metabólicas na maioridade. Em ratos, modelos experimentais de restrição nutricional materna são usados para investigar em curto ou em longo prazo as conseqüências de agressões nutricionais no crescimento dos filhotes. Estes efeitos envolveriam um mecanismo chamado “programming” no qual uma agressão ambiental durante períodos críticos de desenvolvimento dos sistemas fisiológicos teria efeitos permanentes na estrutura e função de seus órgãos. Os sistemas fisiológicos de integração, coordenação e defesa do organismo teriam nesse particular uma importância destacada, já que mudanças nas suas constituições repercutiriam diretamente na relação do indivíduo consigo mesmo e com o meio ambiente.

O desenvolvimento comum dos tecidos nervoso, endócrino e imune é um argumento forte sobre a relevância de suas eventuais ações mútuas durante toda a vida do organismo, em especial dos mamíferos. Diversos achados experimentais apontam para a presença importante de interações neuroimunendócrinas anteriores e posteriores ao nascimento.

Avaliando essas possíveis janelas do desenvolvimento, vários estudos demonstraram que a desnutrição perinatal afeta a formação dos sistemas nervoso, endócrino e também do imune, tornando o organismo, quando adulto, vulnerável às infecções; todavia, a base para esta predisposição ainda é um grande objeto de estudo. Os mamíferos apresentam desenvolvimento de componentes morfofuncionais do sistema imune no período perinatal,

alguns destes estão, por exemplo, envolvidos com a ativação de leucócitos e sua migração para o local da infecção. Por exemplo, em ratos e camundongos, mecanismos essenciais da resposta imune estão completamente desenvolvidos somente no primeiro mês de vida. Estes períodos críticos de desenvolvimento do sistema imunológico dos mamíferos sugerem vulnerabilidade aumentada.

Dentre os vários mediadores químicos, aqui procuramos entender, de um modo muito inicial, o papel da serotonina (5-HT) em sua relação específica com a integração do sistema nervoso e imune. O interesse desse tipo de investigação é sobretudo devido à escassez de dados a respeito do tema, o que de certo modo se contradiz com a relevância fisiológica da serotonina no organismo. O papel da 5-HT na morfogênese tem sido bem estudado. A mediação da 5-HT sobre esses eventos celulares de crescimento e desenvolvimento ocorre tanto em tecidos neurais quanto em outros tecidos. A desnutrição durante os períodos pré e pós-natal parece afetar o sistema serotoninérgico. Dados experimentais mostram que a desnutrição promove um curioso aumento nas concentrações de serotonina no sistema nervoso central. Contudo, é importante lembrar que além do sistema nervoso, a 5-HT ainda pode ser encontrada nas plaquetas e em mastócitos. E parece que esta bioamina exerce um papel ainda pouco explorado em macrófagos, nos quais podem ser encontrados alguns de seus receptores, além do sistema de recaptção da 5-HT. Aqui pretendemos graças a estudos envolvendo manipulações farmacológicas de mecanismos serotoninérgicos, analisar a resposta funcional do macrófago (utilizando como modelo a liberação de óxido nítrico), e possíveis repercussões da desnutrição sobre a mesma.

Atuando como reguladores da homeostase ou como células efectoras nos ferimentos, infecções e tumores, os macrófagos são componentes-chave do sistema imunológico. E o trato respiratório, por exemplo, está freqüentemente exposto a organismos e partículas que estão

presentes no ar. Nesse aspecto, intermediando a relação indivíduo meio ambiente, os pulmões defendem o organismo de eventuais efeitos prejudiciais de micropartículas e microrganismos através da fagocitose, que é efetuada pelos macrófagos alveolares. Uma importante maneira de avaliar a função do macrófago é analisar a produção de óxido nítrico (NO).

Em humanos, a desnutrição é a causa não-hereditária principal no mundo de imunodeficiência, e são bem documentados seus efeitos agudo e crônico nas respostas imunológicas. Como tal, o ambiente nutricional nos períodos pré-natais e pós-natais poderia conferir modificações duradouras na resposta imune, predispondo os indivíduos à doença. Assim, o objetivo deste estudo foi examinar as conseqüências da desnutrição perinatal na liberação de NO de macrófagos alveolares no rato adulto. Outrossim, nos interessou saber como a liberação de NO de macrófagos em cultura, provenientes de animais desnutridos ou não em período crítico do desenvolvimento, é influenciada por inibidor seletivo de recaptção da serotonina e agonistas serotoninérgicos. Toda a fundamentação teórica para o que descrevemos até aqui e o que descreveremos adiante será esmiuçada nos capítulos a seguir. Pretendemos, portanto solidificar nossas hipóteses com o que há de mais recente e aprofundado sobre o tema na literatura. Contudo, vale salientar que esta abordagem é original, sobretudo levando-se em conta o paradigma tão recente sobre o papel do “programming” e do eventual papel da serotonina nesse contexto. Há muitos pontos a serem esclarecidos como poderemos inferir.

Objetivos

Geral:

Investigar as conseqüências da desnutrição perinatal pela Dieta Básica Regional (DBR) sobre a programação da liberação de óxido nítrico por macrófagos alveolares e o possível papel do sistema serotoninérgico, em ratos adultos.

Específicos:

Em macrófagos alveolares provenientes de ratos adultos desnutridos ou não durante o aleitamento e recuperados após desmame:

- Analisar as células quanto a quantidade em lavado broncoalveolar;
- Estudar a viabilidade celular em cultura;
- Observar a cinética de liberação de NO em cultura;
- Avaliar a resposta celular *in vitro* à presença de diferentes concentrações de fluoxetina, um inibidor seletivo de recaptção de serotonina;
- Averiguar o efeito de agonistas dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} (buspirona) e 5-HT_{1B} (CP-93,129) associados ou não à fluoxetina sobre a resposta celular *in vitro*.

Hipóteses

A nutrição perinatal programa a função de macrófagos alveolares no rato adulto.

A desnutrição perinatal causa conseqüências tardias na função de macrófago alveolar, em particular, na liberação de NO.

A função do macrófago alveolar na liberação de NO é reduzida pela serotonina.

A programação da regulação serotoninérgica da função do macrófago é afetada pela desnutrição perinatal e não é revertida por recuperação nutricional.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

“Programming”

Evidências epidemiológicas indicaram que a desnutrição no período fetal e na infância predispõe o indivíduo adulto a uma série de doenças, como diabetes mellitus tipo II e hipertensão (Forsdahl, 1977). O mecanismo explicativo, proposto para estas conseqüências, é denominado de programação, assim um estímulo ambiental durante o período crítico de desenvolvimento tem efeito subsequente sobre estruturas e funções de sistemas orgânicos (Lucas *et al.*, 1999).

Há várias décadas tem sido apontada a relação entre a nutrição no período perinatal e a repercussão na vida adulta (Forsdahl, 1977; Delgado *et al.*, 1982; Hales e Barker, 1992; Barker *et al.*, 2002; Hales e Ozanne, 2003). Na década de 60, Widdowson e McCance demonstraram em ratos que as dimensões do corpo no adulto estavam relacionadas ao estado nutricional no período de lactação (Widdowson e McCance, 1963). Dobbing (1968) propuseram também a hipótese dos períodos críticos de desenvolvimento, observando efeitos irreversíveis da desnutrição perinatal sobre, por exemplo, o desenvolvimento do cérebro.

Hales e Barker (1998, 1992) sugeriram o modelo da influência fenotípica para explicar a associação entre agressões nos períodos críticos do desenvolvimento e eventuais repercussões tardias, propondo que o organismo se adapta para sobreviver a um ambiente hostil prévio. Eles inicialmente observaram aspectos relacionados à desnutrição fetal e à incidência de diabetes mellitus tipo II na fase adulta (Hales e Barker, 1992). Naquele estudo, foi sugerido que o organismo se adapta à desnutrição perinatal programando o metabolismo da insulina (Hales e Barker, 1992). E esta adaptação tende a aumentar a aptidão do organismo

para um provável ambiente agressivo ulterior (Barker, 1998)). A constatação dos períodos críticos do desenvolvimento é englobada pela hipótese da influência fenotípica e permite a explicação das eventuais conseqüências tardias (Ozanne e Hales, 1999). A hipótese da influência fenotípica é a sugestão de uma programação epigenética do padrão metabólico do organismo, em decorrência da submissão do indivíduo às modificações nutricionais em períodos vulneráveis do seu desenvolvimento. Assim, a hipótese fenotípica explica a patogênese da síndrome metabólica (SM) que se caracteriza, no homem, pela associação de dislipidemia, diabetes mellitus do tipo II ou intolerância à glicose, hipertensão arterial e excesso de peso ou obesidade. Dentre estas alterações metabólicas, está presente a resistência à insulina (hiperinsulinemia). Na atualidade, a SM é a principal causa das doenças cardiovasculares. Embora poucos dados epidemiológicos existam, o 3º. Censo de Saúde e Nutrição dos Estados Unidos sugere que cerca de 23,7% da população adulta americana é portadora da SM. Assim a abrangência da SM nos induz a refletir e indagar sobre o papel adaptativo dos sistemas fisiológicos de homeostase do organismo diante de fator tão importante; qual seja, a nutrição perinatal. Outrossim, é importante ampliar a extensão do novo paradigma levando-se em conta a solidez da hipótese fenotípica. Dessa forma, o estudo do programming em outros órgãos e sistemas deve ser perseguido.

Os sistemas fisiológicos de integração, coordenação e defesa do organismo teriam nesse particular uma importância destacada, já que mudanças nas suas constituições repercutiriam diretamente na relação do indivíduo consigo mesmo e com o meio ambiente. Aqui, parece-nos de interesse, uma vez que o tema sistema imune é por si só complexo, atribuir um capítulo sucinto sobre suas características em particular.

Sistema Imune em Particular

O sistema imune (SI) é uma organização de células e moléculas com funções especializadas na defesa contra infecções, a resposta imune (RI). Há dois tipos de RI contra os agentes agressores: a RI inata ou natural e a RI adquirida ou adaptativa (Delves e Roitt, 2000a).

A RI inata está naturalmente presente e não é influenciada por contato prévio com os agentes infecciosos. Ela age como a primeira linha de proteção e retarda o estabelecimento de infecções evidentes. Por outro lado, na RI adquirida as reações são específicas e induzidas por contato prévio com os microrganismos ou seus determinantes antigênicos. Ela evita a disseminação da infecção e é capaz de erradicar o microrganismo. Esta resposta forma a base da imunização profilática (vacina) contra doenças contagiosas como sarampo, doenças respiratórias causadas por *Hemophilus influenza* e doenças sistêmicas causadas por *Salmonella* (Chandra, 1991; Abbas e Janeway, 2000; Delves e Roitt, 2000a; b).

A RI inata utiliza células fagocíticas (neutrófilos, monócitos e macrófagos), células que liberam mediadores inflamatórios (basófilos, mastócitos e eosinófilos) e células “*natural killer*”. Os componentes moleculares incluem complemento, proteínas de fase aguda e citocinas, como interferons. A RI adquirida envolve a proliferação de células T e B, quando os receptores de superfície dessas células se ligam aos antígenos. Células especializadas, as nomeadas células apresentadoras de antígenos, apresentam o antígeno aos linfócitos e colaboram com estes na resposta. Células B secretam imunoglobulinas, anticorpos específicos responsáveis pela eliminação de microrganismos extracelulares. Por sua vez, as células T auxiliam as células B a produzir anticorpos e também atuam na erradicação direta dos microrganismos intracelulares através da destruição de células infectadas por vírus, ou

indiretamente, por meio da ativação de macrófagos (Abbas e Janeway, 2000; Delves e Roitt, 2000a; b).

Não existe um local específico para a ocorrência da RI inata. Assim, a infecção por um microrganismo patogênico aciona uma reação aguda, a resposta inflamatória. Esta é caracterizada pelo movimento de células e moléculas do sistema imune ao local atingido. Sobrevém ativação do sistema complemento e conseqüente opsonização do microrganismo. Prostaglandinas, leucotrienos, histamina, serotonina e outros mediadores inflamatórios contribuem para o recrutamento de células, das quais os neutrófilos são as primeiras e mais importantes a atingir o local de infecção (Abbas e Janeway, 2000; Delves e Roitt, 2000b; a).

Por sua vez, a RI adaptativa é gerada nos tecidos linfóides secundários, representados pelos linfonodos, baço e tecido linfóide associado à mucosa. No baço e linfonodos, a ativação dos linfócitos pelo antígeno ocorre nos diferentes compartimentos de células T e B. Uma característica morfológica da região das células B é o folículo secundário, contendo o centro germinativo, onde as respostas de células B são construídas graças a interação com as células dendríticas. O tecido linfóide associado à mucosa defende as superfícies mucosas e inclui as tonsilas, adenóides e placas de Peyer. Conjuntos difusos de células linfóides estão presentes no pulmão e na lâmina própria da parede do intestino (Abbas e Janeway, 2000; Delves e Roitt, 2000b).

Para estabelecer uma infecção, o microrganismo deve primeiro sobrepujar numerosas barreiras da superfície, como enzimas e muco, que, ou são diretamente antimicrobianas, ou agem inibindo a fixação do micróbio. Como nem a superfície queratinizada da pele, nem as cavidades muco-ciliadas do corpo constituem *habitats* ideais para a maior parte dos organismos, os microrganismos devem romper a epiderme. Qualquer organismo que suplante

essa primeira barreira encontra os dois níveis adicionais de defesa, as RI imunes inatas e adquiridas (Abbas e Janeway, 2000; Delves e Roitt, 2000a; b).

No hospedeiro, a RI natural e adaptativa freqüentemente trabalham em consonância para eliminar os microrganismos. E todos os mecanismos de defesa protegem o hospedeiro contra a entrada de microrganismos e o desenvolvimento de infecções clínicas (Chandra, 1991) (Figura 1)

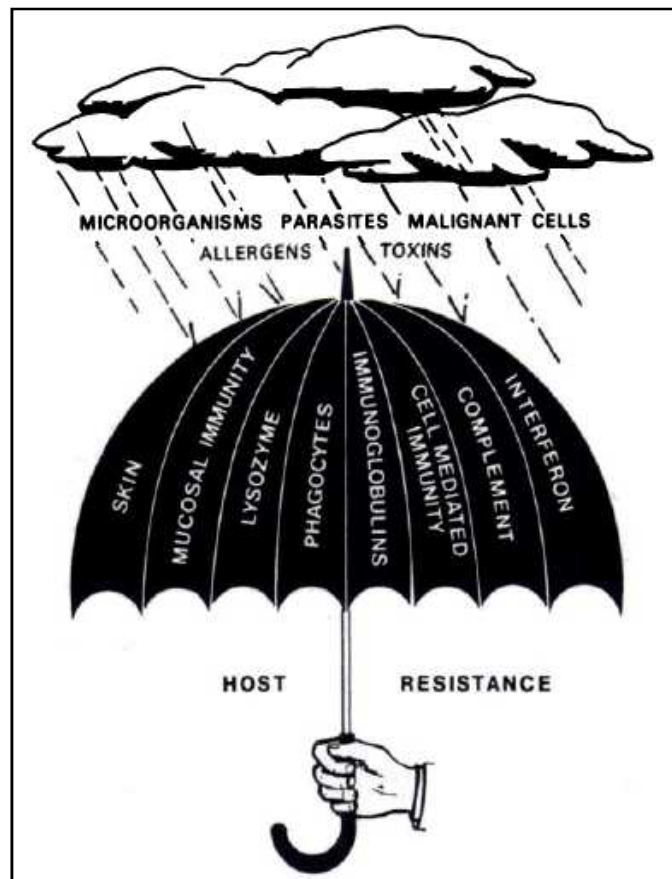


Figura 1. Visão simplificada das defesas do hospedeiro como um guarda-chuva protetor, consistindo de barreiras físicas (pele, membranas mucosas), mecanismos inespecíficos (complemento, interferon, lisozima, fagócitos) e processos antígenos-específicos (anticorpos das cinco classes de imunoglobulinas e imunidade celular). Fonte: Chandra, 1991.

O desenvolvimento do SI começa *in utero* e continua após o nascimento. Constitui um processo dinâmico, envolvendo diferenciação contínua de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes se diferenciando em leucócitos da linhagem mielóide (imunidade inata) e linfóide (imunidade adquirida) (Good, 1995; Landreth, 2002). As células-tronco se expandem e formam um *pool* de células progenitoras altamente proliferativas, capazes de continuar a renovação ininterrupta das células imunocompetentes, as quais apresentam vida curta (Good, 1995; Landreth, 2002). Esta rápida renovação de células imunocompetentes fornece a capacidade celular necessária à resposta RI inata efetiva e a fonte indispensável do repertório imune requerido para a RI adquirida (Good, 1995; Landreth, 2002). Falhas no estabelecimento da capacidade celular inata ou no provimento do *pool* de linfócitos exigidos para uma seleção clonal efetiva resultam em imunodeficiência (Good, 1995; Landreth, 2002).

O estabelecimento das populações das células progenitoras no embrião de mamíferos ocorre numa seqüência temporal pontuada de eventos (Metcalf e Moore, 1971). Estes eventos envolvem a emergência de células hematopoiéticas nos tecidos do embrião em desenvolvimento, a migração dessas células do mesênquima do embrião para o fígado e baço fetal, e, no final da gestação, a tráfego dessas células para a medula óssea e o timo (Metcalf e Moore, 1971). Estes últimos tecidos constituem os únicos microambientes capazes de fornecer os fatores necessários ao desenvolvimento de células imunocompetentes funcionais (Melchers, 1997; Shortman *et al.*, 1998; Landreth, 1993; The, 1993). Assim, parece haver uma série de janelas críticas de vulnerabilidade aos estímulos ambientais durante o desenvolvimento do SI (Dietert *et al.*, 2000). Cada uma delas pode ser de modo particular suscetível às agressões ambientais (Dietert *et al.*, 2000). (Figura 2).

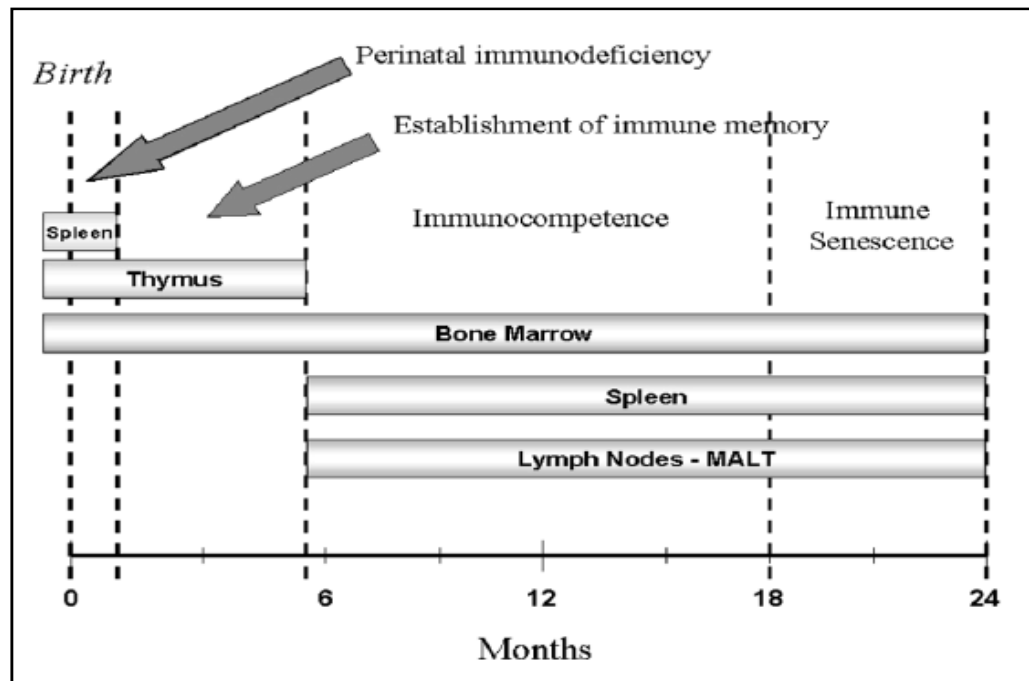


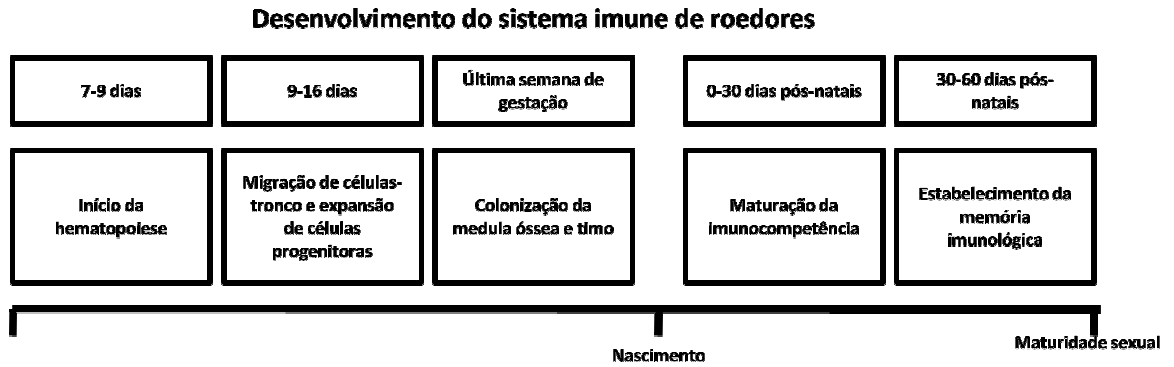
Figura 2. Desenvolvimento pós-natal do sistema imune em roedores. O período de permanência de células hematopoiéticas nos tecidos pós-natais está indicado e compreendido em janelas críticas de vulnerabilidade a influências ambientais. Fonte: Landreth, 2002.

É digno de nota que as janelas críticas de vulnerabilidade durante o desenvolvimento do sistema imune não são restritas à fase intra-uterina (Landreth, 2002). Assim, para que a renovação de células imunocompetentes continue após o nascimento, é indispensável o processo de diferenciação das células-tronco e a expansão das células progenitoras na medula óssea (Landreth, 2002).

É durante o período pós-natal imediato, em mamíferos, que a função imune adquirida se torna pela primeira vez evidente. Contudo um padrão maduro da resposta imune a antígenos é alcançado somente um mês após o nascimento em roedores (Ghia *et al.*, 1998). Durante o primeiro mês de vida pós-natal no rato e até o segundo ano de vida no homem, o sistema imune permanece imaturo, produz uma resposta de anticorpo falha contra antígenos

de carboidratos, e é caracterizado pela resposta imune mediada pela IgM (Ghia *et al.*, 1998).

(Figura 3)



Sistemas Fisiológicos de Integração e Defesa

O sistema imune (SI) e também o sistema nervoso (SN) por muito tempo foram considerados sistemas de regulação autônoma. No entanto, esses dois sistemas interagem mutuamente (Homo-Delarche e Dardenne, 1993). Essas interações podem ser categorizadas entre influências do SN sobre a função do SI e implicações do SI no funcionamento do SN (Homo-Delarche e Dardenne, 1993).

A primeira via pela qual o SN influencia o SI é através do sistema nervoso autônomo (SNA), e mediando esta interação neuroimune estão moléculas de neurotransmissores (NT) (Ader *et al.*, 1995). Para que um NT seja um mediador neuroimune putativo ou comprovado, é necessário que ele preencha alguns critérios (Ader *et al.*, 1995). Esses critérios são: inervação do tecido linfóide por fibras nervosas do NT; liberação do NT e sua disponibilização para células imunes; presença de receptores específicos do NT em células imunes e identificação de papéis imunomoduladores mediados pelo NT (Ader *et al.*, 1995). Constituem exemplos clássicos de NT neuroimune noradrenalina, substância P (Ader *et al.*, 1995), somatostatina e peptídeo intestinal vasoativo (Ader *et al.*, 1990). No caso da serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT), dois dos critérios: a presença de receptores serotoninérgicos em células imunes (Mossner e Lesch, 1998; Cloez-Tayarani e Changeux, 2007) e a identificação de papéis imunomoduladores; a qualificam um NT neuroimune.

Aqui, serão discutidas evidências que confirmam o papel imunomodulador da 5-HT. Os receptores 5-HT presentes em células imunes serão abordados no tópico “**A Serotonina**”.

Há duas vias pelas quais a 5-HT pode exercer seus efeitos imunomoduladores: através da liberação de 5-HT pelo SN e da disponibilização direta de 5-HT para células imunes.

Evidências que corroboram a primeira afirmativa associam-se ao fato de que a 5-HT é armazenada em terminais nervosos noradrenérgicos presentes na musculatura lisa, tanto vascular, como não vascular. O sistema de captação da 5-HT (o 5-HTT) é similar àquele encontrado nas células simpáticas adrenérgicas da medula adrenal (Verhofstad e Jonsson, 1983; Holzwarth e Brownfield, 1985). Dessa forma, os terminais nervosos noradrenérgicos que estão em contato íntimo com linfócitos, nos órgãos linfóides, captam a 5-HT e assim ela será liberada quando as vias noradrenérgicas forem estimuladas (Thoa *et al.*, 1969; Junod, 1972; Verbeuren *et al.*, 1983; Paiva *et al.*, 1984).

Já as evidências a favor de que a 5-HT está diretamente disponível para células imunes, envolvem a presença de um tipo adicional de célula interposta aos nervos periféricos e linfócitos. Esta célula acessória é o mastócito (MAST). Sabe-se que os MAST estão em contato íntimo com fibras nervosas contendo substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, peptídeo intestinal vasoativo e somatostatina (Crivellato *et al.*, 1991; Keith *et al.*, 1995). Os MAST então liberam seus mediadores armazenados quando estimulados por aqueles neuropeptídeos (Crivellato *et al.*, 1991). Um dos mediadores liberados pelos MAST é a 5-HT. Portanto, os MAST rapidamente disponibilizam 5-HT para as células a sua volta, quando na presença, por exemplo, da capsaicina, uma neurotoxina. Por ativação de fibras sensoriais, os neuropeptídeos são então liberados causando desgranulação mastocitária (Germonpre *et al.*, 1995). Além disso, os MAST estão também sob controle direto de nervos periféricos (Marathias *et al.*, 1991; Dimitriadou *et al.*, 1992). Isto também se aplica ao SNC, uma vez que os MAST estão do mesmo modo presentes, embora não em grande quantidade, no cérebro de mamíferos, comumente associados aos vasos sanguíneos (Dropp, 1976; Edvinsson *et al.*, 1977; Ibrahim, 1974). Vale salientar que este mecanismo somente se processa em roedores, já que MAST humanos não contêm 5-HT.

A segunda via pela qual o SN influencia o SI é através do sistema neuroendócrino (SNE), sobremaneira, por meio da glândula pituitária (Ader *et al.*, 1995). Os efeitos imunossupressores dos corticosteróides são bem documentados. Basta mencionar que a suscetibilidade aumentada de ratos Lewis à encefalomielite auto-imune experimental está associada à incapacidade desses animais de produzir corticosterona (Macphee *et al.*, 1989). Outros hormônios da pituitária como a prolactina e o hormônio do crescimento também influenciam a resposta imune. Assim, a liberação de prolactina em resposta ao estresse neutraliza muitos dos efeitos imunossupressores dos corticosteróides (Ader *et al.*, 1995). Ademais, a deficiência de prolactina e de hormônio do crescimento relacionam-se à inibição da resposta imune humoral e celular (Kelley, 1991; Bernton *et al.*, 1991).

Lesões cerebrais, em especial no hipotálamo e sistema límbico, influenciam parâmetros do SI. Nesse caso, curiosamente, algumas respostas são mediadas por alterações neuroendócrinas e não por ação direta das estruturas nervosas, visto que a hipofisectomia dos animais lesionados pode anular os efeitos imunes observados (Devoino *et al.*, 1976; Cross *et al.*, 1982; Al'perina *et al.*, 1985; Ader *et al.*, 1990). Lesões no hipotálamo anterior têm efeitos opostos aos das lesões no hipocampo ou amígdala. Assim, a resposta de células do baço a mitógenos apresenta-se diminuída nas lesões do hipotálamo anterior e aumentada nas daquelas estruturas (Roszman *et al.*, 1985). Para melhor caracterizar o papel dos neurônios serotoninérgicos na influência das funções imunes, foram realizados experimentos utilizando 5-7-diidroxitriptamina (5,7-DHT) (Roszman *et al.*, 1985), que destrói neurônios contendo catecolamina e 5-HT. Como resultado, a injeção de 5,7-DHT produziu supressão *in vivo* da produção de anticorpos anti-hemácia de carneiro. Quando as células catecolaminérgicas foram preservadas, pelo tratamento com dimetilimipramina (DMI), que bloqueia a captação de 5,7-DHT por neurônios catecolaminérgicos, o 5,7-DHT não influenciou aquela resposta. Isto

mostra que os neurônios serotoninérgicos centrais, pelo menos neste aspecto, não apresentam um papel imunomodulador.

Seguindo a linha de comunicação bidirecional entre SN e SI, será abordado a partir de agora como o SI pode influenciar o SN. A influência do SI sobre o SN pode-se estabelecer tanto sobre o SNC, como no sistema nervoso periférico (SNP) e nos dois casos, a 5-HT ocupa um papel relevante. Nesse particular, tanto a 5-HT derivada do SI, como a resposta imune propriamente dita, influenciam o SN.

Pouco se sabe a respeito do papel da 5-HT liberada fora do SNC sobre este sistema. É bem estabelecido, contudo, que pouquíssima quantidade de 5-HT atravessa a barreira hematoencefálica (Roszman *et al.*, 1985), desempenhando assim um papel improvável diretamente sobre o SNC, além daquele realizado sobre as células endoteliais deste sistema. Os linfócitos T estão constantemente circulando através do SNC, realizando a vigilância imunológica (Wekerle *et al.*, 1986). Dessa forma, é possível que eles possam liberar pequenas quantidades de 5-HT no SNC (Wekerle *et al.*, 1986). Por outro lado, grandes quantidades de 5-HT, além de outros mediadores inflamatórios, são liberados no SNC durante respostas imunes. Relatos sobre a contribuição particular da 5-HT sobre a função do SNC, neste contexto, ainda são escassos.

A influência da resposta imune fora do SNC sobre os níveis centrais de 5-HT foi investigada em alguns estudos (Carlson *et al.*, 1987; Gardier *et al.*, 1994; Qiu *et al.*, 1996). Pequenas alterações transitórias nos níveis de 5-HT no hipotálamo e hipocampo foram observadas, contudo não houve consenso entre os relatos. Apenas no núcleo do trato solitário (Carlson *et al.*, 1987) e no tronco encefálico (Qiu *et al.*, 1996) resposta concordantes, representadas por aumento dos níveis de 5-HT, foram observadas. Os níveis representavam conteúdos teciduais de 5-HT. Para esclarecer os resultados encontrados, foi realizada

quantificação dos níveis extracelulares de 5-HT usando um sistema de microdiálise *in vitro*. Nesse sentido, Gardner et al., (1994) determinaram as concentrações extracelulares de 5-HT no córtex frontal de ratos três dias após a imunização com hemácias de carneiros e encontraram um aumento duas vezes maior da liberação de 5-HT. Esta importante descoberta foi suportada por um estudo mostrando que a administração i.p. de LPS aumentou os níveis extracelulares de 5-HT no hipocampo (Linthorst *et al.*, 1996).

No caso de citocinas inflamatórias específicas, há um consenso de que a IL1- β administrada via sistêmica ou intracerebral produz níveis extracelulares aumentados de 5-HT no hipotálamo anterior e no hipocampo (Shintani *et al.*, 1993; Linthorst *et al.*, 1995; Merali *et al.*, 1997). Além disso, IL-1 IL-6 ou GMCSF administrados via i.p. causam aumento do *turnover* da 5-HT em várias regiões cerebrais determinado pela taxa de conversão do ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) à serotonina nos tecidos (Besedovsky e Del Rey, 1996; Bianchi *et al.*, 1997). Ademais, IL-1 administrada i.p. determina níveis elevados de triptofano no cérebro (Dunn, 1988; Kabiersch *et al.*, 1988). Alterações similares foram também observadas após infecção de camundongos com o vírus influenza ou vírus de Newcastle (Dunn *et al.*, 1987; Dunn *et al.*, 1989). Os efeitos de IL-1 parecem ser mediados por ativação do sistema nervoso simpático (Dunn e Welch, 1991).

Em resumo, há inúmeras vias pelas quais o SI pode influenciar o sistema SNC e as evidências indicam que a neurotransmissão serotoninérgica está realmente alterada durante a resposta imune.

Como já mencionado, a 5-HT pode ser acumulada em terminais nervosos noradrenérgicos na musculatura lisa vascular e não vascular. Nos trabalhos de Cohen et al., (1985; 1987) foi mostrado que a captação da 5-HT pode alterar a função desses nervos. A 5-HT liberada pela agregação plaquetária nas artérias coronárias, pode ser armazenada nos

terminais nervosos noradrenérgicos existentes na parede dos vasos. Sob circunstâncias normais, a estimulação desses nervos causa relaxamento β -adrenérgico do músculo liso das coronárias. Contudo em circunstâncias patológicas, quando a 5-HT é armazenada nos nervos, ela é liberada junto à noradrenalina sob estimulação e causa uma constrição via receptores 5-HT₂ no o músculo liso. Assim, a 5-HT liberada deste modo pode inverter a ação dos nervos noradrenérgicos, de vasodilatadora para vasoconstrictora.

Vasos sangüíneos cerebrais também são inervados por fibras serotoninérgicas. que não tem origem no núcleo da rafe (Mathiau *et al.*, 1993; Mathiau *et al.*, 1993), e sim corresponde à captação de 5-HT por fibras simpáticas (Saito e Lee, 1987; Chang *et al.*, 1989; Stanley *et al.*, 1993). Neste caso, MAST vasculares podem constituir um reservatório importante de 5-HT.

Desnutrição e Sistema Nervoso

Atuando sobre o período crítico de crescimento do SN, a deficiência nutricional é capaz de alterar o padrão dos eventos morfogênicos que ocorrem nesta fase, com conseqüências deletérias para o desenvolvimento e a aquisição dos padrões fisiológicos maduros do organismo (Resnick *et al.*, 1979; Noback e Eisenman, 1981). Durante a ontogênese do SN, nos primeiros anos de vida, o processo de crescimento e desenvolvimento ocorre com grande intensidade, o que o torna vulnerável às agressões nutricionais, infecciosas e também farmacológicas. Esse período crítico para o desenvolvimento neural corresponde ao pico de eventos específicos como formação e diferenciação neuronal, sinaptogênese, multiplicação glial, mielinização, migração e diferenciação celular (Dobbing, 1968; Morgane *et al.*, 1978). Assim, as fases que envolvem esses processos são particularmente decisivas para a determinação das características morfofuncionais deste sistema no adulto (Morgane *et al.*, 1978). Nesta fase de rápida proliferação e diferenciação celular, as modificações ambientais, inclusive as nutricionais, podem alterar aspectos relacionados ao desenvolvimento (Morgane *et al.*, 2002; Morgane *et al.*, 1978). É bem estabelecido experimentalmente que a desnutrição provoca alterações estruturais no SN, tais como: redução do número (Leuba e Rabinowicz, 1979a; b)(Rosso *et al.*, 1972) e alterações na forma dos neurônios (Resnick *et al.*, 1979; Picanço-Diniz *et al.*, 1998); atraso no processo de mielinização (Noback e Eisenman, 1981), e diminuição do peso cerebral (Marin *et al.*, 1995). Alterações metabólicas são também referidas; a exemplo, entre outras, a diminuição dos níveis séricos de glicose e corticosterona, e a redução da capacidade funcional da proteína ligante do colesterol (Boxwell *et al.*, 1995).

Há várias evidências em relação a modificações fisiológicas no SN de ratos submetidos à desnutrição pré ou pós-natal, demonstrando, por exemplo, retardo na ontogenia

de reflexos (Smart e Dobbing, 1971), atraso na maturação de características físicas (Nagy *et al.*, 1977; Hisatomi e Niiyama, 1980; Smart e Dobbing, 1971), na evolução de padrões locomotores (Nagy *et al.*, 1977; Lynch, *et al.*, 1975) e alteração dos padrões de propagação do fenômeno da depressão alastrante (Rocha-de-Melo e Guedes, 1997; Guedes *et al.*, 1987). Em humanos, privações nutricionais, dependendo da fase em que ocorrem, de sua duração e severidade, podem levar a graus variados de prejuízos no crescimento corporal (Dobbing, 1985; Ivanovic *et al.*, 1996; Grantham-McGregor *et al.*, 1987) e a deficiências na aquisição de habilidades, entre as quais as de aprendizagem (Brown e Pollitt, 1996; Ivanovic *et al.*, 1996; Grantham-McGregor *et al.*, 1987).

Desnutrição e Sistema Imune

Vários fatores têm sido relacionados à depressão do sistema imunológico, entre eles, a desnutrição (Chandra, 1997). Devido à sua prevalência em todo o mundo, sobretudo em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, a desnutrição é um exemplo de deficiência nutricional que acarreta prejuízo ao desenvolvimento, em especial do SI (Brown e Pollitt, 1996; Monteiro, 1996). Além disso, sabe-se também que a desnutrição predispõe às infecções, particularmente por patógenos intracelulares, porém a base para esta predisposição ainda não está totalmente esclarecida (Skerret *et al.*, 1990). Todavia, é incontestável que os nutrientes têm um importante papel no desenvolvimento e função das células que participam da resposta imunológica (Marcos, 1997; Kawakami *et al.*, 1999). Logo, os prejuízos na imunocompetência podem ser um importante fator causal no aumento da susceptibilidade de indivíduos desnutridos às doenças infecciosas (Lehmann, 1991; Teshima *et al.*, 1992). Assim, um suprimento adequado de nutrientes é imprescindível para a manutenção do crescimento em todos os sistemas orgânicos, assim como para o desenvolvimento dos seus papéis fisiológicos (Morgane *et al.*, 1993).

Ademais, tem aumentado o interesse dos cientistas pelos eventuais efeitos da privação de alimentos sobre a função imune (Allende *et al.*, 1998). Segundo Chandra (Chandra, 1997), na desnutrição, a maioria dos mecanismos de defesa do organismo está prejudicada. Assim, a infecção é a maior causa de mortalidade e morbidade em indivíduos severamente desnutridos (Morgan, 1997). São comuns na desnutrição, os danos à imunidade inespecífica representada pela integridade física das barreiras epitelial e mucosa, os quais permitem o livre acesso de antígenos aos órgãos internos e a circulação, podendo assim aumentar a susceptibilidade às infecções (Chandra, 1997; Morgan, 1997). São estudadas com

particular atenção, as modificações nos subgrupos de linfócitos envolvidos na defesa específica, na indução de genes produtores de citocinas ou na ativação de linfócitos (Allende *et al.*, 1998). Assim, por exemplo, a relação entre os subgrupos de linfócitos CD4+ e CD8+ é menor em indivíduos desnutridos (Chandra, 1999; Leke *et al.*, 1996). Além disso, os estudos revelam nesses indivíduos redução no número de células produtoras de anticorpos e na quantidade destas imunoglobulinas secretadas (Chandra, 1997). (Figura 4)



Figura 4. Na desnutrição energético-protéica grande parte dos mecanismos de defesa do hospedeiro é interrompida, permitindo a invasão de micróbios e a produção de infecção clínica, mais severa e prolongada. Fonte: Chandra, 1991

No Departamento de Nutrição da UFPE, a fim de se estudar os efeitos da desnutrição sobre aspectos fisiológicos têm-se utilizado modelos experimentais de desnutrição. A dieta básica regional (DBR), um modelo dietético baseado na alimentação na década de 60 consumida por determinadas comunidades humanas do nordeste do Brasil, foi desenvolvida pelo DN, baseada em dados de inquéritos nutricionais realizados na Zona da Mata de Pernambuco (ver métodos). Embora a DBR reproduza grande parte das alterações observadas na desnutrição e algumas mudanças no sistema nervoso já tenham sido constatadas, este modelo tem sido pouco empregado no estudo da imunidade ou na relação entre SI e SN.

Há muito a esclarecer sobre a estrutura e o desempenho dos componentes da defesa imune em organismos adultos submetidos à desnutrição perinatal mesmo após recuperação. Ainda está longe de se conhecer as repercussões da desnutrição perinatal, por exemplo, nos indivíduos que escaparam, da desnutrição, nas décadas de 60 e 70, um considerável contingente da população do Nordeste do Brasil. Além da contribuição científica, estes estudos experimentais podem auxiliar no planejamento de estratégias em saúde pública voltadas para aquelas populações acometidas de desnutrição no passado, sem dúvida, esse é um aspecto importante para nosso país.

A Serotonina

A serotonina (5-HT) é uma amina biogênica, similar à epinefrina, norepinefrina, dopamina e histamina. A 5-HT é sintetizada em duas etapas. Na primeira, o aminoácido essencial triptofano é hidroxilado a 5-hidroxitriptofano (5-HTP), pela triptofano hidroxilase (Clark *et al.*, 1954). Na segunda etapa, por ação da triptofano descarboxilase, 5-HTP é descarboxilado para formar 5-HT (Clark *et al.*, 1954). A degradação da 5-HT é mediada pela monoamina oxidase (MAO) (Mc e Page, 1959). Existem duas formas da MAO, MAO-A e MAO-B. A 5-HT é inativada principalmente pela MAO-A (Sandler *et al.*, 1981). Contudo, a metabolização da 5-HT nas plaquetas ocorre predominantemente via MAO-B (Sandler *et al.*, 1981). O produto resultante, o ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA), é excretado na urina (Mc e Page, 1959). Os diversos efeitos da 5-HT são mediados via receptores serotoninérgicos (receptores 5-HT). Até o presente, foram identificados 7 tipos de receptores 5-HT (5-HT₁₋₇), divididos de forma heterogênea em 17 subtipos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, etc.) (Hoyer *et al.*, 1994). Diversos fatores determinam a intensidade e duração da sinalização nos receptores 5-HT. A quantidade de 5-HT é o principal deles. Os mecanismos diretamente envolvidos no controle da disponibilidade de 5-HT são a ligação da 5-HT aos auto-receptores e a atividade do transportador serotoninérgico (5-HTT) (Cerrito e Raiteri, 1979). O *feedback* negativo resultante da estimulação de auto-receptores diminui a liberação da 5-HT (Cerrito e Raiteri, 1979), enquanto o 5-HTT remove a 5-HT do meio (Cerrito e Raiteri, 1979). (Figura 5)

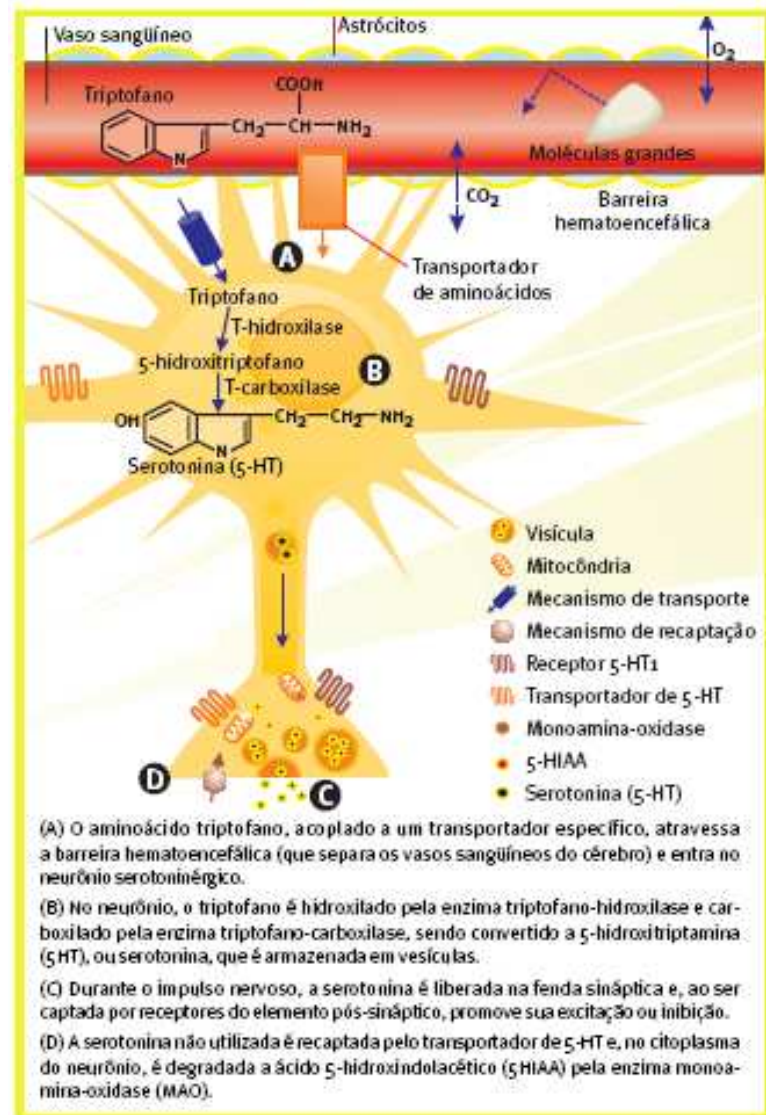


Figura 5. Ciclo da serotonina, desde seu precursor, o aminoácido triptofano, até sua utilização e degradação. Fonte: Nogueira *et al.*, 2004.

Comparado ao imenso corpo de evidências elucidando o papel da 5-HT como um neurotransmissor do SNC, seu papel no SI tem sido pouco estudado. No cérebro, a 5-HT é uma dos neurotransmissores mais amplamente distribuídos. Todas as fibras serotonérgicas se originam, no cérebro, no núcleo da rafe. Através de extensas conexões sinápticas das fibras serotonérgicas, a 5-HT contribui em muitos papéis fisiológicos como controle endócrino,

ritmo circadiano, ingestão alimentar, regulação do sono, comportamento reprodutivo, função motora, cognição, humor, ansiedade (Nogueira *et al.*, 2004).

Fora do SNC, a 5-HT está presente em plaquetas, linfócitos, monócitos, macrófagos, mastócitos, células neuroendócrinas do pulmão, células enterocromafins do intestino e em outros tipos de células (Essmann, 1978b). Há um consenso de que o cérebro e as células enterocromafins são os principais produtores de 5-HT, sendo ela liberada pelas células enterocromafins e captadas e armazenadas em outros tipos de células, predominantemente plaquetas e mastócitos. Assim, as plaquetas e os mastócitos são vistos como as células de estoque móveis e fixas de 5-HT respectivamente (Essmann, 1978b). Vale salientar que, ao contrário do rato, mastócitos do homem não contêm 5-HT (Parrat e West, 1957; Parrat, 1958).

Receptores serotoninérgicos estão distribuídos em células do SI. Foram pela primeira vez demonstrados por Elisieva e Stefanovich em 1982. Igualmente, o sistema de transporte da 5-HT (o 5-HTT) também está presente em leucócitos, tendo sido demonstrado inicialmente em macrófagos por Jackson *et al.* em 1988 e em monócitos por Finocchiaro *et al.*, também no ano de 1988. Grande parte dos receptores serotoninérgicos foi demonstrada por técnicas farmacológicas. Todavia, o receptor 5-HT_{1A} nas células T (Aune *et al.*, 1993), o 5-HT₇ em células B (Mossner e Lesch, 1998) e o 5-HTT nas células B (Lesch *et al.*, 1996) foram demonstrados ao nível do RNAm, por técnicas de PCR e northern blot. (Figura 6)

Alguns efeitos da 5-HT sobre os macrófagos foram estudados. Nesse particular, foi observado que a produção de superóxido e a fagocitose induzida por IFN- γ em macrófagos melhoram na presença de 5-HT (Nannmark *et al.*, 1992). Já os efeitos da 5-HT sobre a expressão de moléculas de classe I e II em macrófagos são inconsistentes, observando-se tanto diminuição, como aumento da expressão (Sternberg *et al.*, 1986; Zhu, 1995). Assim, os estudos acerca do papel da 5-HT sobre funções de macrófagos são ainda precoces.

A desnutrição durante os períodos pré e pós-natal parece afetar o sistema serotoninérgico (Hisatomi e Niiyama, 1980). Dados experimentais mostram que a desnutrição pós-natal promove aumento nas concentrações de 5-HT no sistema nervoso central (SNC) (Sobotka *et al.*, 1974). As repercussões causadas pela desnutrição podem se estender por longos períodos mesmo após a recuperação nutricional (Chen *et al.*, 1995). Uma questão também importante surge: será que essas características modificadas da resposta serotoninérgica observadas no SN também seriam verificadas no sistema imune?

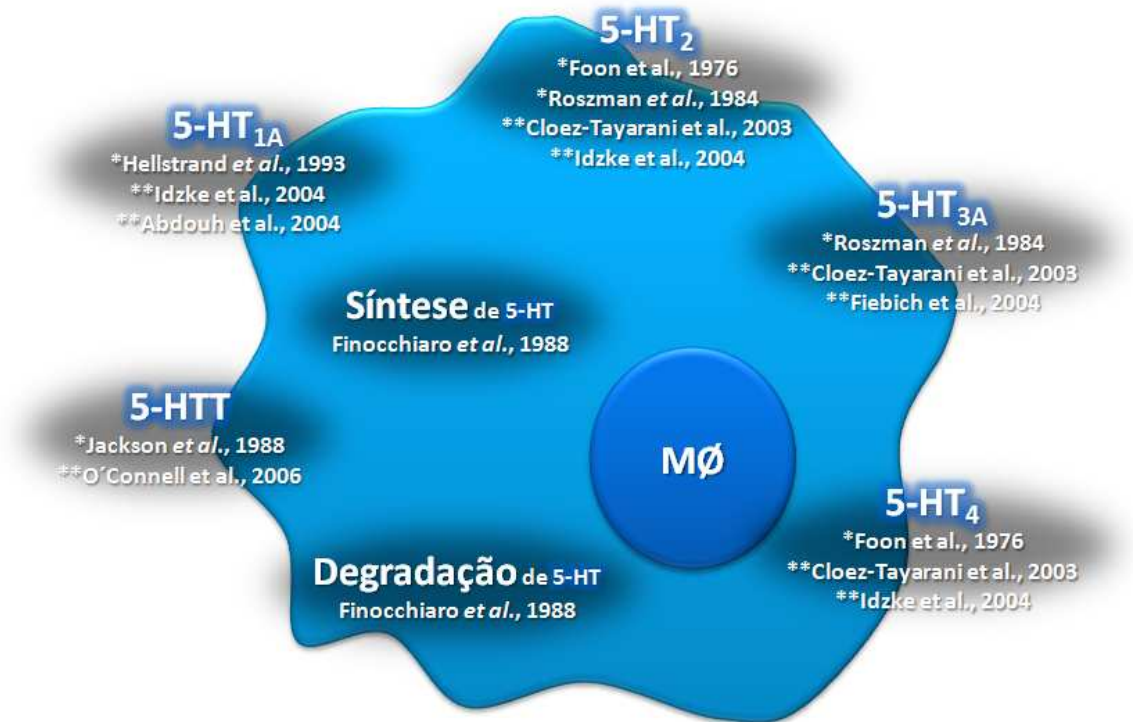


Figura 6. Receptores serotoninérgicos e metabolismo da serotonina no macrófago (Modelo hipotético). Fonte: a autora. *receptor identificado por método farmacológico. **receptor identificado segundo o RNAm.

Macrófago e Óxido Nítrico

É válido ressaltar o papel dos macrófagos (MØ) no SI, como reguladores da homeostase ou como células efetoras nas infecções, tumores e ferimentos (Nathan, 2008). MØ são encontrados em todos os órgãos e tecidos conectivos, locais onde executam um importante papel na defesa do hospedeiro (Nathan, 2008). Populações representativas de MØ estão presentes no fígado, pulmão, baço, rim e cérebro (Nathan, 2008). MØ hepáticos, também conhecidos como células de Kupffer, compreendem 80-90% de todos os macrófagos do corpo (Blouin *et al.*, 1977; Bouwens *et al.*, 1986; Morio *et al.*, 2000). O trato respiratório, freqüentemente exposto a organismos e partículas presentes no ar, defende-se de eventuais efeitos prejudiciais, através de mecanismos microbicidas associados ou não à fagocitose, efetuados por macrófagos alveolares (MA) (Reynolds, 2005).

Na presença de um estímulo estranho, o MØ se torna ativado. Neste estado, pode responder ao estímulo de três maneiras diferentes: fagocitando o elemento estranho, graças a um sistema de enzimas lisossômicas; eliminando-o do fluido intersticial, quando auxiliados pelos linfócitos T ou liberando um amplo espectro de mediadores, incluindo espécies reativas do oxigênio e nitrogênio além de enzimas hidrolíticas, lipídios bioativos e citocinas (Gordon, 2003). Nesse sentido, os MØ produzem grande quantidade de oxidantes, tal como o NO (Bogdan, 2001). O NO é um gás solúvel permeável à membrana. A importância regulatória do NO nas funções biológicas é evidente em numerosos processos fisiológicos (Nathan, 1992).

Os estudos iniciais sobre a participação do óxido nítrico (NO) no sistema imune (SI) situam-se entre 1985 e 1990 (Bogdan, 2001). À luz do conhecimento da associação entre NO e SI à época, seu papel foi assim definido: no SI, o NO é um produto de macrófagos ativados por citocinas e/ou compostos microbianos, derivado do aminoácido L-arginina pela atividade

da enzima NO sintase (NOSi/NOS2) e funciona como uma molécula tumoricida e antimicrobiana *in vivo* e *in vitro* (Nathan, 1992). Hoje já se sabe que além de macrófagos, outras células do SI produzem NO e respondem a ele (Nathan, 1992). Deste modo, a síntese de NO é uma característica de células genuínas do SI (dendríticas, NK, mastócitos, monócitos, macrófagos, micróglia, kupffer, eosinófilos e neutrófilos) bem como de outras células envolvidas nas reações imunológicas (endoteliais, epiteliais, da musculatura vascular, fibroblastos, queratinócitos, condrócitos, hepatócitos, mesangiais e Schwann) (Bogdan *et al.*, 2000). Quanto à ação do NO, embora a definição clássica seja ainda aceita, o NO é responsável por várias funções no SI, salvo seu papel contra tumores e agentes microbianos.

Em geral, o termo NO é usado para todos os intermediários reativos do nitrogênio (IRN⁶): produtos imediatos da reação da NOS ($\bullet\text{NO}$, NO^- , NO^+) ou derivados desses produtos (NO_2 , NO_2^- , NO_3^- , N_2O_3 , N_2O_4 , S-NO, ONOO^- e complexos nitrosil-metais) (Bogdan, 2001). São três as isoformas da NOS (NOS neuronal [NOSn/NOS1]; NOS macrófágica [NOS2]; NOS endotelial [NOSe/NOS3]) e todas catalisam a produção do NO no SI (Bogdan, 2001). Ainda que as isoformas de NOS catalisem a mesma reação (conversão de L-arginina e oxigênio molecular em L-arginina e a seguir em citrulina e NO), elas diferem quanto à regulação, amplitude, duração da produção de NO e à distribuição nas diversas células e tecidos (Macmicking *et al.*, 1997; Macmicking *et al.*, 1997; Stuehr, 1999). Ademais, a atividade da NOS é determinada por vários mecanismos, a maioria controlada por estímulo imunológico (Bogdan, 2001).

A ação do NO não se limita ao local onde ele é produzido. Como um gás neutro, o radical $\bullet\text{NO}$ se difunde rapidamente (Bogdan, 2001). Assim, S-nitrosotíols de baixo peso

⁶ IRN: $\bullet\text{NO}$ (radical NO), NO^- (oxinitrito), NO^+ (nitrozônio), NO_2 (dióxido de nitrogênio), NO_2^- (nitrito), NO_3^- (nitrato), N_2O_3 (trióxido de nitrogênio), N_2O_4 (tetróxido de nitrogênio), S-NO (S-nitrosotíol), ONOO^- (peroxinitrito) e complexos nitrosil-metais

molecular (p. ex., S-nitrosoglutathione), proteínas S-nitrosiladas e complexos metais-nitrosil funcionam como veículo de NO de longo alcance (Gaston; Stamler, 1999), liberando a molécula espontaneamente ou após clivagem enzimática nos linfócitos T e B (Henson *et al.*, 1999). No plasma, peroxidase, citocromo P450 e ânion superóxido (O_2^-) oxidam L-arginina à citrulina e NO (Wu e Morris, 1998). NO_2^- , um produto estável da reação da NOS, é reduzido a $\bullet NO$ em meio ácido, além de ser um substrato da peroxidase de neutrófilos e eosinófilos para a síntese de NO^- em locais distantes (Eiserich *et al.*, 1998; Macpherson *et al.*, 2001). Portanto, células imunes, mesmo que não apresentem a NOS, podem produzir NO, além de se tornar alvo da ação dele. Outrossim, o NO não age via receptor definido. Deste modo, O NO reage com outras moléculas inorgânicas (oxigênio, O_2^- , metais de transição); estruturas no DNA (bases pirimídicas); grupos prostéticos (heme); e proteínas (levando a S-nitrosilação de grupos tiols, nitração de resíduos de tirosina ou ruptura de metal-sulfeto, domínios de zinco ou complexo de ferro-sulfeto) (Marshall *et al.*, 2000).

Um dos aspectos que contribui para tornar o NO tão relevante é a imensa variedade de papéis a que está relacionado. Assim, o NO participa de processos essenciais à sobrevivência do organismo, como a regulação da pressão arterial, o desenvolvimento do SNC, os mecanismo de aprendizagem e memória e finalmente da ativação da resposta imune (Lancaster, 1992). O NO produzido por $M\emptyset$ é altamente tóxico para as células infectadas e os agentes patogênicos. Ele ingressa nas células e inativa as proteínas que são importantes para a produção de energia, transdução de sinais e síntese dos ácidos nucleicos, provocando a morte celular (Lancaster, 1992). Em roedores foi verificado que a deficiência no gene NOS2 os torna altamente suscetíveis à infecção em comparação a seus homólogos normais (Macmicking *et al.*, 1997).

Alguns estudos relacionaram a desnutrição à produção de NO por macrófagos (Hill *et al.*, 1995; Redmond *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1999; Anstead *et al.*, 2001). No entanto, ainda não foram investigadas repercussões tardias da desnutrição no início da vida, sobre esse aspecto. De fato, estudos sobre alterações imunológicas em longo prazo, precedidas de agressões nutricionais em período vulnerável da vida são quase inexistentes. Um raro exemplo é o estudo de Prestes-Carneiro *et al.* (2006) mostrando que a desnutrição protéica nos primeiros doze dias de lactação induz efeitos duradouros sobre a função fagocítica de macrófago em ratos adultos.

MÉTODOS

3 MÉTODOS

Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica

Todos os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica (LENIB) do DN/UFPE. O LENIB foi inaugurado no dia 11 de dezembro de 2006. A idéia para a criação do LENIB surgiu em 2002, quando uma comissão do curso de Engenharia Biomédica, visando criar parcerias interdisciplinares possíveis de originar projetos internacionais de pesquisa, ensino e extensão, se interessou por pesquisa desenvolvida em Nutrição. A pesquisa era na temática da Desnutrição e objeto do trabalho de dissertação da então mestranda Karla Mônica Ferraz Teixeira de Barros, orientado pelo Dr. Raul Manhães de Castro. A conjunção de interesses originou acordo entre a UFPE e a Universidade de Tecnologia de Compiègne (UTC), na França e culminou finalmente na construção do LENIB. Os primeiros contatos entre os pesquisadores responsáveis no Brasil e na França foram realizados com a aprovação do projeto de cooperação internacional Capes/Cofecub em 2003. A partir da implementação do convênio internacional houve: 1- Incentivo ao intercâmbio entre os Departamentos da UFPE, particularmente Nutrição, Fisioterapia, Fisiologia, Física e Engenharia Biomédica, trazendo maiores recursos técnicos para auxílio à pesquisa; 2- Missões de trabalho de professores da UFPE e da UTC, favorecendo trocas de informação e experiência; 3- Intercâmbio de estudantes de pós-graduação, tendo sido enviados quatro doutorandos brasileiros para estágio em co-tutela na UTC; 4- Cooperação na elaboração de projetos de pesquisa, com aprovação destes pelo CNPq; 5- Contratos de professor visitante e de pesquisador integrado ao programa de Engenharia Biomédica e IEL. Atualmente, o LENIB é composto por: -biotério com ciclo de luz invertido, para estudos em atividade física; -laboratório multiusuário, com potencial para

pesquisas na área de cultura de células e Imunologia (onde foi realizado todo o trabalho experimental da presente tese); -um laboratório de biomecânica muscular, com interesse sobre o desenvolvimento da atividade locomotora (Figura 7).



Figura 7. Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica. De cima para baixo e da esquerda para a direita: placa de inauguração, biotério de ciclo invertido, laboratório de biomecânica (esquerda e direita), laboratório multiusuário (sala de procedimentos gerais e sala de cultura de células e tecidos). Fonte: Grupo de Pesquisa Nutrição, Neuropsicofarmacologia e Imunidade (NNI), DN, UFPE.

Animais e grupos experimentais

Foram utilizados ratos machos Wistar da Colônia de Criação do DN/UFPE. Os animais foram mantidos à temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes das 06 às 18 h). Após acasalamento e confirmação da gestação através da observação do aumento do ventre, as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais de polipropileno com livre acesso à água e à dieta contendo 23% de proteína (ração comercial: LABINA, Agribands do Brasil, Tabela 1). Após o nascimento, os neonatos foram aleatoriamente distribuídos, constituindo ninhadas de seis filhotes por mãe. Os grupos experimentais foram baseados na dieta ofertada às mães durante a lactação. Mães de animais do grupo controle (C) foram alimentadas com dieta a 23% de proteína, enquanto aquelas de animais do grupo desnutrido (D) foram alimentadas com “dieta básica regional” (DBR), a partir do dia do nascimento dos seus filhotes. A DBR consiste de gêneros alimentícios que constituíam as refeições básicas de algumas comunidades rurais no Nordeste do Brasil (zona da mata, Estado de Pernambuco) durante os anos 1960. Alimentando-se animais com DBR, é reproduzido um tipo de desnutrição similar àquele visto em pessoas daquela região, identificado por “sinais” clínicos e medidas murinométricas nos animais, bem como por alguns parâmetros bioquímicos (Teodosio *et al.*, 1990) (Figura 8). Os constituintes da DBR são apresentados na Tabela 2. Esta dieta tem um baixo nível de proteína (8%) e é também deficiente em vitaminas e em alguns minerais (Teodosio *et al.*, 1990) e representa os principais déficits nutricionais ainda presentes na maioria das pessoas vivendo no Nordeste do Brasil.

O peso corporal dos animais foi registrado diariamente durante a fase de lactação e a cada 10 dias entre os 30 e 90 dias pós-natais (P30 a P90), usando uma balança MARTE AS 1000, com capacidade de 1000 g e sensibilidade de 0,01g. (Figura 8)

Após o período de lactação, todos os animais receberam dieta a 23% de proteína. Aos 90 dias pós-natais (P90) (Figura 8), a cinética da liberação de óxido nítrico (LON) foi mensurada no sobrenadante de macrófagos alveolares cultivados com inibidor seletivo de recaptção da serotonina e estimulados com lipopolissacarídeo. O efeito de agonistas serotoninérgicos sobre a LON em MA também foi avaliado. Ao final do estudo, todos os animais foram eutanasiados por uma dose letal de anestésico (solução de cloralose a 0,5% e uretana a 12,5%; Sigma-Aldrich, SP, Brasil). Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA/UFPE), e seguiram as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (ANEXO A).

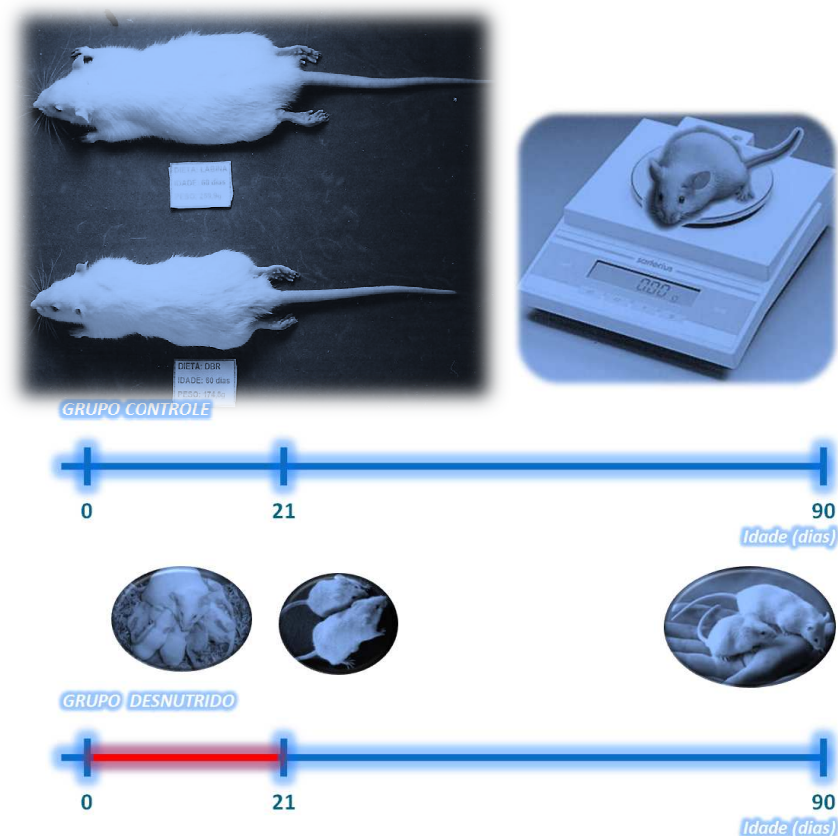


Figura 8. Ratos aos 90 dias (os animais foram amamentados por mãe alimentada com Labina (acima, animal controle) e por mãe alimentada com DBR (abaixo, animal desnutrido) (imagem superior esquerda). Procedimento de pesagem corporal (imagem superior direita) esquema de linha da vida dos animais (do nascimento aos 21 dias, os animais receberam leite de mães alimentadas com DBR (no grupo desnutrido). Os animais controles receberam Labina durante toda a vida. Fonte: Queirós-Santos, 2000 (foto superior esquerda).

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

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

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

b: segundo a Agribrands do Brasil

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

Tabela 2. Composição centesimal da Dieta Básica Regional (DBR) segundo Teodósio *et al.*, (1990). A DBR é deficiente em vitaminas hidro e lipossolúveis.

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

a: cozido em água e desidratado

Lavado broncoalveolar

O lavado broncoalveolar (LBA) foi realizado de acordo com a técnica descrita em De Castro *et al.* (2000). Os animais aos P90 foram anestesiados com uma solução de cloralose e uretana (0,5% e 12,5% respectivamente) (Sigma-Aldrich, SP Brasil), via injeção intraperitoneal, na proporção de 10 ml/Kg de peso corporal. O LBA foi realizado pela injeção de NaCl a 0,9% à temperatura ambiente através de uma seringa conectada a uma cânula plástica inserida na traquéia. Várias alíquotas de 3 mL foram injetadas e coletadas em um tubo tipo falcon estéril. Foram recuperados aproximadamente 30 mL de LBA por animal. (Figura 9)

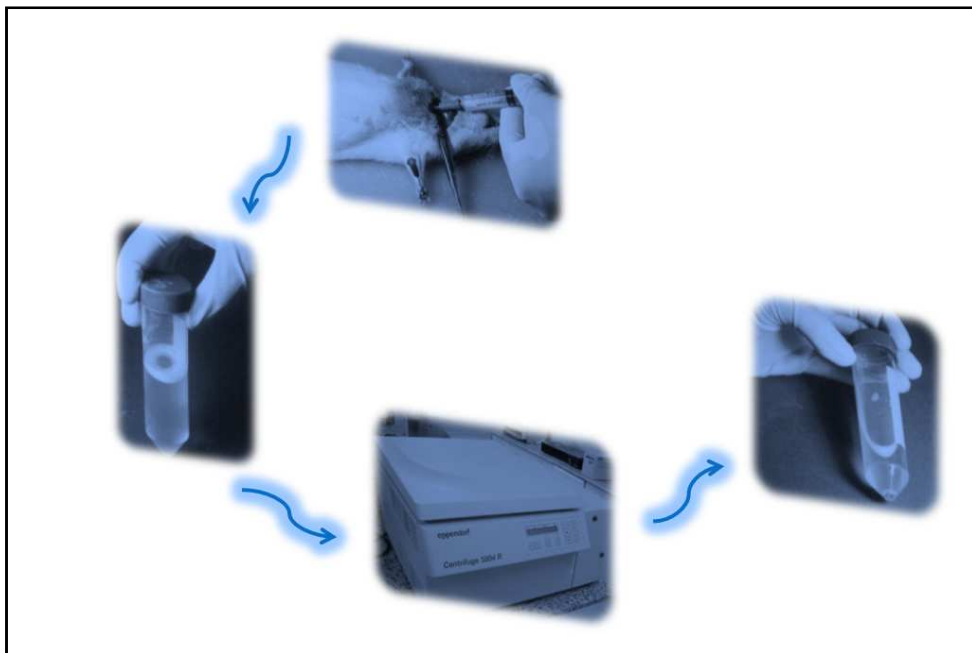


Figura 9. Otenção do lavado broncoalveolar. Fonte: Queirós-Santos, 2000.

Contagem de células totais e de leucócitos diferenciais do lavado broncoalveolar

A contagem de células totais do LBA foi realizada em uma câmara de Neubauer ao microscópio de luz (Olympus optical BX41TF, Japão Co Ltda.). As amostras foram diluídas a 1:20 em ácido acético glacial a 3% e azul de metileno. (Figura 10)

Para contagem de leucócitos diferenciais do LBA, amostras diluídas em NaCl a 0,9% foram citocentrifugadas (Cytopro 7620, Alemmar Comercial e Industrial SA, São Paulo, Brasil) diretamente em lâminas citológicas. As preparações foram fixadas, coradas (Kit Panótico Rápido LB – Laborclin Ltda., Brasil), e examinadas ao microscópio de luz (Olympus optical BX41TF, Japão Co Ltda.) com lente de imersão. Os diferentes tipos de glóbulos brancos foram quantificados em um contador eletrônico de células sanguíneas (Kacil, mod. CC502). (Figura 10)

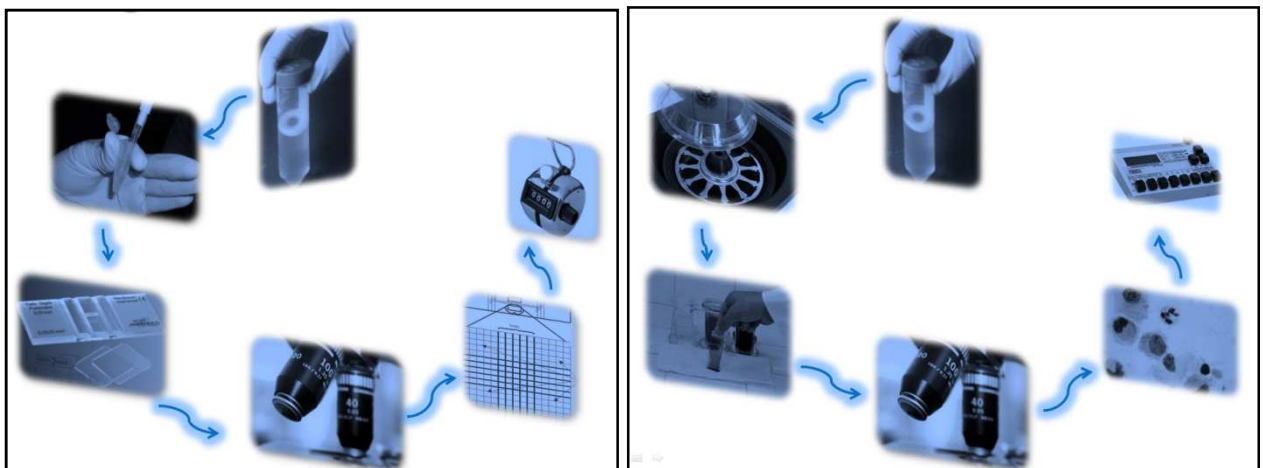


Figura 10. Procedimento de contagem total (à esquerda) e diferencial (à direita) das células do lavado broncoalveolar. Fonte: Queirós-Santos, 2000.

Contagem total e diferencial de leucócitos do sangue

Na extremidade da cauda de cada animal anestesiado foi realizado um corte usando um bisturi e 0,2 mL de sangue foram coletados em tubo de ensaio contendo EDTA a 3%. A partir de amostras diluídas a 1:20 em ácido acético glacial a 3% e azul de metileno, foi realizada a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer ao microscópio de luz (Olympus optical BX41TF, Japão Co Ltda.). (Figura 11)

Uma pequena amostra não diluída foi utilizada para esfregaço sangüíneo em lâminas citológicas. As preparações foram fixadas, coradas (Kit Panótico Rápido LB – Laborclin Ltda., Brasil), e examinadas ao microscópio de luz (Olympus optical BX41TF, Japão Co Ltda.) com lente de imersão. Os diferentes tipos de glóbulos brancos foram quantificados em um contador eletrônico de células sangüíneas (Kacil, mod. CC502). (Figura 11)

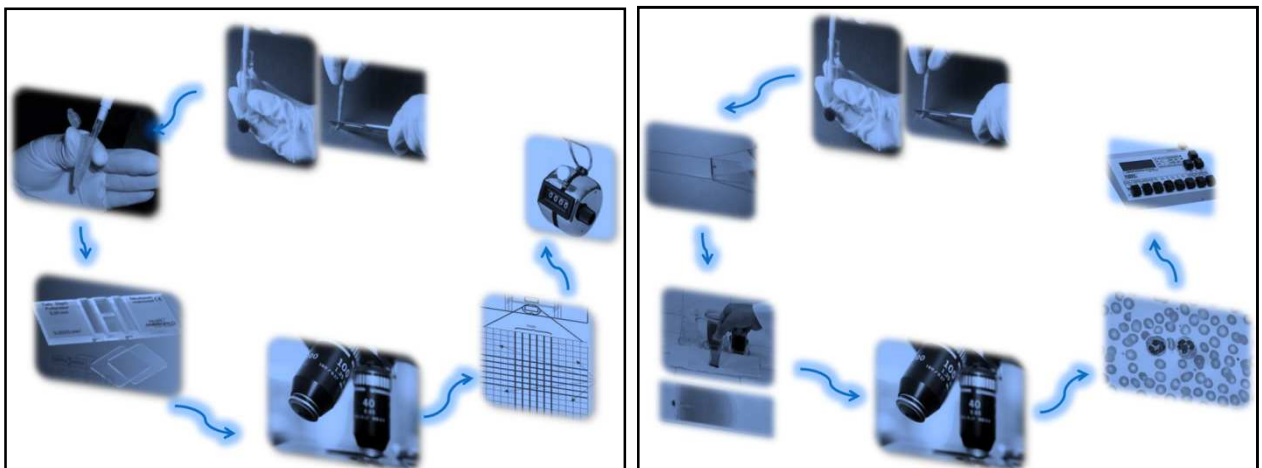


Figura 11. Procedimento de contagem total (à esquerda) e diferencial (à direita) dos leucócitos sangüíneos. Fonte: Queirós-Santos, 2000.

Cultura de macrófagos alveolares

Macrófagos alveolares (MA) foram cultivados como descrito em De-Castro *et al.* (2000). As células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) suplementado com soro fetal bovino a 10%, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich, SP, Brasil). A seguir, as células (5×10^5 /mL) foram distribuídas em placas de cultura (TPP, Cultilab, SP, Brasil) e levados para aderir por 2 h em incubadora a 37°C em CO₂ a 5%. As células não aderidas foram removidas com NaCl a 0,9%. (Figura 12)

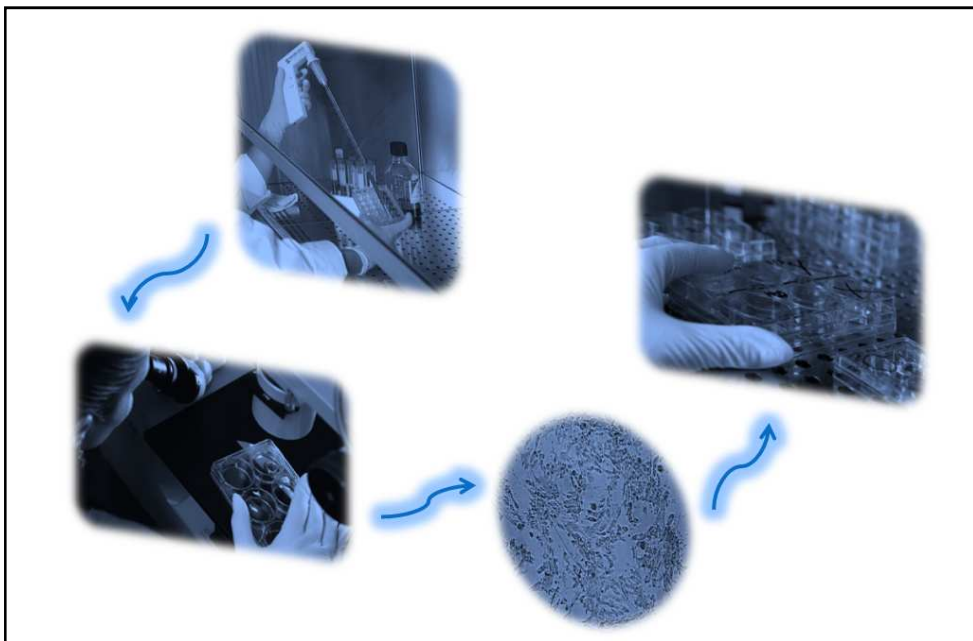


Figura 12. Etapas da cultura de células do lavado broncoalveolar. Fonte: Queirós-Santos, 2000.

Cinética da liberação de óxido nítrico por macrófagos alveolares e substâncias serotoninérgicas

Com o objetivo de analisar a cinética da liberação de óxido nítrico (LON) por MA em resposta a substâncias serotoninérgicas, as células aderidas de animais controles e desnutridos foram incubadas com fluoxetina (FLX) (cloridrato de fluoxetina, TOCRIS Bioscience, Sellex – SAC, SP, Brasil) preparada em água extra pura nas concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} M por 0, 3, 6, 9, 21 e 24 horas. Após cada tempo de incubação, a monocamada de células foi estimulada com 10 μ L/mL de lipopolissacarídeo (LPS, Sigma-Aldrich, SP, Brasil). Para controle negativo, foi adicionada água extrapura em alguns poços. Após 24 horas de incubação com LPS, os sobrenadantes de cultura foram coletados e foi realizada a análise da LON como descrito adiante. (Figura 13)

O efeito dos agonistas de receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} (cloridrato de buspirona, TOCRIS Bioscience, Sellex – SAC, SP, Brasil) e 5-HT_{1B} (CP-93,129, TOCRIS Bioscience, Sellex – SAC, SP, Brasil) *in vitro* sobre a LON por MA de animais controles e desnutridos também foi avaliado. A monocamada de células foi incubada por 6 horas com os agonistas (na concentração de 10^{-6} M) isolados ou associados à FLX também à 10^{-6} M. Após o período de incubação, as células foram estimuladas e a LON foi avaliada usando o mesmo protocolo previamente descrito. (Figura 13)

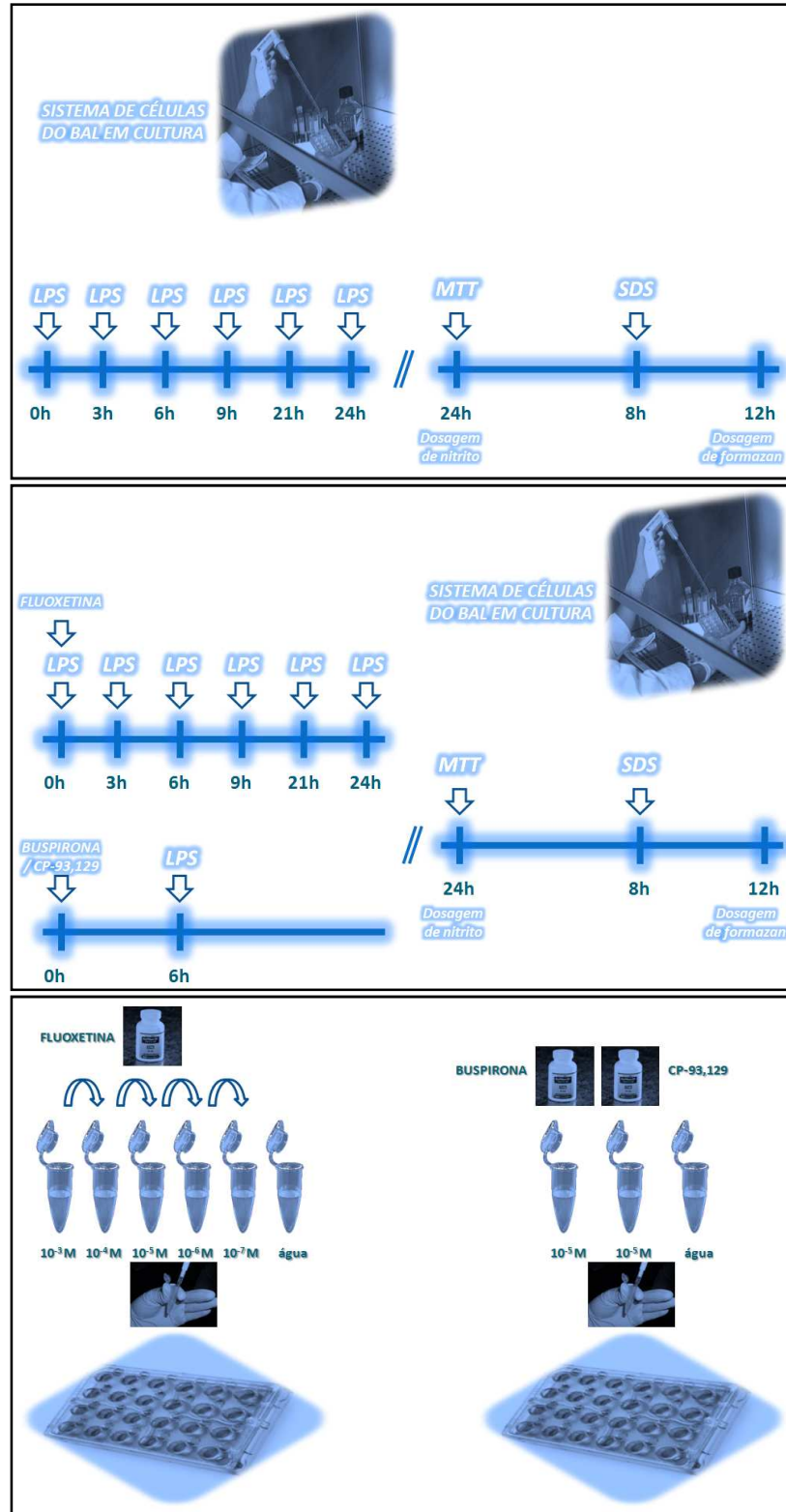


Figura 13. De cima para baixo: desenho para o estudo da cinética de liberação de óxido nítrico por macrófagos alveolares em cultura de animais controles e desnutridos (primeiro esquema); desenho para o estudo da cinética de liberação de óxido nítrico por macrófagos alveolares em cultura de animais controles e desnutridos em resposta à fluoxetina (segundo esquema) e desenho para o estudo do efeito de agonistas dos receptores $5-HT_{1A}$ e $5-HT_{1B}$ sobre a liberação de óxido nítrico por macrófagos alveolares em cultura de animais controles e desnutridos (primeiro esquema).

Análise da liberação de óxido nítrico

A liberação de óxido nítrico foi indiretamente mensurada utilizando-se um método colorimétrico quantitativo baseado na reação de Griess (Ding *et al.*, 1988). No presente estudo, alíquotas de 500 μL em triplicata dos sobrenadantes de cultura foram incubadas à temperatura ambiente por 10 min com 500 μL de reagente de Griess imediatamente preparados (sulfanilamida a 1% e naftiletileno a 0,1% em ácido ortofosfórico a 5%). A absorbância foi mensurada a 550 nm (Spectrophotometer BEL Photonics 1105, Tecnal, SP, Brasil). A concentração de nitrito foi determinada a partir de uma curva padrão construída com nitrato de sódio nas concentrações de 0-100 μM . Todas as amostras foram avaliadas em relação a um branco correspondente a RPMI-1640 incubado por 24 h nas mesmas placas das amostras, mas na ausência de células. Todos os reagentes foram adquiridos na Sigma-Aldrich, SP, Brasil. Os resultados foram expressos em μM de nitrato por 5×10^5 células. (Figura 14)

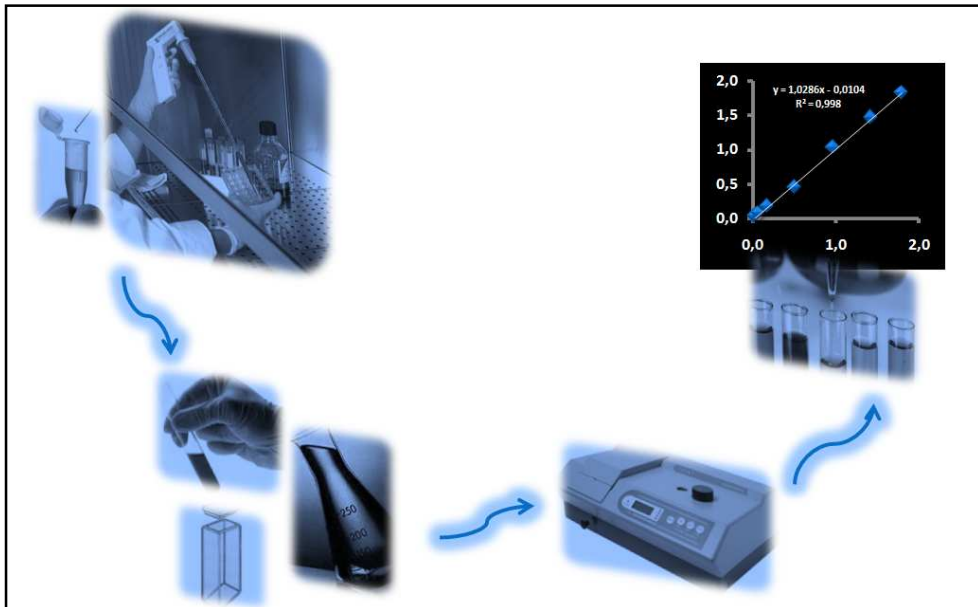


Figura 14. Etapas para leitura dos níveis de nitrito/nitrato em sobrenadante de cultura de macrófagos alveolares estimulado *in vitro* pela reação de Griess.

Análise da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pela redução mitocondrial do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- brometo de difenil tetrazólio (MTT) à formazam como descrito em Mossman (1983). As células foram incubadas com 50 μL de MTT/mL (0,5 mg/ml) e meio de cultura (500 μL /mL) por 8 h em incubadora a 37°C e CO₂ a 5%. O formazam resultante foi solubilizado com 500 μL /mL de dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS), incubados por 12 h nas mesmas condições. A quantificação do formazam solubilizado foi realizada por espectrofotometria a 550 nm (Spectrophotometer BEL Photonics 1105, Tecnal, SP, Brasil). Todos os reagentes foram adquiridos na Sigma-Aldrich, SP, Brasil. Os resultados foram expressos em absorbância de formazam por 5×10^5 células. (Figura 15)

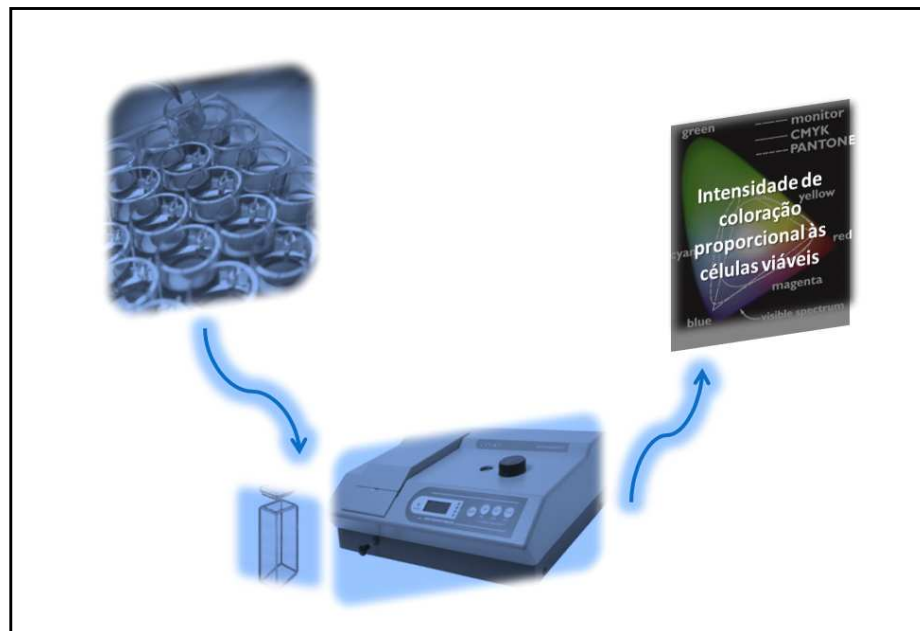


Figura 15. Etapas para leitura dos níveis de formazam em sobrenadante de cultura de macrófagos alveolares cultivados.

Análise estatística

Todos os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). Na comparação entre os grupos, foi utilizado, quando apropriado, teste “t” de Student ou análise múltipla de variância com ou sem medidas repetidas (RM ANOVA), seguida do teste de Holm-Sidak. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

4 RESULTADOS – ARTIGOS ORIGINAIS

No presente trabalho de tese, foram examinadas as conseqüências da desnutrição perinatal pela Dieta Básica Regional (DBR) sobre a programação da função de macrófagos alveolares e o possível papel do sistema serotoninérgico, em ratos adultos. Dois artigos científicos originais foram submetidos a revistas internacionais. Doravante, serão apresentados em ordem cronológica os artigos em suas versões originais.

Perinatal malnutrition programs sustainable alterations in nitric oxide production and cell viability in activated macrophages of the adult rat

O primeiro artigo deste estudo é intitulado: **“PERINATAL MALNUTRITION PROGRAMS SUSTAINABLE ALTERATIONS IN NITRIC OXIDE PRODUCTION AND CELL VIABILITY IN ACTIVATED MACROPHAGES OF THE ADULT RAT”**. Foi submetido como artigo original à revista: **Immunology Letters**. Publicada pela Editora Elsevier como revista oficial da Federação Européia de Sociedades de Imunologia-EFIS, é classificada como qualis internacional A pela CAPES e possui fator de impacto igual a 2,628 (ano de 2007). (ANEXO B)

Em resumo, neste artigo, os efeitos da desnutrição perinatal sobre a produção de NO *in vitro* foram analisados em macrófagos alveolares em ratos adultos. O peso corporal ao nascer dos animais controles e desnutridos foi similar. Os animais desnutridos apresentaram retardo do crescimento, confirmado pelo baixo peso no desmame, persistindo até os 90 dias de vida. Os animais desnutridos também apresentaram menor número de células no lavado broncoalveolar sendo praticamente de macrófagos. Na comparação entre controles e desnutridos, não foi observada diferença no número total de leucócitos e monócitos no sangue. A liberação *in vitro* de NO por macrófagos alveolares e a viabilidade dessas células foi menor no grupo desnutrido em relação ao controle. A agressão nutricional incidindo no período neonatal parece interferir com a programação de mecanismos funcionais dos macrófagos, provocando alterações duradouras, detectáveis no organismo adulto, mesmo após longa recuperação nutricional.

Title

Perinatal malnutrition programs sustainable alterations in nitric oxide production and cell viability in activated macrophages of the adult rat

Authors

Wylla T Ferreira-e-Silva ^a

Bruno A Galvão ^b

Kelli N Ferraz-Pereira ^c

Célia B de-Castro ^b

Raul Manhães-de-Castro ^{a,*}

Author's Institutions

^aDepartamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, UFPE. Recife, PE, Brazil

^bDepartamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, UFPE. Recife, PE, Brazil

^cPrograma de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Centro de Ciências da Saúde, UFPE. Recife, PE, Brazil

*** Corresponding author**

Departamento de Nutrição, CCS, UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, CEP 50670-901,
Cidade Universitária, Recife/PE, Brazil. Tel.: +55 81 2126 8470; fax: +55 81 2126 8473

E-mail adress: manhaesdecastroraul@gmail.com (R. Manhães-de-Castro)

Keywords:

Malnutrition, Programming, Immune development, Nitric oxide production

ABSTRACT

In this study, the effects of perinatal malnutrition on nitric oxide (NO) production were analyzed *in vitro* in activated alveolar macrophages of adult rats. At birth, the body weights of animals in both malnourished and control groups were similar. The malnourished animals presented growth retardation, as confirmed by lower weights at weaning, which persisted until 90 days of life. Malnourished animals also presented lower numbers of total leukocytes and macrophages in the bronchoalveolar lavage fluid, but there was no difference in their percentages. In comparing control and malnourished animals, there was no observable difference in the total number of leukocytes or in the percentages of monocytes in the blood. *In vitro* NO production by alveolar macrophages and their cell viability were lower in the malnourished group than in the control. The period in which the nutritional manipulation occurred seems to interfere with the programming of macrophage mechanisms, with visible consequences in the adult organism.

1. Introduction

Environmental influences early in an organism's life can have long-term consequences [1, 2]. For example, nutritional restriction during the perinatal period can permanently affect morphofunctional patterns in a variety of physiological systems, including the immune system. In humans, epidemiological studies have revealed an association between low birth weight and metabolic diseases in adulthood [1, 3]. In rats, experimental models of maternal nutritional restriction are used for investigating the short- and long-term consequences of nutritional restriction on the nestling's growth [4]. These effects involve a mechanism called "programming", in which an environmental stress during a critical developmental period has permanent effects on the structure and function of the organs [5, 6].

Several studies have demonstrated that early malnutrition affects the immune system and renders the adult organism vulnerable to infections, but the basis for this predisposition is still unclear. In mammals, morphofunctional development of immune system components such as macrophages and their role in the immune response occurs in the perinatal period. For example, in rats and mice, the essential mechanisms of the inflammatory response are only fully developed in the second week of suckling [7]. These critical periods of immune system development of mammalian animals suggest increased vulnerability to external influences.

Eliciting inflammation is an effector function of host defense in the lung, but suppressing and terminating the reaction is also part of this process and involves macrophages. Alveolar macrophages account for up to 95% of cells recovered by bronchoalveolar lavage (BAL) in all species tested [8]. Lung injuries caused by microorganisms are also varied. Several excretory-secretory and somatic products from tissue-invading parasites have been associated with the modulation of host immune responses, for example the induction/inhibition of different host immune mediators such as nitric oxide

(NO) [9]. NO plays an important role in many infectious diseases due to its direct effector function as well as its potent immunoregulatory properties [10]. In humans, the level of NO is dramatically elevated during inflammatory conditions [11].

Malnutrition is the main non-hereditary cause of human immunodeficiency worldwide [12, 13], and its effects on acute and chronic immunological responses are well documented [14, 15]. As such, the nutritional environment in the prenatal and postnatal periods can confer long-lasting alterations in the immune response, and predispose individuals to disease. Deregulation of NO production, coupled with malnutrition may contribute to increased incidences of long-lasting alterations in the immune response. Thus, the objective of this study was to examine the *in vitro* effects of perinatal malnutrition on NO production in activated alveolar macrophages of adult rats.

2. Material and methods

2.1. *Animals and experimental groups*

Wistar rats were used. Animals were kept at a temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$, in a light-dark cycle (lights on from 6 a.m. to 6 p.m.). After mating and confirmation of gestation, the female rats were housed individually in polypropylene cages, with free access to water and a 23% protein diet (LABINA-Purina, Agribands, Brazil). After birth, the neonates were randomly distributed to litters of six pups per mother. The experimental groups were based on the diet given to the mother during lactation. The control group (C) was fed a 23% protein diet, while the malnourished group (M) was fed a “regional basic diet” (RBD), starting from the day of birth. The RBD consists of foods that constitute the basic meals of some rural communities in Northeast Brazil (in the so-called “zona da mata”, state of Pernambuco). By feeding the RBD to animals, we were reproducing a type of malnutrition similar to that seen in humans of that region, as judged by the “clinical” signs of the animals, as well as certain biochemical parameters [16]. The constituents of the RBD are given in Table 1. This diet has a low protein content (7.8%), is deficient in vitamins and some minerals [16], and represents the main nutritional deficits already present in many people living in Northeast Brazil.

After the suckling period, all animals received the 23% protein diet. On post-natal day 90 (P90), NO production was measured in supernatants from cultured macrophages stimulated with LPS. At the end of the study all the animals were killed by a lethal dose of anesthesia (solution of 0.5% chloralose and 12.5% urethane). This study was approved by the Federal University of Pernambuco Committee of Ethics in Animal Experimentation (CEEAA/UFPE), and followed the regulations established by the Brazilian School of Animal Experimentation (COBEA).

2.2. Body weight

The body weights of the animals were recorded daily during the suckling phase, and every ten days from 30 to 90 days after birth (P30, P40, P50, P60, P70, P80 and P90), using a MARTE AS 1000 scale, with a capacity of 1000 g and a sensitivity of 0.01 g.

2.3. Bronchoalveolar lavage fluid

Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed according to the technique described in De Castro et al. [17]. On P90, the animals were anesthetized with a solution of 0.5% chloralose and 12.5% urethane (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) via intraperitoneal injection, with the dose of 10 ml/Kg body weight. BAL was performed by injecting 0.9% NaCl (at ambient temperature) into a syringe connected to a plastic cannula, which was inserted into the trachea. Several 3 mL aliquots were injected and collected in a sterile glass tube. BAL fluid recovery was approximately 30 mL per animal.

2.4. Total and differential leukocyte count in bronchoalveolar lavage fluid

The total leukocyte count in the BAL fluid was analyzed in a Neubauer counting chamber connected to a light microscope. The samples were diluted 1:20 in 3% glacial acetic acid and methylene blue.

For differential leukocyte counting in the BAL fluid, slides were made using samples that were diluted in 0.9% NaCl and cytocentrifuged. The slides were fixed, stained (Kit

Panótico Rápido LB – Laborclin Ltda[®]), and examined using a light microscope equipped with an immersion lens. The different types of white globules were quantified by an electronic counter.

2.5. Total and differential leukocyte count in blood

The tips of the tails of anesthetized animals were cut with a scalpel, and 0.2 mL of blood was collected in glass tubes containing 3% EDTA. Total leukocyte counting was done in a Neubauer counting chamber. The differential counting was done using blood smear slides, with the same methodology as that for BAL.

2.6. Culture of alveolar macrophages

Alveolar macrophages were cultured as previously described [17]. The cells were resuspended in RPMI-1640 medium (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Sigma). Alveolar macrophages (5×10^5 /well) were plated on culture plates (Costar, Cambridge, MA) and allowed to adhere for 2 h at 37 °C in 5% CO₂. Non-adhering cells were removed by gentle washing with 0.9% NaCl, and 1 ml of fresh media was added for further cell culture. Adherent alveolar macrophages were incubated with water (negative control, \emptyset), or with 10 µl/well lipopolysaccharide (LPS, Sigma) at 0, 3, 6, 9, 21 and 24 hours after cell culture. After 24 h of each time interval of LPS incubation, culture supernatants were collected, cell viability was assessed, and the NO assay was performed.

2.7. Nitric oxide (NO) assay

NO release was measured indirectly using a quantitative, colorimetric assay based on the Griess reaction [18]. In the present study, triplicate 500 μ l aliquots of cell culture supernatants were incubated with 500 μ l of freshly prepared Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamide dihydrochloride and 5% ortho-phosphoric acid) at room temperature for 10 min. The absorbance of the azochromophore was measured at 550 nm (BEL Photonics 1105). The nitrite concentration was determined using sodium nitrite as a standard (0–100 μ M). All samples were assayed against a blank comprising complete RPMI-1640 incubated for 24 h in the same plates as the samples, but in the absence of cells. All reagents were purchased from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. The results were expressed in micromoles nitrite per 5×10^5 macrophages.

2.8. Cell viability assay

Cell viability was assessed by the mitochondrial reduction of 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) to formazan as described [19]. The alveolar macrophages were incubated with MTT (0.5 mg/ml) in complete medium (500 μ l /well) for 8 h at 37°C in 5% CO₂. The resulting formazan was solubilized in 500 μ l/well of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), for 12 h at 37°C in 5% CO₂. Quantification of formazan was performed spectrophotometrically at 550 nm (BEL Photonics 1105). All reagents were purchased from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. The results were expressed in absorbance of formazan per 5×10^5 macrophages.

2.9. *Statistical analysis*

All data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). In the comparison between groups, the Student “t” test or the two-way ANOVA for repeated measures followed by Holm-Sidak post-tests were used, when appropriate. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

At birth, the average body weights of animals in both groups were similar (C = 7.5 ± 0.6 g, M = 7.6 ± 0.8 g) (Figure 1). However, the malnourished animals presented growth retardation, as confirmed by lower weights at weaning, which persisted until P90 (Figure 1).

Malnourished animals presented lower numbers of total leukocytes and macrophages in the BAL fluid (Figure 2). However, there was no difference in the percentages of leukocytes and macrophages in the BAL fluid between control and malnourished animals (Figure 2).

In comparing control and malnourished animals, there was no observable difference in the total number of leukocytes or the percentages of monocytes in blood (Figure 3).

In vitro NO production by rat alveolar macrophages was lower in the malnourished group compared to the control (Figure 4).

The cell viability of rat alveolar macrophages was lower in the malnourished group compared to the control for all time intervals analyzed (Figure 5).

4. Discussion

The impact of perinatal malnutrition on NO production in rat alveolar macrophages was evaluated in adult animals. Rats were breastfed by mothers fed a multideficient diet similar to that consumed during the 1960s by malnourished populations in the northeast of Brazil, called the Regional Basic Diet (RBD) [16]. *In vitro* cell culture studies showed that as adults, these rats exhibited a reduction in the total number of leukocytes and macrophages in BAL fluid, and a decrease in cell viability and function. The latter was indicated by a reduction of macrophage capacity for NO production. These findings indicate that perinatal malnutrition programmed sustainable alterations in the macrophages in adult life.

The suckling period is a critical period of development where general maturation and growth of organ systems occurs. Malnutrition during the suckling period resulted in the reduction of body weight in early life, and deficiencies in weight gain. This low weight was maintained despite the animals being fed a normal protein diet. The mothers' daily RBD consumption caused energetic and protein malnutrition in the nestlings, which replicates the malnutrition observed in children [16]. RBD consumption in animals reproduces many changes observed in humans, such as cardiovascular and renal alterations, a modified response to antidepressants, and secondary immunodeficiency [20, 21, 22]. These effects may be due to nutritional deficiencies imposed upon mothers during the suckling period. During this phase, protein deficiency causes alterations in the quality of maternal milk [23, 24], which can cause damage to body growth in several mammalian species [25].

The immune system of rodents, similar to that of humans, develops during rapidly changing phases of ontogeny. These phases range from fetal to early postnatal life and represent critical periods in vertebrate immune system development [26, 27]. In our study, the environmental challenges during the suckling period caused injuries to the immune system in

adult life; these injuries persisted despite a long-term normal diet. Perinatal malnutrition reduced the total number of leukocytes and macrophages in BAL fluid. Such alterations may be due to profound changes in the bone marrow microenvironment, which impair hematopoiesis and induce modifications in the cellularity and structure of hematopoietic tissues [28]. The impairment of bone marrow cell proliferation in undernourished animals and humans assayed in pregnancy or after birth is well documented [29]; however studies exploring these long-term effects are scarce. Although alterations in primary lymphoid organs were not investigated in the present study, and no difference was found either in the differential or total counts of peripheral blood leucocytes (the latter according to Barreto-Medeiros et al., 2007 [21] using the same malnutrition model), we do not discount the hypothesis that the reduction in the total leukocyte population and macrophages in the BAL fluid is a repercussion of the perinatal malnutrition.

The highest production of NO by cells in culture occurs 24 hours after stimulation with LPS, and results in increased nitrite levels in culture cell supernatants [18]. In the present study, *in vitro* cell culture systems were utilized to study the kinetics of NO production by alveolar macrophages from malnourished animals. The NO production was stimulated after 3, 6, 9, 21 and 24 hours in cell culture to find the best time interval for the stimulation of the macrophages. A constant NO production was found in the control group. In contrast, NO production in the alveolar macrophage culture of malnourished animals was remarkably reduced.

The alteration of the nonspecific immune response, as indicated by the reduction of macrophage capacity for NO production, deserves special attention. In fact, an association between malnutrition and disturbances in this immune function has previously been reported. There are few studies focusing on the relationship between malnutrition and production of NO

by macrophages [30, 31, 32, 33]. Ansted et al., (2001) [30] found an impairment of NO production by peritoneal cells after stimulation with IFN-gamma/LPS in a murine model of multinutrient undernutrition that reproduced the features of moderate human malnutrition. Wu et al., (1999) [31] showed that dietary protein or arginine deficiency reduced LPS-induced NO production in rat macrophages. A decreased production of NO from splenic macrophages in mice on a protein-free diet was also found [32]. Finally, Redmond et al. (1995) [33] examined the effect of protein-energy malnutrition on components of Ag presentation by peritoneal macrophages and the potential regulatory role of NO in these immune interaction, and found a defect in nitrite production during protein-energy malnutrition. However, none of these studies investigated the later repercussions of malnutrition in early life. In fact, studies on immunological alterations occurring long-term after restricted periods of malnutrition are almost nonexistent. A rare example is a study by Prestes-Carneiro et al. (2006) [34], which showed that protein malnutrition for the first 12 days of lactation, induces a long-term effect on macrophage function in adulthood, represented by impaired spreading and phagocytosis. Although malnutrition presented low nitrite levels after stimulation with LPS, this isolated fact does not justify a macrophage malfunction. Therefore, further studies of macrophages at the molecular and cellular levels, such as inducible NO synthesis in macrophages from malnourished rats in the early life, are required.

The increased levels of glucocorticoids can result in significant macrophage dysfunction. De Castro et al., (2000) [17] found an increase in plasma levels of corticosterone, and a decrease in superoxide production in alveolar macrophages of control rats under stress. In the present study, the corticosterone levels were not measured, although several studies have associated malnutrition with high levels of glucocorticoids in the circulation [35, 36]. On the other hand, Barreto-Medeiros et al. (2007) [21], using the same malnutrition model found in neonatal malnourished animals, observed reduced plasma corticosterone concentration after

foot shock-induced stress. Therefore, the consequences of malnutrition in the beginning of life on the production of glucocorticoids are still not understood. It appears that plasma corticosterone levels can be increased, decreased or unaffected in malnourished animals in the beginning of pre and postnatal life [37, 38].

Alveolar macrophages from adult rats whose mothers suffered malnutrition in the suckling period show a reduction in viability after culture *in vitro*. Malnutrition is associated with a significant increase in baseline and stimulated peritoneal macrophage apoptosis [39]. Although apoptosis in macrophages was not examined in this study, it is possible that the reduction in macrophage viability in culture is a consequence of apoptosis. Therefore, studies focusing on apoptosis as a consequence of perinatal malnutrition, followed by recovery, are necessary.

In conclusion, perinatal malnutrition impairs the functional parameters of innate immunity, such as the number and function of macrophages. This suggests that the nutritional manipulation during the perinatal period interfered with the programming of macrophage mechanisms, with visible consequences in the adult organism.

Nutritional deficiencies during a critical period of development appear to exert a long-lasting effect on the function of both neuroendocrine and immune system components.

Acknowledgements

This work was supported by The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil.

References

- [1] Barker, DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci* 1998;95(2):115-28.
- [2] Holleman A, Den Boer ML, Kazemier KM, Janka-Schaub GE, Pieters R. Resistance to different classes of drugs is associated with impaired apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2003;102(13):4541-6.
- [3] Phillips DI, Walker BR, Reynolds RM, Flanagan DE, Wood PJ, Osmond C, Barker DJ, Whorwood CB. Low birth weight predicts elevated plasma cortisol concentration in adults from 3 populations. *Hypertension* 2000;35(6):1301-6.
- [4] Desai M, Crowther NJ, Lucas A, Hales CN. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br J Nutr* 1996;76(4):591-603.
- [5] Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 1991;156:38-50.
- [6] Lucas A. The developmental origins of adult health and well-being. *Adv Exp Med Biol* 2005;569:13-5.
- [7] Holladay SD, Smialowicz RJ. Development of the murine and human immune system: differential effects of immunotoxicants depend on time of exposure. *Environ Health Perspect* 2000;108(S3):463-73.
- [8] Bingisser RM, Holt PG. Immunomodulating mechanisms in the lower respiratory tract: nitric oxide mediated interactions between alveolar macrophages, epithelial cells, and T-cells. *Swiss Med Wkly* 2001;131:171-179.
- [9] Espinoza E, Pérez-Arellano JL, Muro BVA. Cytoplasmic signalling pathways in alveolar macrophages involved in the production of nitric oxide after stimulation with excretory/secretory antigens of *Toxocara canis*. *Parasite Immunol* 2002;24 (11-12):535-44.
- [10] Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. 2001;2(10):907-16.

- [11] Dykhuizen, RS, Masson J, McKnight G, Mowat AN, Smith CG, Smith LM, and Benjamin N. Plasma nitrate concentration in infective gastroenteritis and inflammatory bowel disease. *Gut*. 1996;39 (3):393-95.
- [12] Chevalier P, Delpeuch F, Maire B. The "malnutrition-infection" complex, the most widespread public health problem in underprivileged populations. *Med Mal Infect* 1996;26(S3):366-70.
- [13] Müller O, Krawinkel M. Malnutrition and health in developing countries. *CMAJ* 2005;173(3):279-86.
- [14] Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Ann Nutr Metab* 2007;51(4):301-23.
- [15] Chandra RK. Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr* 2002;56(S3):S73-6.
- [16] Teodósio NR, Lago ES, Romani SA, Guedes RC. A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam Nutr* 1990;40(4):533-47.
- [17] De Castro CM, Manhães-de-Catro R, Fernandes de Medeiros A, Queirós-Santos A, Ferreira-e-Silva WT, Luís de Lima Filho J. Effect of stress on the production of O₂(⁻) in alveolar macrophages. *J Neuroimmunol* 2000;108(1-2):68-72.
- [18] Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988;141(7):2407-12.
- [19] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *JIM* 1983;65(1-2):55-63.

- [20] Lahlou S, Interaminense LF, Figueiredo AF, Duarte GP. Pressor responsiveness to intravenous quinpirole is blunted in malnourished, conscious rats: central vs. peripheral and spinal mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44(1):16-25.
- [21] Barreto-Medeiros J, Queiros-Santos A, Cabral-Filho JE, Ferreira-e-Silva WT, Leandro CG, Deiró TC, Manhães-de-Castro R, Machado Barbosa de-Castro CM. Stress/Aggressiveness-induced immune changes are altered in adult rats submitted to neonatal malnutrition. *Neuroimmunomodulation* 2007;14(5):229-334.
- [22] Chandra RK. Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr* 2002;56(S3):S73-6.
- [23] Marín MC, De Tomás ME, 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* 1995;125(4):1017-24.
- [24] Sturman JA, Gargano AD, Messing JM, Imaki H. Feline maternal taurine deficiency: effect on mother and offspring. *J Nutr* 1986;116(4):655-67.
- [25] Morgane PJ, Miller M, Kemper T, Stern W, Forbes W, Hall R, Bronzino J, Kissane J, Hawrylewicz E, Resnick O. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 1978;2(3):137-230.
- [26] West LJ. Defining critical windows in the development of the human immune system. *Hum Exp Toxicol* 2002; 21(9-10):499-505.
- [27] Landreth KS. Critical windows in development of the rodent immune system. *Hum Exp Toxicol* 2002;21(9-10):493-8.
- [28] Vituri CL, Alvarez-Silva M, Trentin AG, Borelli P. Alterations in proteins of bone marrow extracellular matrix in undernourished mice. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33(8):889-95.

- [29] Borelli P, Blatt S, Pereira J, Maurino BB de, Tsujita M, Souza AC de, et al. Reduction of erythroid progenitors in protein–energy malnutrition. *Br J Nutr* 2007; 97:307-14.
- [30] Anstead GM, Chandrasekar B, Zhao W, Yang J, Perez LE, Melby PC. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun* 2001;69:4709-18.
- [31] Wu G, Flynn NE, Flynn SP, Jolly CA, Davis PK. Dietary Protein or Arginine Deficiency Impairs Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthesis by Young Rats. *J. Nutr.* 1999;129:1347-54.
- [32] Hill AD, Naama H, Shou J, Calvano SE, Daly JM. Antimicrobial effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in protein-energy malnutrition. *Arch Surg* 1995; 130(12):1273-7; discussion 1277-8.
- [33] Redmond H P, Gallagher H J, Shou J, Daly J M. Antigen presentation in protein-energy malnutrition. *Cell Immunol* 1995;163(1):80-9.
- [34] Prestes-Carneiro LE, Laraya RD, Silva PRC, Moliterno RA, Felipe I, Mathias PC. Long-term effect of early protein malnutrition on growth curve, hematological parameters and macrophage function of rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2006; 52:414-20.
- [35] Barja-Fidalgo C, Souza EP, Silva SV, Rodrigues AL, Anjos-Valotta EA, Sannomyia P, et al. Impairment of inflammatory response in adult rats submitted to maternal undernutrition during early lactation: role of insulin and glucocorticoid. *Inflamm Res* 2003;52(11):470-6.
- [36] Fichter MM, Pirke KM. Effect of experimental and pathological weight loss upon the hypothalamo-pituitary adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* 1986;11(3): 295-305.
- [37] Lesage J, Blondeau B, Grino M, Breant B, Dupouy JP. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth

retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology* 2001;142:1692-702.

[38] Landgraf MA, Tostes RC, Borelli P, Zorn TM, Nigro D, Carvalho MH, Fortes ZB. Mechanisms involved in the reduced leukocyte migration in intrauterine undernourishment. *Nutrition* 2007;23(2):145-56.

[39] Rivadeneira DE, Grobmyer SR, Naama HA, Mackrell PJ, Mestre JR, Stapleton PP, Daly JM. Malnutrition-induced macrophage apoptosis. *Surgery* 2001;129(5):617-25.

Table 1. Centesimal Composition of the Regional Basic Diet (RBD), as reported in Teodósio *et al.*, (1990). RBD is totally deprived of water soluble and fat soluble vitamins.

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

a: cooked in water and dried

Figure 1

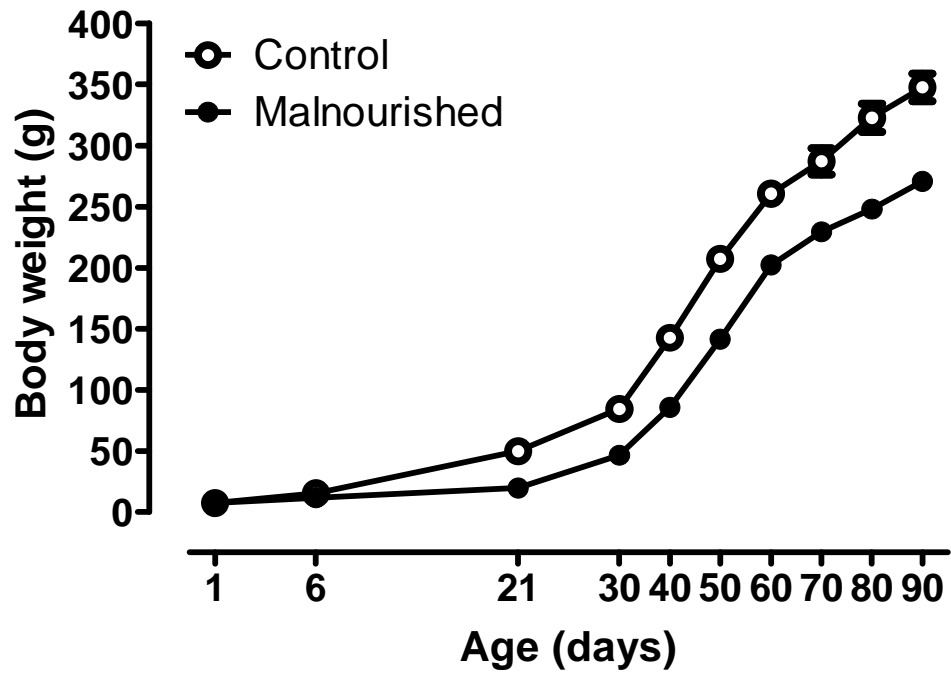


Figure 2

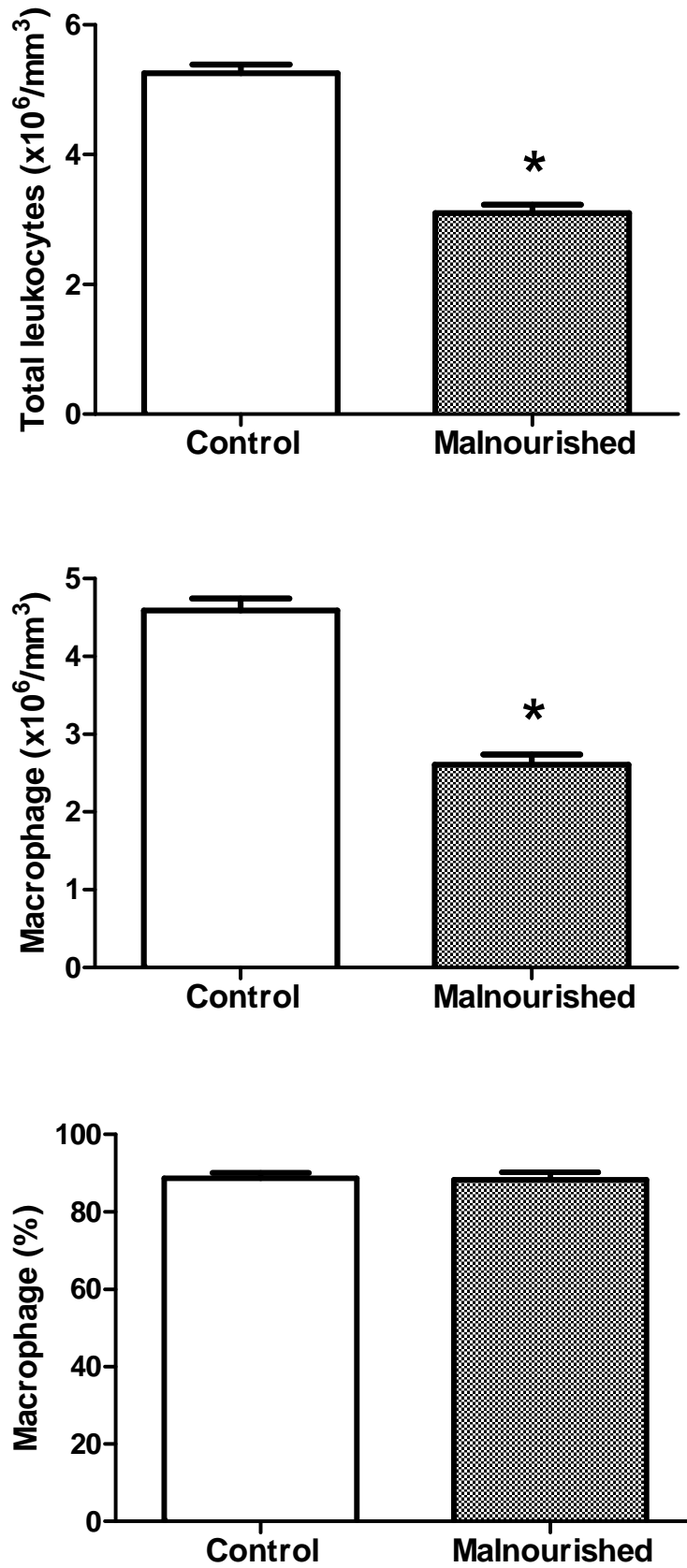


Figure 3

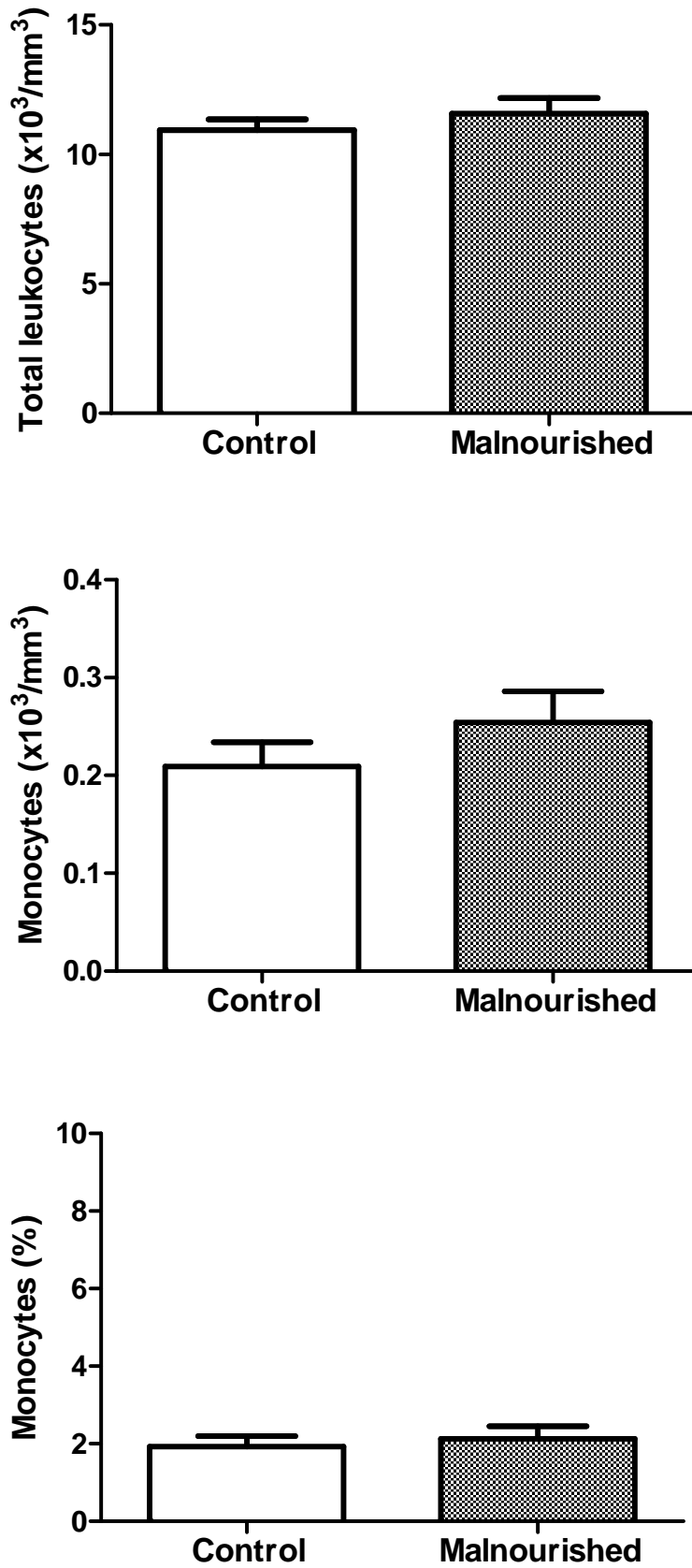


Figure 4

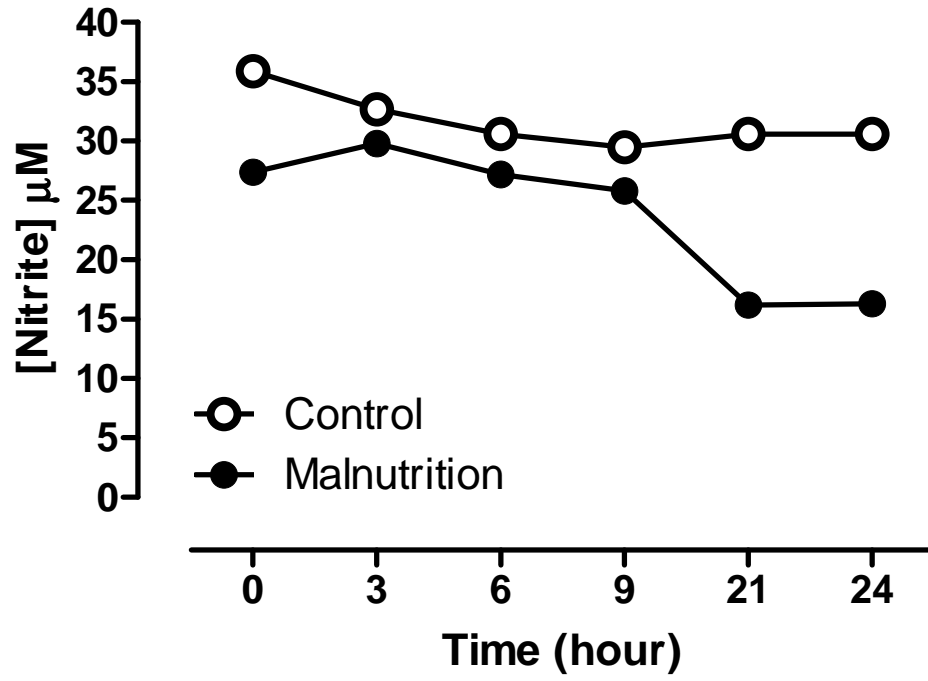
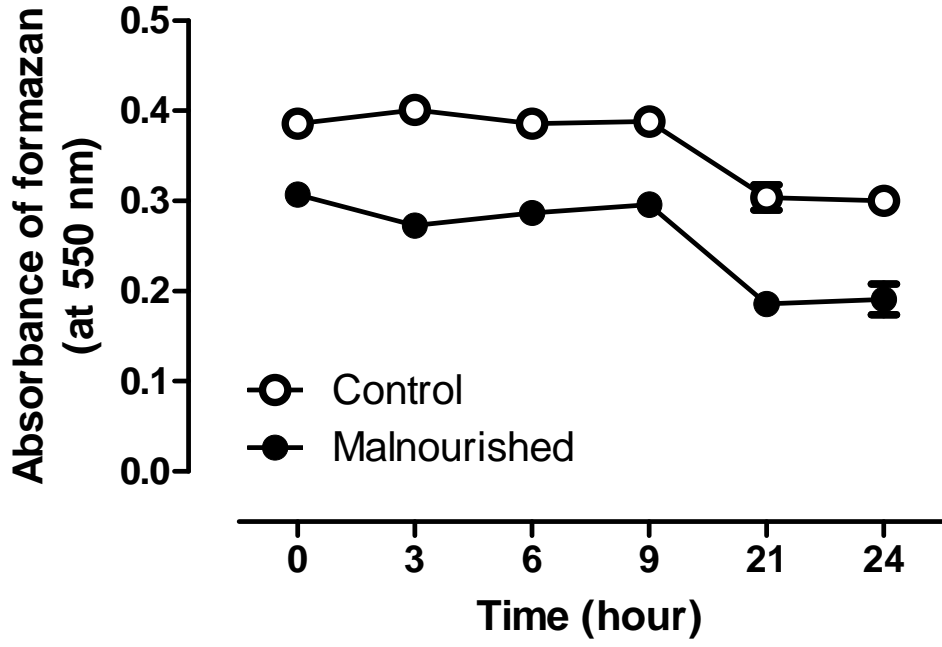


Figure 5



Legends for the figures

Figure 1. Body weights of male offsprings. Data represent means \pm SEM with $n=17$ for C, and $n=14$ for M. The differences in average body weights between C and M rats were statistically significant ($P<0.05$) from 6th days of life to P90 (two-way ANOVA for repeated measures followed by Holm-Sidak post-tests). For clarity, the symbols representing the statistical significance between C and M groups at different time points were omitted.

Figure 2. Total leukocytes and macrophages (number and percentage) in the BAL fluid from the animals at P90. Data represent means \pm SEM with $n=17$ for C, and $n=14$ for M. The differences (*) in total leukocyte and macrophage numbers between C and M rats were statistically significant with $P<0.05$ (“t” test).

Figure 3. Total leukocytes and monocytes (number and percentage) in the blood from the animals at P90. Data represent means \pm SEM with $n=17$ for C, and $n=14$ for M. There is no difference between the animals at P90.

Figure 4. Nitrite production in the supernatants from cultured alveolar macrophages from the animals at P90. Data represent means \pm SEM with $n=17$ for C, and $n=14$ for M. The differences in nitrite production between C and M rats were statistically significant with $P<0.05$ for all the times assessed (two-way ANOVA for repeated measures followed by

Holm-Sidak post-tests). For clarity, the symbols representing the statistical significance between C and M groups at different time points were omitted.

Figure 5. Formazan production in the supernatants from cultured alveolar macrophages from the animals at P90. The differences in cell viability between C and M rats were statistically significant with $P < 0.05$ for all the times assessed (two-way ANOVA for repeated measures followed by Holm-Sidak post-tests). For clarity, the symbols representing the statistical significance between C and M groups at different time points were omitted.

Perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide release by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rat

O segundo artigo deste estudo é intitulado: “**PERINATAL MALNUTRITION PROGRAMS SUSTAINED ALTERATIONS IN NITRIC OXIDE RELEASE BY ACTIVATED MACROPHAGES IN RESPONSE TO FLUOXETINE IN ADULT RAT**”. Foi submetido como artigo original à revista: **Neuroimmunomodulation**. Publicada pela Editora Karger, uma editora de longa história em publicações médicas <<desde 1893>>, é uma revista que explora as vias nas quais o sistema nervoso interage com o sistema imune. Englobando pesquisas básicas e clínicas, relata todos os aspectos destas interações. É classificada como qualis internacional A pela CAPES. (ANEXO C).

Em síntese, neste artigo, foi avaliada a liberação de óxido nítrico (LON) por macrófagos alveolares (MA) de ratos adultos, desnutridos ou não na lactação, em resposta a diferentes concentrações e tempos de fluoxetina (FLX) *in vitro* e a agonistas 5-HT_{1A} (buspirona) e 5-HT_{1B} (CP-93,129). Ratos Wistar foram distribuídos em dois grupos nutricionais de acordo com a dieta de suas mães durante a lactação: um grupo controle (C, n=12) amamentado por mães alimentadas com dieta a 23% de proteína e um grupo desnutrido (D, n=12), amamentado por mães que receberam 8% de proteína em sua dieta. Após o desmame, todos os ratos receberam dieta normoprotéica. Aos 90 dias de vida, a cinética da LON foi mensurada no sobrenadante de MA em cultura com FLX. A LON em por MA com agonistas serotoninérgicos também foi quantificada. O peso corporal dos animais desnutridos foi menor ao desmame, persistindo a redução até os 90 dias de vida. Na presença de FLX, a LON por MA nos animais controles foi menor, uma resposta relacionada à dose, mas não ao tempo. A adição dos agonistas não interferiu na LON por MA nesses animais. A LON por

MA de animais desnutridos não foi modificada pela FLX ou agonistas. Como consequência da desnutrição, houve menor número de células totais e de macrófagos no lavado broncoalveolar, redução na LON e na viabilidade dos MA em cultura. A manipulação nutricional no período perinatal parece interferir com a programação na função de macrófagos e afetar sua regulação serotoninérgica, persistindo até a idade adulta.

Title: Perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide released by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rat

Authors:

Wylla T Ferreira-e-Silva ^a

Bruno A Galvão ^b

Kelli N Ferraz-Pereira ^c

Célia B de-Castro ^b

Raul Manhães-de-Castro ^{a,*}

Author Affiliations:

^aDepartamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, UFPE. Recife, PE, Brazil

^bDepartamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, UFPE. Recife, PE, Brazil

^cPrograma de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Centro de Ciências da Saúde, UFPE. Recife, PE, Brazil

This study was conducted in the Departamento de Nutrição. Universidade Federal de Pernambuco – Brazil.

***Corresponding author:** Departamento de Nutrição, CCS, UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, CEP 50670-901, Cidade Universitária, Recife/PE, Brazil. Tel.: +55 81 2126 8470; fax: +55 81 2126 8473

E-mail address: wyllatfs@hotmail.com (W. Ferreira-e-Silva)

Short Title/Running head: perinatal malnutrition and serotonergic regulation of the macrophage

Key-words: Malnutrition, Programming, Immune development, Nitric oxide release, Macrophage, Serotonin

Abstract

Objective: Nutritional restriction during lactation has long-term consequences on the functioning of neuroimmune systems. Receptors and transporter serotonin are present in macrophages and may influence its role. This study evaluated the release of nitric oxide (NOR) by alveolar macrophage (AM) from adult rats, both control or malnourished during lactation, in response to different fluoxetine (FLX) concentrations and times, and 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists.

Methods: Male Wistar rats were distributed into two groups according to their mother's diet during lactation: a control group (C, n=12), mothers receiving a 23% protein diet, and a malnourished group (M, n=12), mothers receiving an 8% protein diet. After weaning, all rats received a 23% protein diet. On the 90th day after birth, NOR kinetics was measured in supernatants from cultured AM with FLX. The NOR with serotonergic agonists was also quantified.

Results: The M weighed less at weaning, which persisted until 90 days of life. In the presence of FLX, the NOR by AM in C was lower, a response related to the dose but not the time. The addition of agonists did not interfere in the NOR by AM in C. The NOR by AM from M was not modified by FLX or agonists. As a consequence of malnutrition, there were lower numbers of cells and macrophages in the bronchoalveolar lavage, cell viability and NOR impaired by AM and.

Conclusions: Nutritional manipulation in the perinatal period seems to interfere with the functional programming of macrophages, and to affect their serotonergic regulation, which persists through adulthood.

Introduction

Environmental influences early in an organism's life can have long-term consequences [1,2]. For example, nutritional restriction during the perinatal period can permanently affect morphofunctional patterns in a variety of physiological systems, including the immune system. In humans, epidemiological studies have revealed an association between low birth weight and metabolic diseases in adulthood [2]. In rats, experimental models of maternal nutritional restriction are used for investigating the short- and long-term consequences of nutritional restriction on the nestling's growth [3]. These effects involve a mechanism called "programming", in which an environmental stress during a critical developmental period has permanent effects on the structure and function of the organs [1,2]. Effects on the nervous, endocrine and immune systems are particularly concerning as they may directly modify the individual's experience and relationship with their environment [4].

Several studies have demonstrated that early malnutrition affects the immune system and renders the adult organism vulnerable to infections [5], but the basis for this predisposition is still unclear. In mammals, morphofunctional development of immune system components such as macrophages and their role in the immune response occurs in the perinatal period [6]. For example, in rats, the essential mechanisms of the innate immune response are only fully developed in the first month of life [7]. These critical periods of immune system development of mammalian animals suggest increased vulnerability to external influences.

Serotonin (5-HT) is one of the most extensively studied molecules, particularly on its role in the nervous system [4]. However, 5-HT is also present in a variety of peripheral tissues, including in constituents of the immune system [4], suggesting a role in interactions between the nervous system and immune system [4]. Due to the cooperation between these

systems [4], the internal homeostasis of the body is maintained, but it may be under the influence of endogenous and exogenous conditions.

Acting as regulators of cell homeostasis or as effectors in injuries, infections and tumors, macrophages are key components of the immune system [8] and implicated in interactions with the nervous system [9]. In particular, the 5-HT seems to have a relevant role in macrophages, in which can be found some of its receptors, and its system reuptake of 5-HT. An important way to evaluate the function of macrophages is to analyze the production of nitric oxide (NO) [10]. Nitric oxide release (NOR) from activated macrophages is an effector function of host defense and has been associated with the modulation of host immune responses. NO plays an important role in many infectious diseases due to its direct effector function as well as its potent immunoregulatory properties [10].

Malnutrition is the main non-hereditary cause of human immunodeficiency worldwide [5], and its effects on acute and chronic immunological responses are well documented [5]. As such, the nutritional environment in the prenatal and postnatal periods can confer long-lasting alterations in immune response, and predispose individuals to disease. Deregulation of NO production, coupled with malnutrition may contribute to increased incidences of long-lasting alterations in the immune response. Thus, the objective of this study was to examine the consequences of malnutrition on the perinatal NOR in alveolar macrophages (AM) in the adult mouse, and to assess how the NOR of AM in culture is influenced by the reuptake selective inhibitor of 5-HT and serotonergic agonists among malnourished and well-nourished animals in a critical period of development.

Materials and methods

Animals and experimental groups

Wistar rats were used. Animals were kept at a temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$, in a 12 h light-dark cycle (lights on from 6 a.m. to 6 p.m.). After mating and confirmation of gestation, the female rats were housed individually in polypropylene cages, with free access to water and a 23% protein diet (LABINA-Purina, Agribbrands, Brazil). After birth, the neonates were randomly distributed to litters of six pups per mother. The experimental groups were based on the diet given to the mother during lactation. Control group (C) mothers were fed a 23% protein diet, while those in the malnourished group (M) were fed a “regional basic diet” (RBD), starting from the day of birth. The RBD consists of foods that constitute the basic meals of rural communities in Northeast Brazil (in the so-called “zona da mata”, state of Pernambuco) [11]. By feeding the RBD to animals, we were reproducing a type of malnutrition similar to that seen in humans of that region, as judged by the “clinical” signs of the animals, as well as certain biochemical parameters [11]. The composition of the RBD is given in Table 1. This diet has a low protein content (7.8%), is deficient in vitamins and some minerals, and represents the main nutritional deficits already present in many people living in Northeast Brazil [11].

After the suckling period, all animals received the 23% protein diet. On post-natal day 90 (P90), NOR kinetics was measured in supernatants from cultured AM with fluoxetine (FLX), and the effect of serotonergic agonists on NOR in AM was also evaluated. At the end of the study all the animals were killed by a lethal dose of anesthesia (solution of 0.5% chloralose and 12.5% urethane; Sigma-Aldrich, SP-Brazil). This study was approved by the

Federal University of Pernambuco Committee of Ethics in Animal Experimentation (CEEAA/UFPE), and followed the regulations established by the Brazilian School of Animal Experimentation (COBEA).

Body weight

The body weights of the animals were recorded daily during the suckling phase, and every ten days from 30 to 90 days after birth (P30, P40, P50, P60, P70, P80 and P90), using a MARTE AS 1000 scale, with a capacity of 1000 g and a sensitivity of 0.01 g.

Bronchoalveolar lavage (BAL)

BAL was performed according to the technique described in De Castro et al. [12]. On P90, the animals were anesthetized with a solution of 0.5% chloralose and 12.5% urethane (Sigma-Aldrich, SP, Brazil) via intraperitoneal injection, with the dose of 10 ml/Kg body weight. BAL was performed by injecting 0.9% NaCl (at ambient temperature) into a syringe connected to a plastic cannula, which was inserted into the trachea. Several 3 mL aliquots were injected and collected in a sterile glass tube. BAL fluid recovery was approximately 30 mL per animal.

Total cells and differential leukocyte count in BAL

The total leukocyte count in the BAL fluid was analyzed in a Neubauer counting chamber connected to a light microscope. The samples were diluted 1:20 in 3% glacial acetic acid and methylene blue.

For differential leukocyte counting in the BAL fluid, slides were made using samples that were diluted in 0.9% NaCl and cytocentrifuged. The slides were fixed, stained (Kit Panótico Rápido LB – Laborclin Ltda[®], Brazil), and examined using a light microscope equipped with an immersion lens. The different types of white globules were quantified by an electronic counter.

Total and differential leukocyte count in blood

The tips of the tails of anesthetized animals were cut with a scalpel, and 0.2 mL of blood was collected in glass tubes containing 3% EDTA. Total leukocyte counting was done in a Neubauer counting chamber. The differential counting was done using blood smear slides, with the same methodology as that for BAL.

Culture of AM

AM were cultured as previously described [12]. The cells were resuspended in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, SP, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich, SP, Brazil). AM (5×10^5 /well) were plated on culture plates (TPP[®], Cultilab, SP, Brazil) and allowed to adhere for 2 h at 37 °C in 5% CO₂. Non-adhering cells were removed by gentle washing with 0.9% NaCl, and 1 ml of fresh media was added for further cell culture.

NO release kinetics of AM and serotonergic agents

In order to analyze the NOR kinetics of AM, the adherent cells were incubated in the presence of FLX (Fluoxetine hydrochloride, TOCRIS Bioscience, Sellex – SAC, SP-Brazil) prepared in extrapure water for 0, 3, 6, 9, 21 and 24 hours in control and malnourished animals. The drug concentrations were as 10^{-4} to 10^{-8} M. Cell culture without drugs served as control of experiment. After each time of incubation the drug, the monolayer cellular was stimulated with 10 μ l/well lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich, SP, Brazil) or extrapure water (negative control). After 24 hours of incubation with LPS, culture supernatants were collected and NO assay was performed as described below.

The effect of 5-HT_{1A} (Buspirone hydrochloride, TOCRIS Bioscience, Sellex – SAC, SP-Brazil) and 5-HT_{1B} receptor agonist (CP-93,129, TOCRIS Bioscience, Sellex – SAC, SP-Brazil) *in vitro* on NOR in AM of control and malnourished animals was also evaluated. AM were incubated for 6 hours with each agonist. After incubation, the cells were stimulated and NOR was assessed using the same protocol previously described.

Nitric oxide assay

NOR was measured indirectly using a quantitative, colorimetric assay based on the Griess reaction [13]. In the present study, triplicate 500 μ l aliquots of cell culture supernatants were incubated with 500 μ l of freshly prepared Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamide dihydrochloride and 5% ortho-phosphoric acid) at room temperature for 10 min. The absorbance of the azochromophore was measured at 550 nm

(BEL Photonics 1105, SP, Brazil). The nitrite concentration was determined using sodium nitrite as a standard (0–100 μM). All samples were assayed against a blank comprising complete RPMI-1640 incubated for 24 h in the same plates as the samples, but in the absence of cells. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich (SP, Brazil). The results were expressed in micromoles of nitrite per 5×10^5 cells.

Cell viability assay

Cell viability was assessed by the mitochondrial reduction of 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) to formazan as described [14]. The AM were incubated with 50 μL of MTT (0.5 mg/ml) in complete medium (500 μl /well) for 8 h at 37°C in 5% CO_2 . The resulting formazan was solubilized in 500 μl /well of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), for 12 h at 37°C in 5% CO_2 . Quantification of formazan was performed spectrophotometrically at 550 nm (BEL Photonics 1105, SP, Brazil). All reagents were purchased from Sigma-Aldrich, SP-Brazil. The results were expressed in absorbance of formazan per 5×10^5 cells.

Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). In the comparison between groups, the Student “t” test or the two-way ANOVA for repeated measures, followed by Holm-Sidak post-tests were used, when appropriate. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

At birth, the body weights of animals in both groups were similar (Figure 1). However, the malnourished animals presented growth retardation from the 6th day of life ($C = 7.5 \pm 0.6$ g, $M = 7.6 \pm 0.8$ g), also confirmed by lower weights at weaning. This persisted through 90 days of life (Figure 1).

We found lower numbers of cells and AM in the BAL in malnourished animals (Figure 2). However, there was no difference in the percentages of AM in the BAL between control and malnourished animals (Figure 2). Additionally, cell viability in culture also was lower in malnourished animals (Figure 3). In comparing control and malnourished animals, there was no observable difference in the total number of leukocytes or the percentages of monocytes in blood (Figure 4).

NOR by AM from malnourished group was lower compared to the control (Figure 5). In presence of FLX, the NOR by AM in culture in control animals was lower for some doses but not all (Figure 5). The addition of buspirone or CP-93,129 either alone or combined with FLX, did not interfere in the NOR by AM in control animals (Figure 6). On the other hand, in the presence of FLX, buspirone or CP-93,129, the NOR by AM of malnourished animals was not modified (Figure 6).

Discussion

The impact of perinatal malnutrition on NO production in rat AM was evaluated in adult animals. The main finding of this study is that FLX inhibits NOR by AM in control animals, but not in malnourished animals. The observed inhibition varied by dose, but not time. Rats were breastfed by mothers fed a multideficient diet similar to that consumed during the 1960s by malnourished populations in the northeast of Brazil, called the Regional Basic Diet (RBD) [11]. *In vitro* cell culture studies showed that as adults, these rats exhibited a reduction in the total number of leukocytes and AM in BAL, and a decrease in cell viability and function. The latter was indicated by a reduction of AM capacity for NO production. These findings indicate that perinatal malnutrition programmed sustainable alterations in the AM in adult life.

The suckling period is a critical period of development where general maturation and growth of organ systems occurs. Malnutrition during the suckling period resulted in the reduction of body weight in early life, and deficiencies in weight gain. This low weight was maintained despite the animals being fed a normal protein diet after weaning. The mothers' daily RBD consumption caused energy and protein malnutrition in the nestlings, which replicates the malnutrition observed in children [11]. RBD consumption in animals reproduces many changes observed in humans, such as cardiovascular and renal alterations, a modified response to antidepressants, and secondary immunodeficiency [11,15,16]. These effects may be due to nutritional deficiencies imposed upon mothers during the nursing period. During this phase, protein deficiency causes alterations in the quality of maternal milk, which can cause damage to body growth in several mammalian species [17].

Several studies have demonstrated 5-HT effects on immune function both *in vivo* and *in vitro* offering the notion that 5-HT is a signal molecule common to the brain and immune

systems [4]. In fact, 5-HT is a very important molecule mediating interactions between the immune, endocrine and nervous systems which together make up neuro-endocrine-immune (NEI) networks [4,18]. These NEI networks may be involved in various pathological processes in humans, such as schizophrenia, depression and mood disorders [18]. The pleiotropic activity of 5-HT is due to the molecular complexity of 5-HT receptors and their wide tissue expression [4,18]. Multiple serotonergic receptor types and subtypes have been identified in macrophages, including subtypes 5-HT_{1A}, 5-HT₂, 5-HT₃, and the 5-HT transporter system (5-HTT) [4,19]. The presence of both 5-HT receptors and 5-HTT in macrophages suggests an important role for 5-HT in macrophage biology and host immunology. Additionally, 5-HT has been shown to modulate aspects of natural immunity delivered by macrophages, as measured by superoxide production and IFN- γ induced phagocytosis [4]. This would suggest that some aspects of immune function may be under the influence of 5-HT and could be modulate by drugs targeting 5-HTT, such as FLX.

The release of oxidant substances is a sensitive and opportune way to examine the function of the macrophages [12]. To our knowledge, this report is the first to show that FLX inhibits NOR by AM. In this study, *in vitro* cell culture systems were utilized to establish the kinetics of NOR by AM stimulated with LPS after treatment with FLX with the aim of evaluating NOR by AM in response to serotonergic agonists. The kinetics of NOR was determined in cells stimulated during 24 h to find the best dose and the time of response of the AM. This experiment has shown that, in the presence of FLX, the NOR by AM in control animals was lower, a response that was related to the dose, but not the time. Additionally, the addition of agonists did not interfere in the NOR by AM among these animals. On the other hand, the NOR by AM from malnourished animals was consistently lower, and did not modify in the presence of FLX or agonists. The lack of response of AM of malnourished animals when challenged reinforces the hypothesis that the immune status of these animals is

not normal. It is possible that the nutritional deficiency during the perinatal period also had long-lasting effects on the NOR by AM, making it hyporesponsive to 5-HT [16].

It is of note that the concentration of FLX required to significantly decrease NOR by AM was 1 μ M. This is approximately equal to the peak concentration (5 μ M) following an intravenous dose of FLX (10 mg/Kg) *in vivo* [20]. Furthermore, although the reduction in NOR by AM was observed at all times evaluated, we chose 6 h to assess the response of agonists to with FLX because the half-life of FLX has been reported to be between 4-7 h in rats [20]. This suggests that the same response could be observed in the body as a whole, however additional studies are needed to confirm this hypothesis.

The effects of FLX may be direct (i.e., specific to target cell) or secondary throughout the regulation of mediators involved in expressing the drug's effect. FLX is a selective inhibitor of 5-HT uptake *in vitro* [21]. Unlike many antidepressant drugs, FLX has little affinity for muscarinic, histamine H₁, serotonergic 5-HT₁ or 5-HT₂, or noradrenergic alpha-1 or alpha-2 receptors on rat brain membranes *in vitro* [21]. In studies performed by other researchers [22], FLX did not significantly affect both NK cells and T cell response when administered in cell cultures, suggesting that the effect of FLX on immune cells is not direct. Nevertheless, our results support the conclusion that the effect of FLX on NOR by AM is direct, although we are unable to explain the mechanisms involved.

The immune system of rodents, similar to that of humans, develops during rapidly changing phases of ontogeny. These phases range from fetal to early postnatal life and represent critical windows in vertebrate immune system development [6,7]. The ontogeny of the vertebrate immune system requires a rigorously regulated series of events that includes production of hematopoietic cells, migration of cells through organs, cell-cell interactions during cytodifferentiation and acquisition of definitive functional properties [6,7]. Though the

degree of immunocompetence in early postnatal life varies between species, there are analogous patterns of immune development during the prenatal and, to a lesser degree, early postnatal periods of mammalian development [6,7]. Malnutrition in the course of the perinatal phase appears to damage the development and differentiation of the normal immune system [15,23]. In our study, the environmental challenges during the nursing period caused injuries to the immune system that persisted into adult life despite the switch to a normal diet. Our findings suggest that immune system programming is dependent upon nutritional status. Perinatal malnutrition reduced the cell number in BAL, which was represented virtually by AM. Such alterations may be due to profound changes in the bone marrow microenvironment, which impair hematopoiesis and induce modifications in the cellularity and structure of hematopoietic tissues [24]. The impairment of bone marrow cell proliferation in undernourished animals and humans assayed in pregnancy or after birth is well documented [25]; however, studies exploring these long-term effects are scarce. Although alterations in primary lymphoid organs were not investigated in the present study, and no difference was found either in the differential or total counts of peripheral blood leucocytes (the latter according to Barreto-Medeiros et al., 2007 [15] using the same malnutrition model), we do not discount the hypothesis that the reduction in the cell number and AMs in the BAL is a repercussion of the perinatal malnutrition. We also found reductions in viability after culture *in vitro* in AM in the malnourished group, a response that can be linked to apoptosis [26]. Moreover, as a consequence of perinatal malnutrition, NOR of AM, as confirmed by nitrite levels in culture cell supernatants [13], was remarkably reduced in malnourished animals. In contrast, a constant NOR was observed in the control group. An association between malnutrition and disturbances in this immune function has previously been reported [23]. On the other hand, there are few studies focusing on the relationship between malnutrition and production of NO by macrophages [27,28,29,30]. Nevertheless, none of these studies

investigated the later repercussions of malnutrition in early life. In fact, experimental studies on immunological alterations occurring long-term after restricted periods of malnutrition are almost nonexistent. A rare example is a study by Prestes-Carneiro et al. (2006) [31], showing a long-term effect on macrophage function in adulthood in rats submitted to protein malnutrition for the first 12 days of lactation.

In summary, the nutritional manipulation in the perinatal period seems to interfere with the programming of function's macrophages and affects their relationship with 5-HT, through adulthood. In addition, the NOR being one of major nonspecific roles of macrophage in host defense [10], our findings raise the hypothesis that impaired NOR by AM in both early malnourished animals and controls animals using FLX can be one of the factors implicated in a changed immune response of the host to challenges.

Acknowledgements

This work was supported by The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil.

References

- [1] Barker DJ: The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 2007;261(5):412-417.
- [2] Lucas A: Long-term programming effects of early nutrition - implications for the preterm infant. *J Perinatol* 2005;25Suppl2:S2-S6.
- [3] Desai M, Crowther NJ, Lucas A, Hales CN: Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br J Nutr* 1996;76(4):591-603.
- [4] Mössner R, Lesch KP: Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behav Immun* 1998;12(4):249-271.
- [5] Prentice AM, Gershwin ME, Schaible UE, Keusch GT, Victora CG, Gordon JI: New challenges in studying nutrition-disease interactions in the developing world. *J Clin Invest* 2008;118(4):1322-1329.
- [6] West LJ: Defining critical windows in the development of the human immune system. *Hum Exp Toxicol* 2002;21:499-505.
- [7] Landreth KS: Critical windows in development of the rodent immune system. *Hum Exp Toxicol* 2002;21(9-10):493-498.
- [8] Nathan C: Metchnikoff's Legacy in 2008. *Nat Immunol* 2008;9(7):695-698.
- [9] Smith RS: The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses* 1991 35(4):298-306.
- [10] Bogdan C: Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001;2(10):907-916.
- [11] Teodósio NR, Lago ES, Romani SA, Guedes RC: A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam Nutr* 1990;40(4):533-547.

- [12] De Castro CM, Manhães-de-Castro R, Fernandes de Medeiros A, Queirós-Santos A, Ferreira-e-Silva WT, Luís de Lima Filho J: Effect of stress on the production of O₂(-) in alveolar macrophages. *J Neuroimmunol* 2000;108(1-2):68-72.
- [13] Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ: Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988;141(7):2407-2412.
- [14] Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *JIM* 1983;65(1-2):55-63.
- [15] Barreto-Medeiros J, Queiros-Santos A, Cabral-Filho JE, Ferreira-e-Silva WT, Leandro CG, Deiró TC, Manhães-de-Castro R, Machado Barbosa de-Castro CM: Stress/Aggressiveness-induced immune changes are altered in adult rats submitted to neonatal malnutrition. *Neuroimmunomodulation* 2007;14(5):229-334.
- [16] Barreto-Medeiros JM, Feitoza EG, Magalhaes K, Cabral-Filho JE, Manhaes-De-Castro FM, De-Castro CM, Manhaes-De-Castro R: Malnutrition during brain growth spurt alters the effect of fluoxetine on aggressive behavior in adult rats. *Nutr Neurosci* 2004;7(1):49-52.
- [17] Morgane PJ, Miller M, Kemper T, Stern W, Forbes W, Hall R, Bronzino J, Kissane J, Hawrylewicz E, Resnick O: The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 1978;2(3):137-230.
- [18] Leonard BE: The immune system, depression and the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2001;25(4):767-780.
- [19] Cloëz-Tayarani I, Changeux JP: Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective. *J Leukoc Biol* 2007;81(3):599-606.

- [20] Caccia S, Cappi M, Fracasso C, Garattini S: Influence of dose and route of administration on the kinetics of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 1990;100(4):509-514.
- [21] Stark P, Fuller RW, Wong DT: The pharmacologic profile of fluoxetine. *J Clin Psychiatry* 1985;46(3 Pt 2):7-13.
- [22] Núñez MJ, Balboa J, Rodrigo E, Brenlla J, González-Peteiro M, Freire-Garabal M: Effects of fluoxetine on cellular immune response in stressed mice. *Neurosci Lett* 2006;396(3):247-251.
- [23] Moore SE, Collinson AC, N'Gom PT, Prentice AM: Maternal malnutrition and the risk of infection in later life. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 2005;55:153-164.
- [24] Vituri CL, Alvarez-Silva M, Trentin AG, Borelli P: Alterations in proteins of bone marrow extracellular matrix in undernourished mice. *Braz J Med Biol Res* 2000;33(8):889-895.
- [25] Borelli P, Blatt S, Pereira J, Maurino BB de, Tsujita M, Souza AC de, et al.: Reduction of erythroid progenitors in protein–energy malnutrition. *Br J Nutr* 2007;97:307-314.
- [26] Rivadeneira DE, Grobmyer SR, Naama HA, Mackrell PJ, Mestre JR, Stapleton PP, Daly JM: Malnutrition-induced macrophage apoptosis. *Surgery* 2001;129(5):617-625.
- [27] Anstead GM, Chandrasekar B, Zhao W, Yang J, Perez LE, Melby PC: Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun* 2001;69:4709-4718.
- [28] Wu G, Flynn NE, Flynn SP, Jolly CA, Davis PK: Dietary Protein or Arginine Deficiency Impairs Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthesis by Young Rats. *J. Nutr* 1999;129:1347-1354.

- [29] Hill AD, Naama H, Shou J, Calvano SE, Daly JM: Antimicrobial effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in protein-energy malnutrition. *Arch Surg* 1995; 130(12):1273-1277.
- [30] Redmond H P, Gallagher H J, Shou J, Daly J M: Antigen presentation in protein-energy malnutrition. *Cell Immunol* 1995;163(1):80-89.
- [31] Prestes-Carneiro LE, Laraya RD, Silva PRC, Moliterno RA, Felipe I, Mathias PC: Long-term effect of early protein malnutrition on growth curve, hematological parameters and macrophage function of rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2006;52:414-420.

Tables

Table 1. Centesimal Composition of the Regional Basic Diet (RBD), as reported in Teodósio *et al.*, (1990). RBD is totally deprived of water soluble and fat soluble vitamins.

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

a: cooked in water and dried

Figure legends

Figure 1. Body weights of male offsprings. Data represent means \pm SEM with $n=12$ for C, and $n=12$ for M. The differences in average body weights between C and M rats were statistically significant ($P<0.05$) from 6 days of life to P90 (two-way ANOVA for repeated measures followed by Holm-Sidak post-tests). For clarity, the symbols representing the statistical significance between C and M groups at different time points were omitted.

Figure 2. Total cells and AM (number and percentage) in the BAL from the animals at P90. Data represent means \pm SEM with $n=12$ for C, and $n=12$ for M. The differences (*) in total cells and AM numbers between C and M rats were statistically significant with $P<0.05$ (“t” test).

Figure 3. Formazan production in the supernatants from cultured AM from the animals at P90. The differences in cell viability between C ($n=12$) and M ($n=12$) rats were statistically significant with $P<0.05$ for all the times assessed (two-way ANOVA for repeated measures followed by Holm-Sidak post-tests). For clarity, the symbols representing the statistical significance between C and M groups at different time points were omitted.

Figure 4. Total leukocytes and monocytes (number and percentage) in the blood from the animals at P90. Data represent means \pm SEM with $n=12$ for C, and $n=12$ for M. There is no difference between the animals at P90.

Figure 5. NOR in the supernatants from cultured AM with FLX at different [M] from the animals at P90. Data represent means \pm SEM with n=12 for C, and n=12 for M. (*) indicates differences statistically significant with $P<0.05$ (two-way ANOVA for repeated measures followed by Holm-Sidak post-tests) in NOR between C and M rats.

Figure 6. NOR in the supernatants from cultured AM with fluoxetine (f), buspirone (b) and/or CP-93,129 (CP) from the animals control (C, n=12) and malnourished (M, n=12) at P90. Data represent means \pm SEM. In the control rats, the differences in NOR between f and w (water) (#), f+b and w (§), f+CP and w (‡) were statistically significant with $P<0.05$ (two-way ANOVA followed by Holm-Sidak post-tests). There is no difference between culture conditions in the malnourished rats. (*) indicates differences statistically significant between C and M rats.

Figure 1

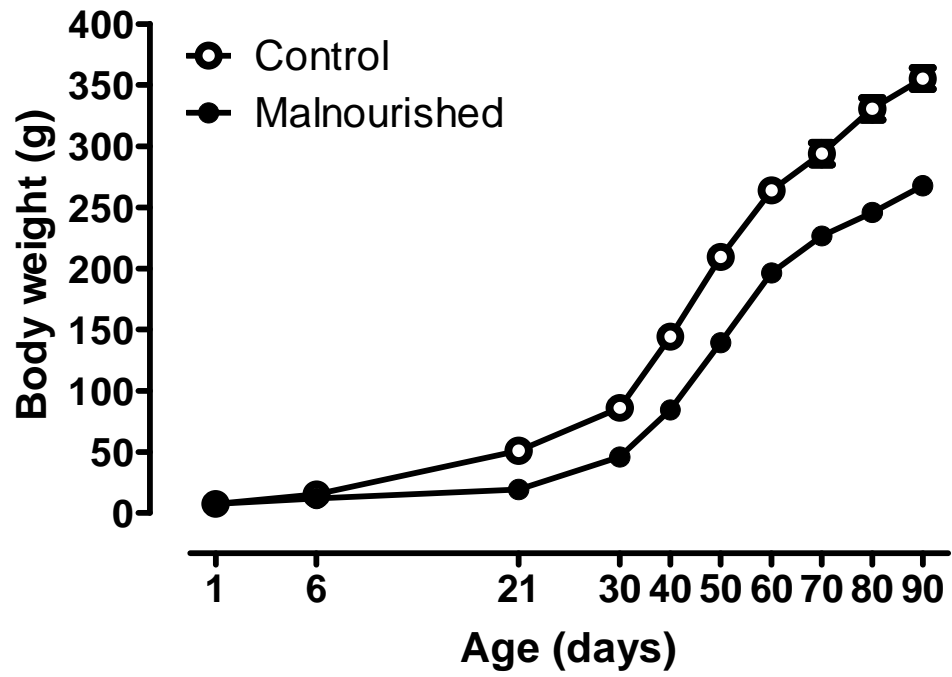


Figure 2

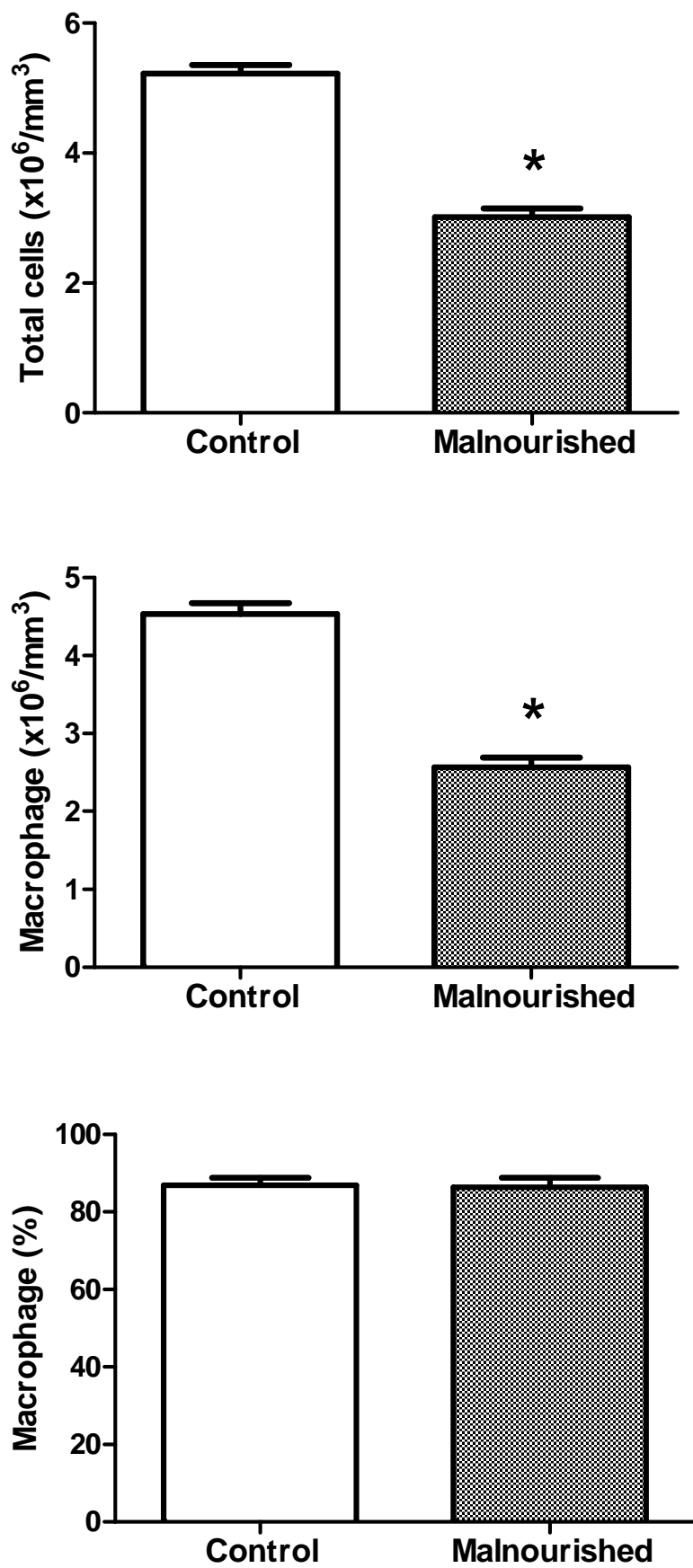


Figure 3

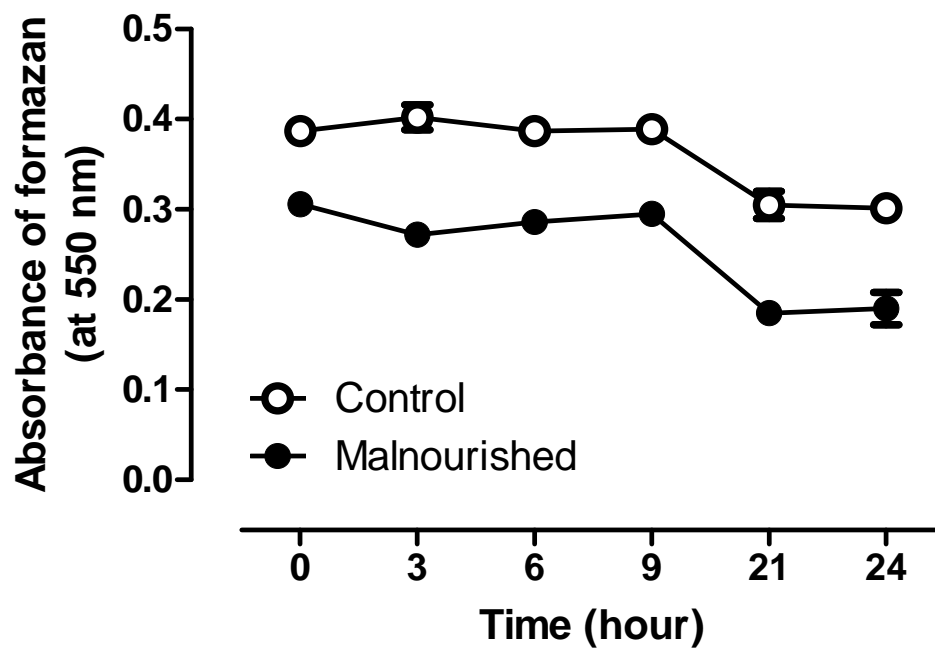


Figure 4

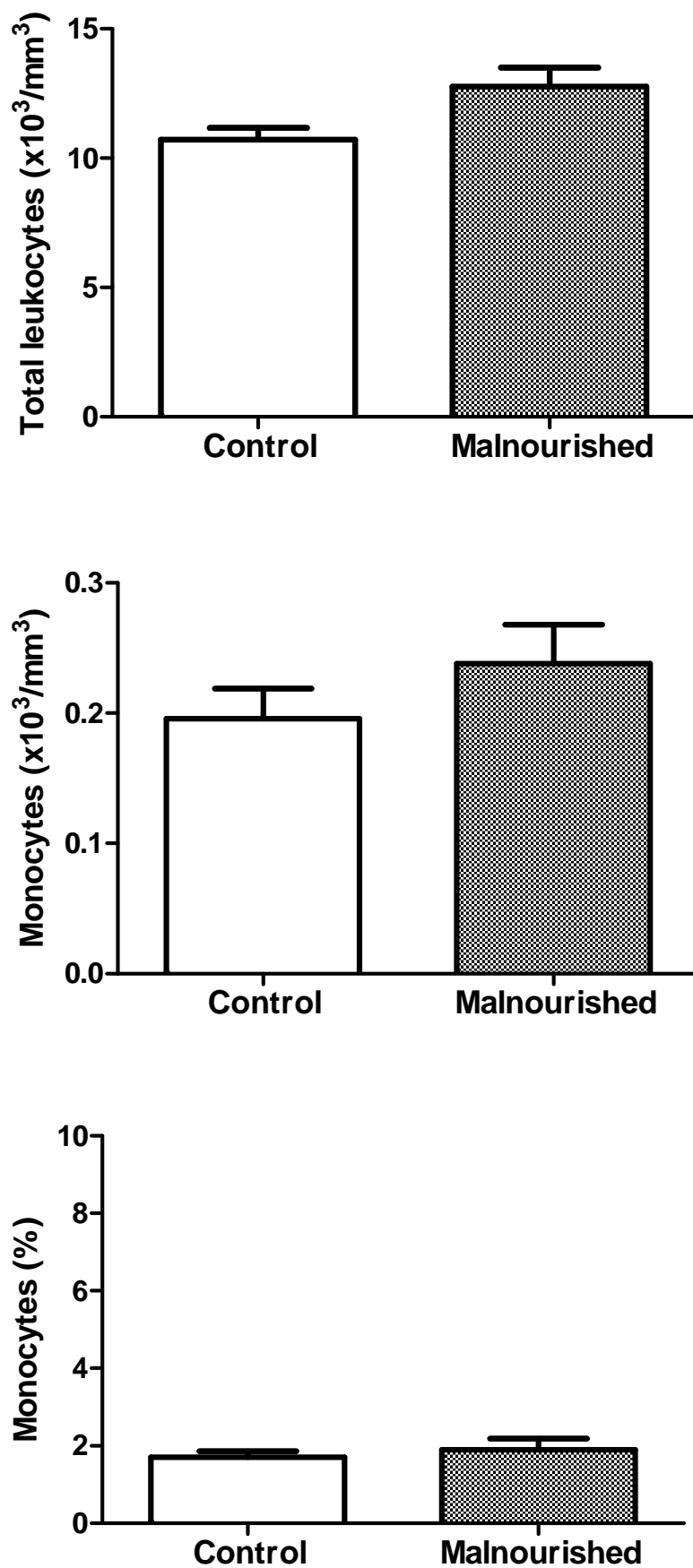


Figure 5

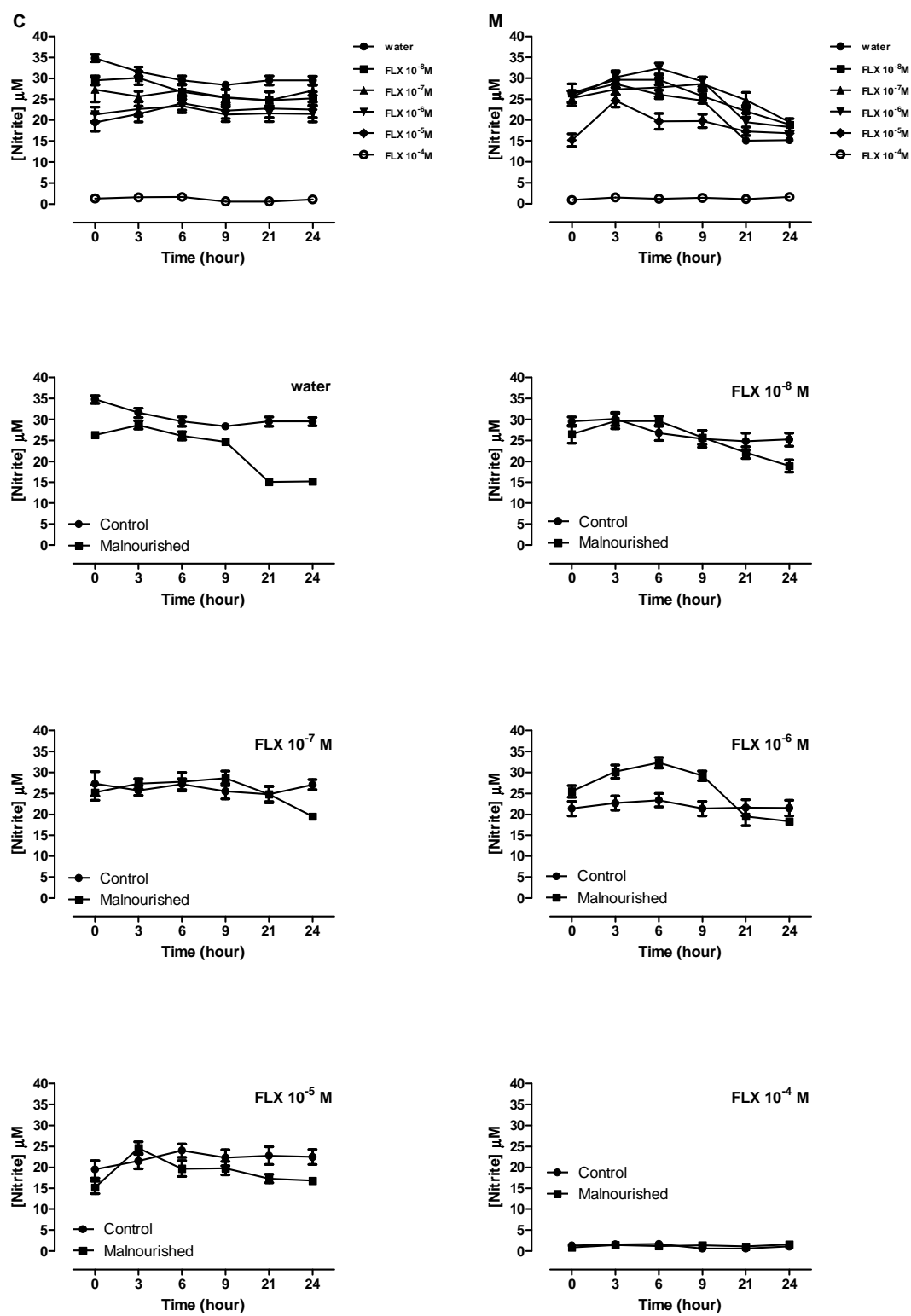
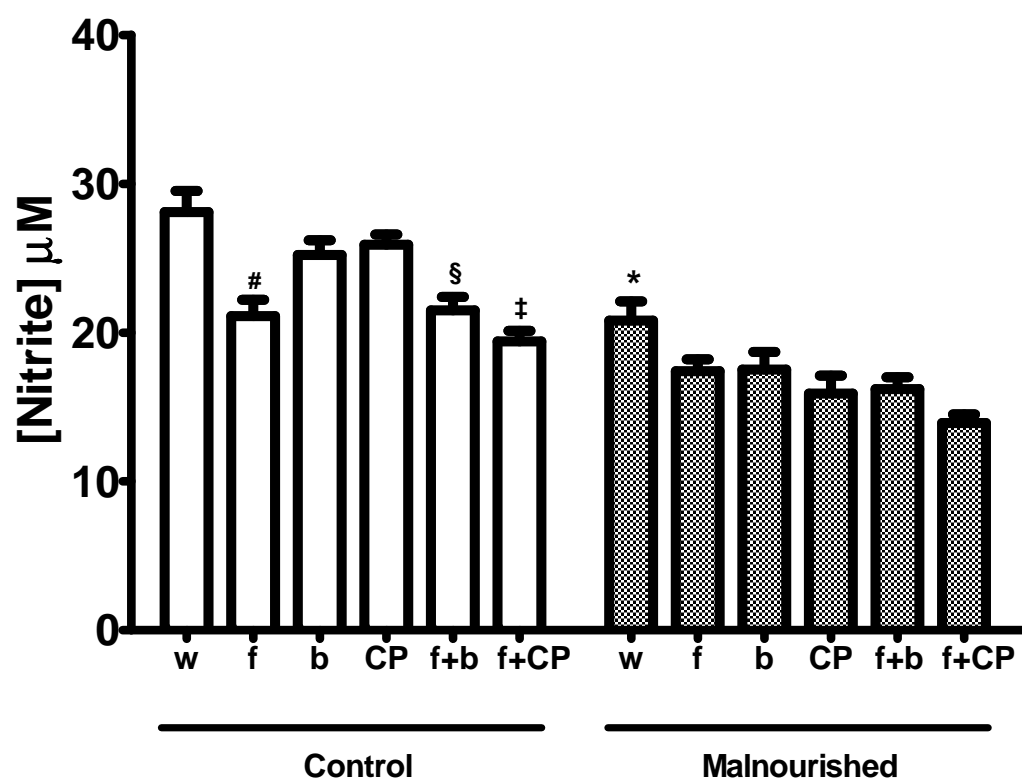


Figure 6



_____CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A desnutrição perinatal causa conseqüências tardias na função do macrófago alveolar, em particular, diminuindo a liberação de NO no rato adulto. Assim, a nutrição durante período crítico de desenvolvimento do sistema imunológico parece afetar o “programming” da função do macrófago. Estudos epigenéticos em particular com macrófagos devem ser realizados para reforçar essa proposição.

A função do macrófago alveolar na liberação de NO é reduzida por inibidor seletivo de recaptção da serotonina no rato adulto. Esse efeito pode ser mediado por componentes serotoninérgicos, pois há evidências de transportadores de serotonina no macrófago. Contudo, ainda não é claro o papel dos receptores nesta modulação. Nossos estudos indicam que os receptores 5-HT₁ não intermedeiam as ações da serotonina na função de liberação do NO no macrófago. Logo, é necessário testar agonistas e antagonistas de outros subtipos de receptores serotoninérgicos. Um importante achado é que, corroborando a hipótese da influência fenotípica, essa regulação serotoninérgica da função do macrófago é claramente afetada pela desnutrição perinatal e não é revertida por recuperação nutricional.

Nós observamos as repercussões no organismo adulto, o que indica a possível vulnerabilidade às infecções de indivíduos submetidos às agressões nutricionais durante o período perinatal. Embora haja nítida redução da desnutrição em nosso meio, há ainda um grande número de indivíduos remanescentes, por exemplo, da Zona da Mata de Pernambuco, das décadas anteriores as de 70, que sofreram desta agressão nutricional. É interessante saber como o sistema imune desses indivíduos responde às infecções, essa é uma das mais instigantes perspectivas desse trabalho.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K. e C. A. Janeway, Jr. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. Cell, v.100, n.1, Jan 7, p.129-38. 2000.
- Ader, R., N. Cohen, *et al.* Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. Lancet, v.345, n.8942, Jan 14, p.99-103. 1995.
- Ader, R., D. Felten, *et al.* Interactions between the brain and the immune system. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.30, p.561-602. 1990.
- Al'perina, E. L., G. V. Idova, *et al.* [Role of the pituitary in modulating the effect of the dopaminergic and serotonergic systems on the immune response]. Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova, v.71, n.11, Nov, p.1428-32. 1985.
- Allende, L. M., A. Corell, *et al.* Immunodeficiency associated with anorexia nervosa is secondary and improves after refeeding. Immunology, v.94, n.4, Aug, p.543-51. 1998.
- Anstead, G. M., B. Chandrasekar, *et al.* Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. Infect Immun, v.69, n.8, Aug, p.4709-18. 2001.
- Aune, T. M., K. M. Mcgrath, *et al.* Expression of 5HT1a receptors on activated human T cells. Regulation of cyclic AMP levels and T cell proliferation by 5-hydroxytryptamine. J Immunol, v.151, n.3, Aug 1, p.1175-83. 1993.
- Barker, D. J. In utero programming of chronic disease. Clin Sci (Lond), v.95, n.2, Aug, p.115-28. 1998.
- Barker, D. J., J. G. Eriksson, *et al.* Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. Int J Epidemiol, v.31, n.6, Dec, p.1235-9. 2002.
- Besedovsky, H. O. e A. Del Rey. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. Endocr Rev, v.17, n.1, Feb, p.64-102. 1996.
- Bianchi, M., A. Clavenna, *et al.* GM-CSF affects hypothalamic neurotransmitter levels in mice: involvement of interleukin-1. Neuroreport, v.8, n.16, Nov 10, p.3587-90. 1997.
- Blalock, J. E. e E. M. Smith. Conceptual development of the immune system as a sixth sense. Brain Behav Immun, v.21, n.1, Jan, p.23-33. 2007.
- Blouin, A., R. P. Bolender, *et al.* Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. J Cell Biol, v.72, n.2, Feb, p.441-55. 1977.
- Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. Nat Immunol, v.2, n.10, Oct, p.907-16. 2001.

- Bogdan, C., M. Rollinghoff, *et al.* The role of nitric oxide in innate immunity. Immunol Rev, v.173, Feb, p.17-26. 2000.
- Bouwens, L., M. Baekeland, *et al.* Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. Hepatology, v.6, n.4, Jul-Aug, p.718-22. 1986.
- Boxwell, J., P. Ayson, *et al.* Growth and metabolic parameters in pups of undernourished lactating rats. Physiol Behav, v.57, n.3, Mar, p.469-75. 1995.
- Brown, J. L. e E. Pollitt. Malnutrition, poverty and intellectual development. Sci Am, v.274, n.2, Feb, p.38-43. 1996.
- Carlson, S. L., D. L. Felten, *et al.* Alterations of monoamines in specific central autonomic nuclei following immunization in mice. Brain Behav Immun, v.1, n.1, Mar, p.52-63. 1987.
- Cerrito, F. e M. Raiteri. Serotonin release is modulated by presynaptic autoreceptors. Eur J Pharmacol, v.57, n.4, Aug 15, p.427-30. 1979.
- Chandra, R. K. 1990 McCollum Award lecture. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. Am J Clin Nutr, v.53, n.5, May, p.1087-101. 1991.
- _____. Nutrition and the immune system: an introduction. Am J Clin Nutr, v.66, n.2, Aug, p.460S-463S. 1997.
- _____. Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again. Proc Nutr Soc, v.58, n.3, Aug, p.681-3. 1999.
- Chang, J. Y., E. Ekblad, *et al.* Serotonin uptake into cerebrovascular nerve fibers of rat, visualization by immunohistochemistry, disappearance following sympathectomy, and release during electrical stimulation. Brain Res, v.492, n.1-2, Jul 17, p.79-88. 1989.
- Chen, J. C.; Tokins, J. Galller, J. R.; Vociler, L. Effect of prenatal malnutrition on release of monoamines from hippocampal slices. Life Sciences, v. 57, n. 16, p.1467-1475, 1995
- Clark, C. T., H. Weissbach, *et al.* 5-Hydroxytryptophan decarboxylase: preparation and properties. J Biol Chem, v.210, n.1, Sep, p.139-48. 1954.
- Cloez-Tayarani, I. e J. P. Changeux. Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective. J Leukoc Biol, v.81, n.3, Mar, p.599-606. 2007.
- Cohen, R. A., Zitnay, K. M., & Weisbrod, R. M. (1985). Platelet-induced neurogenic coronary contractions due to accumulation of the false neurotransmitter, 5-hydroxytryptamine. J. Clin. Invest. 75, 286-292.
- Cohen, R. A., Zitnay, K. M., & Weisbrod, R. M. (1987). Accumulation of 5-hydroxytryptamine leads to dysfunction of adrenergic nerves in canine coronary artery following intimal damage in vivo. Circ. Res. 61, 829-833.

Crivellato, E., D. Damiani, *et al.* Suggestive evidence for a microanatomical relationship between mast cells and nerve fibres containing substance P, calcitonin gene related peptide, vasoactive intestinal polypeptide, and somatostatin in the rat mesentery. Acta Anat (Basel), v.141, n.2, p.127-31. 1991.

Cross, R. J., W. H. Brooks, *et al.* Hypothalamic-immune interactions. Effect of hypophysectomy on neuroimmunomodulation. J Neurol Sci, v.53, n.3, Mar, p.557-66. 1982.

De Castro, C. M., R. Manhaes De Castro, *et al.* Effect of stress on the production of O(2)(-) in alveolar macrophages. J Neuroimmunol, v.108, n.1-2, Aug 1, p.68-72. 2000.

Delgado, H. L., V. E. Valverde, *et al.* Relationship of maternal and infant nutrition to infant growth. Early Hum Dev, v.6, n.3, Jul, p.273-86. 1982.

Delves, P. J. e I. M. Roitt. The immune system. First of two parts. N Engl J Med, v.343, n.1, Jul 6, p.37-49. 2000a.

_____. The immune system. Second of two parts. N Engl J Med, v.343, n.2, Jul 13, p.108-17. 2000b.

Devoino, L., L. Eliseeva, *et al.* 5-Hydroxytryptophan effect on the development of the immune response: IgM and IgG antibodies and rosette formation in primary and secondary responses. Eur J Immunol, v.5, n.6, Jun, p.394-9. 1976.

Dietert, R. R., R. A. Etzel, *et al.* Workshop to identify critical windows of exposure for children's health: immune and respiratory systems work group summary. Environ Health Perspect, v.108 Suppl 3, Jun, p.483-90. 2000.

Dimitriadou, V., M. G. Buzzi, *et al.* Ultrastructural evidence for neurogenically mediated changes in blood vessels of the rat dura mater and tongue following antidromic trigeminal stimulation. Neuroscience, v.48, n.1, p.187-203. 1992.

Ding, A. H., C. F. Nathan, *et al.* Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. J Immunol, v.141, n.7, Oct 1, p.2407-12. 1988.

Dobbing, J. Infant nutrition and later achievement. Am J Clin Nutr, v.41, n.2 Suppl, Feb, p.477-84. 1985.

Dobbing, J. Vulnerable periods in developing brain. In: Davison, AN.; Dobbing, J. (ed) Applied Neurochemistry, p. 287-316, 1968.

Dropp, J. J. Mast cells in mammalian brain. Acta Anat (Basel), v.94, n.1, p.1-21. 1976.

Dunn, A. J. Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism paralleling the increased plasma corticosterone. Life Sci, v.43, n.5, p.429-35. 1988.

Dunn, A. J., M. L. Powell, *et al.* Virus infection as a stressor: influenza virus elevates plasma concentrations of corticosterone, and brain concentrations of MHPG and tryptophan. Physiol Behav, v.45, n.3, Mar, p.591-4. 1989.

_____. Effects of Newcastle disease virus administration to mice on the metabolism of cerebral biogenic amines, plasma corticosterone, and lymphocyte proliferation. Brain Behav Immun, v.1, n.3, Sep, p.216-30. 1987.

Dunn, A. J. e J. Welch. Stress- and endotoxin-induced increases in brain tryptophan and serotonin metabolism depend on sympathetic nervous system activity. J Neurochem, v.57, n.5, Nov, p.1615-22. 1991.

Edvinsson, L., J. Cervos-Navarro, *et al.* Regional distribution of mast cells containing histamine, dopamine, or 5-hydroxytryptamine in the mammalian brain. Neurology, v.27, n.9, Sep, p.878-83. 1977.

Eiserich, J. P., M. Hristova, *et al.* Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. Nature, v.391, n.6665, Jan 22, p.393-7. 1998.

Elisieva, L. S., & Stefanovich, L. E. (1982). Specific binding of serotonin by blood leukocytes and peritoneal cells in the mouse. Biokhimica 47, 810-815.

Essmann, W. B. (1978b). Serotonin distribution in tissue and fluids. In W. B. Essmann (ed.), *Serotonin in health and disease*, Vol. 1. Spectrum: New York.

Essmann, W. B. (ed.). (1978a). *Serotonin in health and disease*. Spectrum: New York.

Forsdahl, A. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? Br J Prev Soc Med, v.31, n.2, Jun, p.91-5. 1977.

Gardier, A. M., S. Kachaner, *et al.* Effects of a primary immune response to T-cell dependent antigen on serotonin metabolism in frontal cortex: in vivo microdialysis study in freely moving Fischer 344 rat. Brain Res, v.645, n.1-2, May 9, p.150-6. 1994.

Gaston, B. & Stamler, J. S. Biochemistry of nitric oxide. In *Nitric Oxide and Infection* (Ed. Fang, F.C.) 37-55 (Kluwer/Plenum, New York, 1999).

Germonpre, P. R., G. F. Joos, *et al.* Characterization of the neurogenic plasma extravasation in the airways. Arch Int Pharmacodyn Ther, v.329, n.1, Jan-Feb, p.185-203. 1995.

Ghia, P., E. Ten Boekel, *et al.* B-cell development: a comparison between mouse and man. Immunol Today, v.19, n.10, Oct, p.480-5. 1998.

Good, R. A. Organization and development of the immune system. Relation to its reconstruction. Ann N Y Acad Sci, v.770, Dec 29, p.8-33. 1995.

Gordon S. The macrophage: past, present and future. Eur J Immunol. 2007 nov;37 suppl 1:s9-17.

Grantham-Mcgregor, S.; Schofield, W.; Powell, C. Development of severely malnourished children who received psychosocial stimulation: six-year follow up. Pediatrics, 79(2):247-254, 1987.

Guedes, R.C.A; Andrade, A.F.D.; Cabral-Filho, J.E. Propagation of cortical spreading depression in malnourished rats: facilitator effect of dietary protein deficiency. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 20:639-642,1987.

Hales, CN.; Barker, DJP. The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin*, v.60: p.5-20, 1992a.

Hales, C. N. e D. J. Barker. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, v.35, n.7, Jul, p.595-601. 1992.

Hales, C. N. e S. E. Ozanne. For debate: Fetal and early postnatal growth restriction lead to diabetes, the metabolic syndrome and renal failure. *Diabetologia*, v.46, n.7, Jul, p.1013-9. 2003.

Henson, S. E., T. C. Nichols, *et al.* The ectoenzyme gamma-glutamyl transpeptidase regulates antiproliferative effects of S-nitrosoglutathione on human T and B lymphocytes. *J Immunol*, v.163, n.4, Aug 15, p.1845-52. 1999.

Hill, A. D., H. Naama, *et al.* Antimicrobial effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in protein-energy malnutrition. *Arch Surg*, v.130, n.12, Dec, p.1273-7; discussion 1277-8. 1995.

Hisatomi, K. e Y. Niiyama. Effects of postnatal undernutrition on the catecholamine and serotonin contents of suckling rat brain. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, v.26, n.3, p.279-92. 1980.

Holzwarth, M. A. e M. S. Brownfield. Serotonin coexists with epinephrine in rat adrenal medullary cells. *Neuroendocrinology*, v.41, n.3, Sep, p.230-6. 1985.

Homo-Delarche, F. e M. Dardenne. The neuroendocrine-immune axis. *Springer Semin Immunopathol*, v.14, n.3, p.221-38. 1993.

Hoyer, D., D. E. Clarke, *et al.* International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev*, v.46, n.2, Jun, p.157-203. 1994.

Ibrahim,m. (1974). The mast cells of the mammalian central nervous system. I.Morphology, distribution and histochemistry. *J. Neurol. Sci.* 21, 431-478.

Ivanovic, D. M., M. G. Olivares, *et al.* Nutrition and learning in Chilean school age children: Chile's Metropolitan Region Survey 1986-1987. *Nutrition*, v.12, n.5, May, p.321-8. 1996.

Junod, A. F. Uptake, metabolism and efflux of 14 C-5-hydroxytryptamine in isolated perfused rat lungs. *J Pharmacol Exp Ther*, v.183, n.2, Nov, p.341-55. 1972.

Kabiersch, A., A. Del Rey, *et al.* Interleukin-1 induces changes in norepinephrine metabolism in the rat brain. *Brain Behav Immun*, v.2, n.3, Sep, p.267-74. 1988.

Kawakami, K; Kadota, J; Lida, K; Shirai, R; Abe, K; Kohno, S. Reduced immune function and malnutrition in the elderly. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 187(2):157-171, 1999.

Keith, I. M., J. Jin, *et al.* Nerve-mast cell interaction in normal guinea pig urinary bladder. J Comp Neurol, v.363, n.1, Dec 4, p.28-36. 1995.

Lancaster, J. R., "Nitric oxide in cells", *American Scientist*, vol. 80, 1992, pp. 248-259

Landreth, K. S. Critical windows in development of the rodent immune system. Hum Exp Toxicol, v.21, n.9-10, Sep-Oct, p.493-8. 2002.

Landreth, K.S.B. Lymphocyte development as a developmental process. In Cooper et al., Brown et al. Eds. *Developmental Immunology*. New York: Oxford University Press, p. 238-273. 1993.

Lehmann, S. Immune function and nutrition. The clinical role of the intravenous nurse. J Intraven Nurs, v.14, n.6, Nov-Dec, p.406-20. 1991.

Leke, L.; Saygili, A.; Vural, M.; Risbourg, B. Malnutrition et déficit immunitaire chez l'enfant. *Archives de Pédiatrie*, 3:705-13, 1996.

Lesch, K. P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S. Z., Greenberg, B. D., Petri, S., Benjamin, J., Müller, C. R., Hamer, D. H., & Murphy, D. L. (1996). Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274, 1483-1487.

Leuba, G. e T. Rabinowicz. Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. I. Cellular densities, cortical volume and total numbers of cells. Exp Brain Res, v.37, n.2, Oct, p.283-98. 1979a.

_____. Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. II. Evolution of dendritic branchings and spines in the visual region. Exp Brain Res, v.37, n.2, Oct, p.299-308. 1979b.

Linthorst, A. C., C. Flachskamm, *et al.* Activation of serotonergic and noradrenergic neurotransmission in the rat hippocampus after peripheral administration of bacterial endotoxin: involvement of the cyclo-oxygenase pathway. Neuroscience, v.72, n.4, Jun, p.989-97. 1996.

_____. Effect of bacterial endotoxin and interleukin-1 beta on hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioral activity, and free corticosterone levels: an in vivo microdialysis study. J Neurosci, v.15, n.4, Apr, p.2920-34. 1995.

Lucas, A., M. S. Fewtrell, *et al.* Fetal origins of adult disease-the hypothesis revisited. Bmj, v.319, n.7204, Jul 24, p.245-9. 1999.

Lynch, G.; Smart, J. L.; Dobbing, J. Motor coordination and cerebellar size in adult rats undernourished in early life. *Brain Research*. 83:249-259, 1975.

Macmicking, J., Q. W. Xie, *et al.* Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol, v.15, p.323-50. 1997.

Macmicking, J. D., R. J. North, *et al.* Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.10, May 13, p.5243-8. 1997.

Macphee, I. A., F. A. Antoni, *et al.* Spontaneous recovery of rats from experimental allergic encephalomyelitis is dependent on regulation of the immune system by endogenous adrenal corticosteroids. J Exp Med, v.169, n.2, Feb 1, p.431-45. 1989.

Macpherson, J. C., S. A. Comhair, *et al.* Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. J Immunol, v.166, n.9, May 1, p.5763-72. 2001.

Marathias, K., M. Lambracht-Hall, *et al.* Endogenous regulation of rat brain mast cell serotonin release. Int Arch Allergy Appl Immunol, v.95, n.4, p.332-40. 1991.

Marcos, A. The immune system in eating disorders: an overview. Nutrition, v.13, n.10, Oct, p.853-62. 1997.

Marin, M. C., M. E. De Tomas, *et al.* Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. J Nutr, v.125, n.4, Apr, p.1017-24. 1995.

Marshall, H. E., K. Merchant, *et al.* Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. Faseb J, v.14, n.13, Oct, p.1889-900. 2000.

Mathiau, P., A. M. Reynier-Rebuffel, *et al.* Absence of serotonergic innervation from raphe nuclei in rat cerebral blood vessels--II. Lack of tryptophan hydroxylase activity in vitro. Neuroscience, v.52, n.3, Feb, p.657-65. 1993.

Mathiau, P., D. Riche, *et al.* Absence of serotonergic innervation from raphe nuclei in rat cerebral blood vessels--I. Histological evidence. Neuroscience, v.52, n.3, Feb, p.645-55. 1993.

Mc, I. W. e I. H. Page. The metabolism of serotonin (5-hydroxytryptamine). J Biol Chem, v.234, n.4, Apr, p.858-64. 1959.

Melchers, F. The Carl Prausnitz Memorial Lecture. The development of lymphocytes. Int Arch Allergy Immunol, v.113, n.1-3, May-Jul, p.11-3. 1997.

Merali, Z., S. Lacosta, *et al.* Effects of interleukin-1beta and mild stress on alterations of norepinephrine, dopamine and serotonin neurotransmission: a regional microdialysis study. Brain Res, v.761, n.2, Jul 4, p.225-35. 1997.

Metcalf, MD.; Moore, MAS. Haemopoietic cells. *Frontiers of Biology*, volume 24. London: North-Holland Publishing Co, p. 220-242. 1971.

Monteiro, C. A. O panorama da nutrição infantil nos anos 90. In:Unicef. *Cadernos de Políticas Sociais – Série Documentos para Discussão*. Brasília, 1:1-14, 1996.

Morgan, G. What, if any, is the effect of malnutrition on immunological competence? Lancet, v.349, n.9066, Jun 7, p.1693-5. 1997.

Morgane, P.J.; Miller, M.; Kemper, T.; Stern, W.; Forbes, W.; Hall, R.; Bronzino, J.; Hawrylewicz, E.; Resnick, O. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2:137-230, 1978.

Morgane, P. J., R. Austin-Lafrance, *et al.* Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev*, v.17, n.1, Spring, p.91-128. 1993.

Morgane, P. J., D. J. Mokler, *et al.* Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev*, v.26, n.4, Jun, p.471-83. 2002.

Morio, L. A., H. Chiu, *et al.* Functional heterogeneity of rat hepatic and alveolar macrophages: effects of chronic ethanol administration. *J Leukoc Biol*, v.68, n.5, Nov, p.614-20. 2000.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, v.65, n.1-2, Dec 16, p.55-63. 1983.

Mossner, R. e K. P. Lesch. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behav Immun*, v.12, n.4, Dec, p.249-71. 1998.

Nagy, Z. M., K. J. Porada, *et al.* Undernutrition by rearing in large litters delays the development of reflexive, locomotor, and memory processes in mice. *J Comp Physiol Psychol*, v.91, n.3, Jun, p.682-96. 1977.

Nannmark, U., L. Sennerby, *et al.* Inhibition of leukocyte phagocytosis by serotonin and its possible role in tumor cell destruction. *Cancer Lett*, v.62, n.1, Feb 14, p.83-6. 1992.

Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J*, v.6, n.12, Sep, p.3051-64. 1992.

_____. Metchnikoff's Legacy in 2008. *Nat Immunol*, v.9, n.7, Jul, p.695-8. 2008.

Noback, C. R. e L. M. Eisenman. Some effects of protein-calorie undernutrition on the developing central nervous system of the rat. *Anat Rec*, v.201, n.1, Sep, p.67-73. 1981.

Nogueira MI, Takase, LF, Lopes, S, Mascaro, MB, Manhaes-de-Castro, R. Serotonina. A trajetória evolutiva de uma molécula de ampla ação trófica e neurológica. *Ciência Hoje* vol. 34, n.202, 30-35. 2004

Ozanne, S. E. e C. N. Hales. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proc Nutr Soc*, v.58, n.3, Aug, p.615-9. 1999.

Paiva, M. Q., M. Caramona, *et al.* Intra- and extraneuronal metabolism of 5-hydroxytryptamine in the isolated saphenous vein of the dog. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v.325, n.1, Jan, p.62-8. 1984.

Parrat, J. R. (1958). Discussion. In G. P. Lewis (ed.), 5-hydroxytryptamine, p. 36. Pergamon Press: London.

Parrat, J. R., & West, G. B. (1957). 5-hydroxytryptamine and tissue mast cells. *J. Physiol.* 137, 169-178.

- Picanço-Diniz, C. W.; Araújo, M. S.; Borba, J. M. C.; Guedes, R. C. A. NADPH-diaphorase containing and biocytin-labelled axon terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development. *Nutritional Neuroscience*, 1:35-48, 1998.
- Prestes-Carneiro, L. E., R. D. Laraya, *et al.* Long-term effect of early protein malnutrition on growth curve, hematological parameters and macrophage function of rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, v.52, n.6, Dec, p.414-20. 2006.
- Qiu, Y., Y. Peng, *et al.* Immunoregulatory role of neurotransmitters. *Adv Neuroimmunol*, v.6, n.3, p.223-31. 1996.
- Redmond, H. P., H. J. Gallagher, *et al.* Antigen presentation in protein-energy malnutrition. *Cell Immunol*, v.163, n.1, Jun, p.80-7. 1995.
- Resnick, O., M. Miller, *et al.* Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat. *Neurosci Biobehav Rev*, v.3, n.4, Winter, p.233-46. 1979.
- Reynolds, H. Y. Lung inflammation and fibrosis: an alveolar macrophage-centered perspective from the 1970s to 1980s. *Am J Respir Crit Care Med*, v.171, n.2, Jan 15, p.98-102. 2005.
- Rocha-De-Melo, A. P. e R. C. Guedes. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. *Braz J Med Biol Res*, v.30, n.5, May, p.663-9. 1997.
- Rosso, P.; Hormazabal, J.; Winick, M. Changes in brain weight, cholesterol, phospholipid and dna content in marasmatic children. *American Journal of Clinical Nutrition*. 23(10):1275-1279, 1970.
- Roszman, T. L., J. C. Jackson, *et al.* Neuroanatomic and neurotransmitter influences on immune function. *J Immunol*, v.135, n.2 Suppl, Aug, p.769s-772s. 1985.
- Saito, A. e T. J. Lee. Serotonin as an alternative transmitter in sympathetic nerves of large cerebral arteries of the rabbit. *Circ Res*, v.60, n.2, Feb, p.220-8. 1987.
- Sandler, M., M. A. Reveley, *et al.* Human platelet monoamine oxidase activity in health and disease: a review. *J Clin Pathol*, v.34, n.3, Mar, p.292-302. 1981.
- Shintani, F., S. Kanba, *et al.* Interleukin-1 beta augments release of norepinephrine, dopamine, and serotonin in the rat anterior hypothalamus. *J Neurosci*, v.13, n.8, Aug, p.3574-81. 1993.
- Shortman, K., D. Vremec, *et al.* The linkage between T-cell and dendritic cell development in the mouse thymus. *Immunol Rev*, v.165, Oct, p.39-46. 1998.
- Skerret, S. J; Henderson, W. R; Martin, T. R. Alveolar macrophage function in rats with severe protein calorie malnutrition. *Journal of Immunology*, 144:1052-61, 1990.

Smart, T. L.; Dobbing, J. Vulnerability of developing brain. VI. Relative effects of fetal and early postnatal undulate and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. *Brain Research*, 33: 303-314, 1971.

Sobotka, T.J.; Cook, M.P.; Brodie, R.E. Neonatal malnutrition: neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. *Brain Resarch*. v. 65, n. 3, p.443-457, 1974

Stanley, M. I., R. J. Berger, *et al.* Serotonin (5-HT) fibers of the rat dura mater: 5-HT-positive, but not authentic serotonergic, tryptophan hydroxylase-like fibers. *Neurosci Lett*, v.162, n.1-2, Nov 12, p.89-92. 1993.

Sternberg, E. M., J. Trial, *et al.* Effect of serotonin on murine macrophages: suppression of Ia expression by serotonin and its reversal by 5-HT₂ serotonergic receptor antagonists. *J Immunol*, v.137, n.1, Jul 1, p.276-82. 1986.

Stuehr, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta*, v.1411, n.2-3, May 5, p.217-30. 1999.

Teh, HS. Tcell development and repertoire selection. In cooper el, Brown en Eds. *Developmental Immunology*. New York: Oxford University Press, p. 217-237. 1993.

Teodosio, N. R., E. S. Lago, *et al.* A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam Nutr*, v.40, n.4, Dec, p.533-47. 1990.

Teshima, S; Rokutan, K; Takahashi, M; Nikawa,T; Kido, Y; Kishi, K. Alteration of the respiratory burst and phagocytosis of macrophages under protein malnutrition. *Cellular Immunology*, 139(2):493-504, 1992.

Thoa, N. B., D. Eccleston, *et al.* The accumulation of C14-serotonin in the guinea-pig vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther*, v.169, n.1, Sep, p.68-73. 1969.

Verbeuren, T. J., F. H. Jordaens, *et al.* Accumulation and release of [3H]-5-hydroxytryptamine in saphenous veins and cerebral arteries of the dog. *J Pharmacol Exp Ther*, v.226, n.2, Aug, p.579-88. 1983.

Verhofstad, A. A. e G. Jonsson. Immunohistochemical and neurochemical evidence for the presence of serotonin in the adrenal medulla of the rat. *Neuroscience*, v.10, n.4, Dec, p.1443-53. 1983.

Wekerle, H., Linington, C., Lassmann, H., & Meyermann, R. (1986). Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci*. 9, 271-277.

Widdowson EM, Mccance RA. The effect of finite periods of undernutrition at different ages on the composition and subsequent development of the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1963 oct 22;158:329-42.

Wu, G., N. E. Flynn, *et al.* Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats. *J Nutr*, v.129, n.7, Jul, p.1347-54. 1999.

Wu, G. e S. M. Morris, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*, v.336 (Pt 1), Nov 15, p.1-17. 1998.

Zhu, J., Bengtsson, B. O., Mix, E., Thorell, L. H., Olsson, T., & Link, H. (1995). Peripheral nerve myelin modulates the effect of antidepressants on major histocompatibility complex expression on macrophages in experimental allergic neuritis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 8, 185-198.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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



Ofício nº 72/06

Recife, 12 de dezembro de 2006

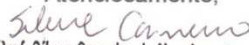

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Raul Manhães de Castro**
Departamento de Nutrição - UFPE
Processo nº 012502/2006-07

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 "**Desnutrição neonatal: efeito de inibidores seletivos de recaptção da serotonina sobre função *in vitro* de macrófagos alveolares de ratos adultos**".

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,

Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEA

ANEXO B – Documentação de encaminhamento do artigo “Perinatal malnutrition programs sustainable alterations in nitric oxide production and cell viability in activated macrophages of the adult rat” ao periódico

Fwd: Submission Confirmation
De: **Raul Manhães** (manhaesdecastroraul@gmail.com)
Enviada: sexta-feira, 27 de junho de 2008 18:34:12
Para: wyllatfs@hotmail.com

----- Forwarded message -----
From: **Immunology Letters** <support@elsevier.com>
Date: 2008/6/27
Subject: Submission Confirmation
To: manhaesdecastroraul@gmail.com

Dear Raul Manhães-de-Castro,

Your submission entitled "Perinatal malnutrition programs sustainable alterations in nitric oxide production and cell viability in activated macrophages of the adult rat" has been received by Immunology Letters

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

Your username is: Raul Manhães-de-Castro
Your password is: *****

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,

Elsevier Editorial System
Immunology Letters

ANEXO C – Documentação de encaminhamento do artigo “perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide release by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rat” ao periódico

Ms. No. 200807007, Neuroimmunomodulation
De: **dsu@karger.ch**
Enviada: quarta-feira, 16 de julho de 2008 12:49:53
Para: **wyllatfs@hotmail.com**

MS: 200807007

Dear Ms. Ferreira-e-Silva,

We acknowledge receipt of your article entitled "Perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide released by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rat" for consideration by the Editorial Board of "Neuroimmunomodulation". The manuscript reference number is 200807007. Please use this number on all correspondence about the manuscript. We have already engaged the procedure of reviewing.

For information regarding the status of your manuscript and for future submissions to "Neuroimmunomodulation", you can access this system by logging into the journal's online peer review system <http://www.karger.com/nim> with your personal logon name and password as follows:

Logon Name: **wyllatfs**
Password: *********

Thank you for having chosen our journal.

With kind regards,

Sandrine Maguire
NEUROIMMUNOMODULATION
Editorial Office
S. KARGER AG - Medical and Scientific Publishers
e: **nim@karger.ch**
t: **+41 61 306 1356**
f: **+41 61 306 1434**

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)